

**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI**



**ANADOLU MANDASININ *IN VITRO* EMBRİYO GELİŞİM VE
ÜRETİM PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Mehmet Ali YILMAZ

Danışmanlar

Prof. Dr. Yaşar ERGÜN

Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ

HATAY – 2021

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

**ANADOLU MANDASININ *IN VITRO* EMBRİYO GELİŞİM VE
ÜRETİM PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ
Mehmet Ali YILMAZ

Danışmanlar

Prof. Dr. Yaşar ERGÜN
Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ

Bu tez, Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel
Müdürlüğü, Hayvancılık ve Su Ürünleri Araştırmaları Dairesi tarafından
TAGEM/HAYSÜD/B/18/A4/P1/260 no' lu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2021

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

**ANADOLU MANDASININ *IN VITRO* EMBRİYO GELİŞİM VE
ÜRETİM PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ
Mehmet Ali YILMAZ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 06/10/2021 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi :	Jüri başkanı :	Prof. Dr. Murat FINDIK	
	Üye :	Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ	
	Üye :	Prof. Dr. Yaşar ERGÜN	
	Üye :	Prof. Dr. Serhan Serhat AY	
	Üye :	Prof. Dr. Mustafa Kemal SARIBAY	
	Üye :	Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN	

Bu tez, Enstitümüz Doğum, Jinekoloji ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde ve tez konumu belirlememde yardımları esirgemeyen, çalışmam esnasında olumlu yönlendirme ve eleştirileriyle bana yol gösteren, danışman hocalarım Prof. Dr. Yaşar ERGÜN ve Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ'a; doktora süresi boyunca doktora derslerinde ve tez çalışmasında katkıları olan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nin değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Fikret KARACA, Prof. Dr. Mustafa Kemal SARIBAY, Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN, Prof. Dr. Gökhan DOĞRUER, Dr. Öğr. Üyesi Cafer Tayyar ATEŞ, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Merve KÖSE ve Dr. Öğr. Üyesi Ece KOLDAŞ ÜRER'e; tez çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen ve manevi destekte bulunan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürü Dr. Engin ÜNAY ve yardımlarını gördüğüm Teknik Koordinatör Dr. Hasan Hüseyin ŞENYÜZ'e; tez çalışmalarım esnasında desteklerine ve yardımlarına mesai saati gözetmeden devam eden mesai arkadaşlarım Ramazan SEVGİ ve Alaeddin OKUROĞLU'na, Afyonkarahisar İli Coşkun Et Entegre İşletmesi Müdürü Veli GÖK ve çiftlik sorumlu Veteriner Hekimi Okan BEKTAŞ'a; her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm, pandemi salgını döneminde dahi ailesini ihmal etmeden hem evde hem hastanede özveri ile çalışan değerli eşim Hemşire Türkan YILMAZ'a, hayatımda olmalarının bile yeterli olduğunu düşündüğüm kızlarım Beren ve Ceren'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XII
ÖZET	XV
ABSTRACT	XVI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Manda (<i>Bubalus bubalis</i>)	4
2.2. Anadolu Mandası	7
2.3. Mandaların Üreme ve Fizyolojik Özellikleri	9
2.3.1. Mandalarda Pubertas ve Gelişme	9
2.3.2. Mandalarda Gebelik ve Doğum	10
2.3.3. Mandalarda Östrus ve Yardımcı Üreme Tekniklerinin Kullanımı	11
2.4. Hayvanlarda Embriyo Transferinin Tarihçesi	11
2.5. Embriyo Transferi Teknolojileri	13
2.6. Mandalarda Embriyo Transferi Çalışmaları	15
2.6.1. Mandalardan Oosit Elde Edilmesi	17
2.6.2. Manda Oositlerinin Değerlendirilmesi	18
2.6.3. Manda Oositlerinin <i>In Vitro</i> Maturasyonu	20
2.6.3.1. <i>In Vitro</i> Maturasyona Etki Eden Faktörler	21
2.6.3.1.1. Medyumlar	21
2.6.3.1.2. Hormonlar	22
2.6.3.1.3. Büyüme Faktörleri	22
2.6.3.1.4. Kumulus Hücre Yapıları	23
2.6.3.1.5. Serumlar ve Fizyolojik Sıvılar	23
2.6.3.1.6. Süre	24
2.6.3.1.7. Gazlar	24

2.6.3.1.8. Sıcaklık	25
2.6.3.1.9. Nem	25
2.6.3.1.10. Folikül Büyüklüğü	25
2.6.3.2. Manda Oositlerinde Maturasyon Belirleme Yöntemleri	25
2.6.4. Manda Oositlerinin <i>In Vitro</i> Fertilizasyonu	26
2.6.4.1. <i>In Vitro</i> Fertilizasyon Yöntemleri	27
2.6.4.2. <i>In Vitro</i> Fertilizasyona Uygun Spermatozoon Konsantrasyonu	28
2.6.4.3. Manda Oositlerinin <i>In Vitro</i> Fertilizasyon Süresi	29
2.6.4.4. Manda Oositlerinin <i>In Vitro</i> Fertilizasyon Kriterleri	29
2.6.4.5. Mandalarda Oositlerinin <i>In Vitro</i> Kültürü	30
2.6.5. Mandalarda Embriyo Gelişim Aşamaları	31
2.6.5.1. Morula Aşaması	32
2.6.5.2. Kompakt Morula Aşaması	32
2.6.5.3. Erken Blastosist Aşaması	32
2.6.5.4. Blastosist Aşaması	33
2.6.5.5. Genişlemiş (expanded) Blastosist Aşaması	33
2.6.5.6. Zona serbest (hatched) Blastosist Aşaması	33
2.6.6. Mandalarda Embriyo Kalite Değerlendirilmesi	33
2.6.6.1. Mükemmel Kalite Embriyo (Kod 1 kalite, 1. Kalite)	35
2.6.6.2. İyi Kalite Embriyo (Kod 1 kalite, 2. Kalite)	35
2.6.6.3. Vasat Kalite Embriyo (Kod 2 kalite, 3. Kalite)	35
2.6.6.4. Zayıf Kalite Embriyo (Kod 3 kalite, 4. Kalite)	36
2.6.6.5. Fertilize Olmamış Oosit (UFO) ve Dejenere Embriyo (Kod 4 kalite, 5. Kalite)	36
2.6.7. <i>In Vitro</i> Kültür (IVC) Sistemleri	36
2.6.8. <i>In Vivo</i> Kültür Ortamları	37
2.6.9. <i>In Vitro</i> Ko-Kültür Ortamları	38
2.6.10. <i>In Vitro</i> Kültürde Kullanılan Bazı Maddeler ve Etkileri	38
2.6.11. <i>In Vitro</i> Kültür Ortamını Oluşturan Bileşenler	39
2.6.11.1. Gazlar	39
2.6.11.2. Sıcaklık	40
2.6.11.3. Işık	40
2.6.11.4. pH	41

3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Araç ve Gereçler	42
3.1.1. Laboratuvarda Bulunan Cihazlar	42
3.1.2. Laboratuvar Sarf Malzemeleri	43
3.1.3. Kimyasal Maddeler ve İlaçlar	43
3.2. Ovaryumların Laboratuvara Taşınması	43
3.3. Oositlerin Aspirasyonu, Toplanması ve Değerlendirilmesi	44
3.3.1. Aspirasyon Solüsyonu (D-PBS + %3 FCS) Hazırlanması	44
3.3.2. Oositlerin Aspirasyonu	46
3.3.3. Oositlerin Değerlendirilmesi	47
3.4. <i>In Vitro</i> Maturasyon (IVM)	48
3.4.1. <i>In Vitro</i> Maturasyon Solüsyonunun Hazırlanması	48
3.4.2. Oosit Yıkama ve Maturasyon İşlemi	50
3.5. <i>In Vitro</i> Fertilizasyon (IVF)	52
3.5.1. BO Stok ve BO Ana Solüsyonlarının Hazırlanması	53
3.5.2. <i>In Vitro</i> Fertilizasyon Uygulamasının Yapılışı	55
3.6. <i>In Vitro</i> Kültür (IVC)	59
3.6.1. CR1aa Kültür Medyumunun Hazırlanması	60
3.7. Değerlendirme	61
3.8. İstatistik Analizler	62
4. BULGULAR	63
4.1. Anadolu Mandası Ovaryum Aspirasyon Bulguları	63
4.2. Anadolu Mandası <i>In Vitro</i> Maturasyon Bulguları	65
4.3. Anadolu Mandası <i>In Vitro</i> Fertilizasyon Bulguları	66
4.4. Anadolu Mandası <i>In Vitro</i> Kültür Bulguları	69
4.5. Anadolu Mandası Embriyo Kalite Sınıflandırması	76
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ	83
7. KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Asyada çeşitli manda ırklarına ait morfolojiler (a) Shanghai mandası, bataklık mandası, Çin (b) Toraja Spotted mandası, bataklık mandası, Endonezya (c) Sylhet mandası, bataklık mandası, Bangladeş (d) Akdeniz mandası, nehir mandası (e) Murrah mandası, nehir mandası, Hindistan (f) Nili-Ravi mandası, nehir mandası, Pakistan, (Zyang ve ark. 2020)	5
Şekil 2.2. Mandalarının dünyaya dağılımlarını gösteren harita (Colli ve ark. 2018)	6
Şekil 2.3. Anadolu mandası boğası (Karahisar) (UHAEM 2020)	9
Şekil 2.4. Anadolu mandası anaçları (İDMYB 2015)	9
Şekil 2.5. Dünya sığır embriyosu 1998-2018 yılları arası <i>in vivo</i> üretim, <i>in vitro</i> üretim ve toplam üretim (IETS 2019)	15
Şekil 2.6. Fertilizasyon; a) Kapasitasyonu gerçekleşmiş ve kumulus hücrelerine penetre olmuş spermatozoon, b) Kumulus katmanını geçip zona pelusidaya penetre spermatozoon, c) Zona pelusidayı geçmiş ve perivitellin boşluğata spermatozoon, d) Dişi pronücleusuda genetik materyali ile bir araya gelmiş spermatozoon (Akyol 2005, Karaşahin 2012)	27
Şekil 2.7. Memelilerde embriyo gelişim aşamaları (Kanagawa 1995, Gordon 2003, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015)	31
Şekil 3.1. Laboratuvara getirilmiş Anadolu mandası ovaryumları	44
Şekil 3.2. Ovaryumdan oosit aspirasyonu için gerekli malzemeler	47
Şekil 3.3. Anadolu mandası ovaryumlardan oosit aspirasyonu sonrası TCM-199 solüsyonu içerisinde kalite sınıflandırması yapılmamış oositler (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020)	47
Şekil 3.4. Anadolu mandası oositlerin aspirasyon sonrası yıkama solüsyonu D-PBS ve TCM-199 +%10 FCS maturasyon medyum, T; D-PBS oosit yıkama solüsyonu 35mm petri, Y; TCM-199+%10 FCS maturasyon solüsyonu 35 mm yıkama petrisi, D; TCM-199+%10 FCS droplu 35mm petri, (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015)	48
Şekil 3.5. Yıkama vasatı hazırlanması ve içeriği (Imai 2005, Akyol 2006, Kaymaz 2015)	49
Şekil 3.6. Oosit maturasyon droplarının hazırlanması (Imai 2005, Kaymaz 2015)	50

Şekil 3.7.	Petri kabında oositlerin yıkanması (Kaymaz 2015)	51
Şekil 3.8.	Petride oositlerin yıkanması ve başka bir petriye aktarılması (Kaymaz 2015)	51
Şekil 3.9.	COC'in maturasyon droplarına yerleştirilmesi (Imai 2005)	51
Şekil 3.10.	Anadolu mandası oositlerin fertilizasyonu amacıyla hazırlanan oosit yıkama solüsyonu (OYS), D; OYS droplu 35 mm petri, Y; OYS 35 mm yıkama petrisi (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).....	52
Şekil 3.11.	IVF için kullanılan Anadolu mandası sperması 1 adet 0,25 ml payet (UHAEMM 2020)	55
Şekil 3.12.	Spermanın fertilizasyona hazırlanması 1. ve 2. aşama (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015)	56
Şekil 3.13.	Spermanın fertilizasyona hazırlanması 3. ve 4. aşama (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015)	57
Şekil 3.14.	Spermanın fertilizasyona hazırlanması 5. ve 6. aşama (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015)	58
Şekil 3.15.	Sperma ve oositlerin droplar içine yerleştirilmesi (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015)	59
Şekil 3.16.	Anadolu mandası embriyo kültürü amacıyla hazırlanan kültür medyum, Y; CR1aa 35 mm yıkama petrilere, D; CR1aa droplu 35 mm petrilere (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015)	61
Şekil 3.17.	Anadolu mandası oositleri fertilizasyon bitiminde temizleme işlemi yapılarak CR1aa kültür medyumuna yerleştirilmesi (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015)	61
Şekil 4.1.	Anadolu mandasından elde edilen oositler D-PBS içerisinde her harf simgelediği kalite sınıflandırmasını ifade etmekte, D dejenere oositleri ifade etmektedir (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020)	63
Şekil 4.2.	Anadolu mandası oositleri, TCM-199 solüsyonunda maturasyon için hazırlanmış farklı kalitede oositler (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020)	64
Şekil 4.3.	Maturasyon periyodu sonu Anadolu mandası oositleri (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020)	65
Şekil 4.4.	OYS drop içerisinde CO2 İnkübatörde 2 saat süreyle bekletilmiş fertilizasyona hazır Anadolu mandası spermatozoonları (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020)	66
Şekil 4.5.	Fertilizasyon dropları içerisinde spermatozoonlar ve oositler. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X50, UHAEM, Ankara, 2020)	67
Şekil 4.6.	Fertilizasyon gerçekleşmiş bir oosit ve çift polar cisim (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020)	68

Şekil 4.7.	Fertilize oositler (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X100, UHAEM, Ankara, 2020)	68
Şekil 4.8.	<i>In vitro</i> kültür 24. saat bölünme sürecinde tespit edilmiş manda zigotu (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020)	70
Şekil 4.9.	Anadolu mandasından <i>in vitro</i> kültür 24. saat ilk bölünme sürecini tamamladığı tespit edilmiş zigot, Oklar; Zona Pelusida'ya penetre olmuş spermatozoon kalıntıları (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020)	70
Şekil 4.10.	Anadolu mandasından <i>in vitro</i> kültür 24. saat bölünme tespit edilmiş dört hücreli bir embriyo (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020)	71
Şekil 4.11.	<i>In vitro</i> kültür 24. saat bölünmeler (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020)	71
Şekil 4.12.	<i>In vitro</i> kültür 96. saat (4. gün) morula, kompakt morula görüntüleri (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020)	72
Şekil 4.13.	Anadolu mandasında <i>in vitro</i> kültür 7. gün farklı kalitelerde blastosist görüntüleri (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020)	73
Şekil 4.14.	Anadolu mandasında <i>in vitro</i> kültür 8.-10. gün hatching blastosist görüntüsü (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X100, UHAEM, Ankara, 2020)	75
Şekil 4.15.	Anadolu mandası <i>in vitro</i> kültür 8.-10. gün hatching ve hatched blastosist bir arada görüntü (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X100, UHAEM, Ankara, 2020)	75
Şekil 4.16.	<i>In vitro</i> kültür 7. gün mükemmel ve iyi kalitede blastosist görüntüleri (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X100, UHAEM, Ankara, 2020)	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Dünya genelinde yetiştiriciliğin yoğunlukta olduğu ülkelerde manda sayıları (Baş), son 60 yıl (FAO 2020)	2
Çizelge 2.1. Manda ırklarına ait genel gruplandırma (Atasever ve Erdem 2008) ...	4
Çizelge 2.2. Türkiye geneli ve en yüksek 20 ile ait 2017 yılı manda sayıları (TÜİK, 2020)	8
Çizelge 2.3. Memelilerde embriyo transferi çalışmalarında önemli gelişmeler (Gordon 2003, Hufana-Duran 2008, Karaşahin 2012)	12
Çizelge 2.4. Oosit kalitesinin bütün morfolojik yapılarına göre rakamlarla yapılan sınıflandırma (Gasparrini 2002, Gordon 2003, Akyol 2006, Kaymaz 2015)	19
Çizelge 2.5. Oosit kalitesinin COC morfolojisine göre sınıflandırılması (Kanagawa ve ark. 1995, Raghu ve ark. 2002a, Gordon 2003, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015)	20
Çizelge 2.6. Kültür ortamında manda oositlerinin gelişme aşamaları (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002)	32
Çizelge 3.1. Ovaryum taşıma solüsyonu	44
Çizelge 3.2. Oosit aspirasyonu, yıkanması ve değerlendirmesi için hazırlanan D-PBS solüsyonunun (Imai 2005, Akyol 2006, Kaymaz 2015)	45
Çizelge 3.3. Ovaryumdan oosit aspirasyonu ve oositlerin yıkamak için hazırlanacak solüsyon (Imai 2005, Akyol 2006, Kaymaz 2015)	45
Çizelge 3.4. <i>In vitro</i> maturasyon medyumunun içeriği (Akyol 2006, Gasparrini ve ark. 2006, Kumar ve Anand 2012, Lemuel ve ark. 2015)	49
Çizelge 3.5. BO stok A solüsyonu (Bracket ve Oliphant 1975)	53
Çizelge 3.6. BO stok B solüsyonun (Bracket ve Oliphant 1975)	53
Çizelge 3.7. BO ana solüsyonu (Bracket ve Oliphant 1975)	53
Çizelge 3.8. Oosit yıkama solüsyonu (OYS) (Bracket ve Oliphant 1975)	54
Çizelge 3.9. Sperma dilisyon solüsyonu (SDS) (Bracket ve Oliphant 1975)	54

Çizelge 3.10. Sperma yıkama solüsyonu (SYS) (Bracket ve Oliphant 1975)	54
Çizelge 3.11. CR stok A solüsyonunun hazırlanması (Rosenkrans ve ark. 1990)	60
Çizelge 3.12. CR stok B solüsyonunun hazırlanması (Rosenkrans ve ark. 1990)	60
Çizelge 3.13. CR1aa ana solüsyonunun hazırlanması (Rosenkrans ve ark. 1990)	60
Çizelge 4.1. Anadolu mandasından elde edilen ovaryum ve oositler	64
Çizelge 4.2. Anadolu mandası oositlerinde <i>in vitro</i> maturasyon sonuçları	65
Çizelge 4.3. Anadolu mandası <i>in vitro</i> fertilizasyon bulguları	67
Çizelge 4.4. Anadolu mandası <i>in vitro</i> kültür 24. saat bulguları	69
Çizelge 4.5. Anadolu mandası <i>in vitro</i> kültür 96. saat (4. gün) bulguları	72
Çizelge 4.6. Anadolu mandası <i>in vitro</i> kültür 7. gün bulguları	73
Çizelge 4.7. Anadolu mandası <i>in vitro</i> kültür 8.-10. gün hatched blastosist bulguları	74
Çizelge 4.8. Anadolu mandası <i>in vitro</i> kültür 7. gün embriyolarda kalite sınıflandırılması	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
ark.	: Arkadaşları
BSA	: Sığır serum albumini
BLUP	: En iyi doğrusal bağımsız tahmin
BME	: Beta-merkaptoetanol
BO	: Brackett ve Oliphant Solüsyonu
CaCl₂	: Kalsiyum klorit
CaCl₂2H₂O	: Kalsiyum klorit dihidrat
CR1aa	: Charles Rosenkrans 1 amino asitli medyum
CR2aa	: Charles Rosenkrans 2 amino asitli medyum
CM	: Kompakt morula
CO₂	: Karbondioksit
COC	: Kumulus oosit kompleks
CZB	: Chatot Ziomek Bavister
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
D-PBS	: Dulbecco fosfat tampon solüsyonu
E2	: estradiol-17 β
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ET	: Embriyo transferi
FCS	: Fötal buzağı serumu
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
G	: Gauge
HEPES	: N-2-hidroksietil-piperazin-n'-2-etano sülfonik asit
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IETS	: Uluslararası Embriyo Teknolojisi Derneği
IGF	: İnsulin büyüme faktörü

ILGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-I
ICM	: İç hücre kütlesi
IU	: International unit
IVC	: <i>In vitro</i> kültür
IVF	: <i>In vitro</i> fertilizasyon
IVM	: <i>In vitro</i> maturasyon
IVP	: <i>In vitro</i> üretim
İDMYB	: İstanbul Damızlık Manda Yetiştiricileri Birliği
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyum fosfat monobazik
KSOM	: Kohonen self-organizing map
LH	: Luteinleştirici hormon
LOPU	: Laparoscopic ovum pick up
MEM	: Minimum essential medium
MgCl₂6H₂O	: Magnezyum klorit hekzahidrat
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MOET	: Multiple ovulation embryo transfer
MÖ	: Milattan önce
mRPMI	: Modifiye roswell park memorial institute
mSOF	: Modifiye sentetik ovidukt sıvısı
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
N	: Azot
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
Na₂HPO₄	: Sodyum fosfat dibazik
NaH₂PO₄2H₂O	: Sodyum fosfat monobazik dihidrat
SDS	: Sperm dilüsyon solüsyonu
SOF	: Sentetik ovidukt sıvısı
SYS	: Sperm yıkama solüsyonu

ST	: Suni tohumlama
O₂	: Oksijen
OPU	: Ovum pick up
OYS	: Oosit yıkama solüsyonu
pH	: Hidrojen iyonu yoğunluğu
PMSG	: Gebe kısrak serum gonadotropini
TAGEM	: Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
TALP	: Tirodin albümin laktat piruvat
TCM-199	: Doku kültür medyumuna 199
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UHAEM	: Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi
UFO	: Unfertilize ova
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromol

ÖZET

Anadolu Mandasının *In Vitro* Embriyo Gelişim ve Üretim Parametrelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, Anadolu mandası oositlerinden *in vitro* koşullarda embriyo gelişimi ve üretim parametrelerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla ovaryum başına elde edilen oosit miktarı, oositlerin kalite sınıflandırılma oranları, oositlerin maturasyon oranı, oositlerin fertilizasyon oranı, kültür ortamında bölünme oranları, blastosiste erişme oranları hatched blastosist erişme oranları ve embriyo kalite oranları belirlendi. Bu amaçla, materyal olarak Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğüne yakın il mezbahalarında (Afyonkarahisar, Çorum) kesilen Anadolu mandalarına ait ovaryumlar kullanıldı. Çalışmanın bütün prosedürleri yaygın kabul görmüş standart *in vitro* fertilizasyon (IVF) protokollerinden oluştu. Ovaryumlardan oositler aspirasyon yöntemiyle elde edildi. Bu oositlerin maturasyonunda TCM-199 + %10 FCS, fertilizasyonunda BO (Bracket & Oliphant) medyumu ile direk yıkama metodu, kültüründe CR1aa (Charles Rosencrans 1 Aminoasit) medyumu kullanıldı. Çalışma 2019 ve 2020 yıllarında 6 replikasyon halinde gerçekleştirilen çalışmada 92 baş Anadolu mandasına ait 184 adet ovaryum kullanıldı. Ovaryumlardan toplam 395 adet oosit aspire edildi. Oositlerin 334 tanesi A-B kalite olarak değerlendirildi. Maturasyona alınan A-B kalite 334 adet oositten 329 adedinin mature olduğu kabul edildi. Maturasyonu yapılan 329 adet oositten 308 adedinin fertilizasyonu gerçekleştirdi ve tamamı CR1aa kültürüne alındı. Embriyo kültüründe 24. saatte bölünme sayısı 93/308 oranı %30,19 oldu. Anadolu mandası embriyolarının CR1aa kültüründe 96. saatte, morula sayıları 53/308, oranı ise %17,21 olarak gerçekleşti. Anadolu mandası embriyoları CR1aa kültürde 7. günde blastosist sayısı 29/308 ve oranı %9,42 oldu. Anadolu mandası embriyoları CR1aa kültüründe 8.-9. günlerde hatching ve hatched blastosist sayısı 12/308 ve oranı ise %3,89 oldu. Anadolu mandası embriyoları CR1aa kültürüne alınışından itibaren 7. günde stereo mikroskopla yapılan kontrolde 29 adet blastosistten transfer edilebilir kalitede (1. ve 2. Kalite) embriyo sayısı 16 adet oranı %55,17, vasat ve zayıf kalitede 13 adet embriyo, bunların oranı ise %44,74 oldu. Bu çalışma ile Anadolu mandası üzerine yapılacak *in vitro* fertilizasyon ve embriyo üretim çalışmalarına öncülük edilmeye çalışıldı. Çalışma ile Anadolu mandasında ilk defa *in vitro* embriyo gelişim ve kalite parametreleri hakkında bilgiler verildi. Anadolu mandasının *in vitro* embriyo üretim potansiyelini ortaya konularak, gelecekte yapılacak çalışmalara bir alt yapı oluşturuldu.

Anahtar Kelimeler: Anadolu mandası, embriyo, oosit maturasyonu, *in vitro* fertilizasyon, embriyo gelişimi.

ABSTRACT

Determination of *In Vitro* Embryo Development and Production Parameters of Anatolian Water Buffaloes

In this study, it was aimed to determine embryo development and production parameters from Anatolian buffalo oocytes under *in vitro* conditions. For this purpose, the amount of oocytes obtained per ovary, the quality classification rates of oocytes, the maturation rate of oocytes, the fertilization rate of oocytes, the cleavage rates in culture medium, the blastocyst accession rates, hatched blastocyst rates and embryo quality rates were determined. For this purpose, ovaries belonging to Anatolian water buffaloes slaughtered in the provincial slaughterhouses (Afyonkarahisar, Çorum) close to International Center For Livestock Research and Training Directorate were used as material. All procedures of the study were created from widely accepted standard *in vitro* fertilization (IVF) protocols. Oocytes were obtained from the ovaries by aspiration method. TCM-199 + 10% FCS was used for maturation of these oocytes, direct washing method with BO (Bracket & Oliphant) medium for fertilization, CR1aa (Charles Rosencrans 1 Amino Acid) medium was used for culture. The study was carried out in 6 replications in 2019 and 2020. In the study, 184 ovaries belonging to 92 Anatolian water buffaloes were used. A total of 395 oocytes were aspirated from the ovaries. 334 of the oocytes were evaluated as A-B quality. Of the 334 A-B quality oocytes taken for maturation, 329 were considered to be mature. Fertilization was performed in 308 of 329 matured oocytes and all of them were cultured as CR1aa. The number of cleavage at 24 hours in embryo culture was 93/308, and the cleavage rate was 30.19%. In the CR1aa culture of Anatolian Water Buffalo embryos, the morula count was 53/308 and the rate was 17.21% at the 96th hour. The blastocyst count was 29/308 and the rate was 9.42% on the 7th day in Anatolian Water Buffalo embryos CR1aa culture. The number of Hacking and Hacked Blastocysts in the CR1aa culture of Anatolian Water Buffalo embryos was 12/308 and the rate was 3.89% on the 8th-9th days. In the CR1aa culture of Anatolian water buffaloes embryos, the rate of transferable quality (1st and 2nd quality) embryos from 29 blastocysts was 16 (55.17%), 13 of poor and weak quality embryos, and their ratio was 44.74%, in the control performed with a stereo microscope on the 7th day. With this study, it was tried to precursor *in vitro* fertilization and embryo production studies on Anatolian Water Buffaloes. With this study, information about *in vitro* embryo development and quality parameters in Anatolian Water Buffaloes was given for the first time. By revealing the *in vitro* embryo production potential of the Anatolian Water Buffaloes, an infrastructure was created for future studies.

Keywords: Anatolian Water Buffaloes, embryo, oocyte maturation, *in vitro* fertilization, embryo development.

1. GİRİŞ

Dünya nüfusuyla beraber artan hayvansal protein ihtiyacı nedeniyle hayvansal gıda üretim sektöründe tercihler ve stratejilerde önemli değişiklikler olmaktadır. Bu hayvansal gıda kaynaklarından biri olan manda, birçok ülkede geleceğin çiftlik hayvanı olarak görülmektedir (Soysal ve ark. 2005, Borghese 2010, Perera 2011, Uğurlu 2017). Yerkürede Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere Kanada, İngiltere, Almanya, Belçika, Hollanda ve Japonya gibi gelişmiş ülkelerde eti ile sütünün besleyici değerinin yüksek olması, kolesterol düzeyinin düşüklüğü, organik yetiştirmeye elverişli olması ve ürünlerinin insanlarda birçok hastalığa karşı tavsiye edilir hale gelmesi nedeniyle manda yetiştiriciliğine başlandığı bildirilmiştir (Moioli 2005, Borghese 2010, FAO 2020).

Birçok ülkede manda yetiştiriciliği yapılmakla birlikte, evcil mandaların yoğun olarak Asya'da (Hindistan, Çin, Pakistan Endonezya, Filipinler) bulunduğu belirtilmektedir. Dünyada toplam manda sayısının yaklaşık olarak 200 milyon kadar olduğu, bunun %95,8'inin Asya'da bulunduğu ve sayının yıllar itibarıyla sürekli yükseldiği görülmektedir. Mandalar et, süt ve gücünden faydalanılan bir çiftlik hayvanı olarak özellikle Asya'da büyük bir ekonomik etkinliğe sahiptir (FAO 2020). Mandalar dünyanın birçok bölgesinde bulundukları coğrafyaya ait ekonomik önem taşıyan türlerdir ve özellikle Güney ve Güney Doğu Asya'nın kırsal ekonomisinde lokal üretimin önemli kısmını oluştururlar (Gasparrini ve Tyagi 2007).

Özetle, mandalar kendine has hayvansal ürünler (et, süt, kaymak vs.), çoğu hastalıklara dirençli olmaları, güçlerinden faydalanılması, kalitesiz kaba yemleri yüksek oranda değerlendirebilmeleri, bakım besleme ve idari giderlerinin sığırlara göre düşük düzeylerde olması gibi sebeplerden dolayı geçmişten günümüze fakir çiftçiler için uygun çiftlik hayvanı olarak kabul edilmiştir (Şahin ve Küçükkebabçı 1999, Atasever ve Erdem 2008, FAO 2020). Dünya genelinde ve yetiştiriciliğin yoğunlukta olduğu ülkelerde 1960 yılından günümüze manda sayıları aşağıda çizelge 1.1.'de verilmiştir (FAO 2020).

Çizelge 1.1. Dünya genelinde yetiştiriciliğin yoğunlukta olduğu ülkelerde manda sayıları (Baş), son 60 yıl (FAO 2020).

Ülkeler	1961	1970	1980	1990	2000	2010	2018
Hindistan	51.207.900	56.118.000	66.070.000	80.570.000	93.831.000	111.300.000	114.151.707
Çin	8.369.516	15.713.063	18.439.744	21.421.967	22.595.017	23.602.144	27.116.250
Pakistan	6.700.000	9.345.000	11.547.000	17.373.000	22.669.000	30.800.000	38.848.000
Tayland	4.963.580	5.734.500	5.650.790	5.094.270	1.711.570	1.622.650	1.258.272
Filipinler	3.452.000	4.431.500	2.870.270	2.764.950	3.024.400	3.270.400	2.882.655
Endonezya	2.893.280	2.885.000	2.457.000	3.335.080	2.405.280	2.005.000	894.278
Vietnam	2.252.000	2.270.700	2.313.000	2.854.100	2.897.200	2.913.390	2.425.105
Mısır	1.501.000	2.009.000	2.346.580	2.897.470	3.379.410	4.000.000	3.506.061
Türkiye	1.140.000	1.178.000	1.040.000	429.000	165.000	87.207	161.436
Myanmar	1.048.520	1.540.720	1.901.000	2.061.000	2.441.240	3.000.000	3.790.031
Nepal	795.000	1.020.000	2.500.000	3.012.570	3.525.950	4.836.980	5.277.819
Bangladeş	500.000	835.000	475.000	772.000	890.000	1.349.000	1.485.000
Laos	420.000	770.000	862.300	1.071.760	1.028.000	1.200.000	1.200.040
Brezilya	63.000	118.000	495.000	1.397.100	1.102.550	1.184.510	1.390.066
İtalya	18.000	48.600	88.900	112.400	182.000	344.000	401.337
Dünya	83.529.592	102.247.255	117.137.305	143.854.580	160.611.854	191.084.505	206.600.676

Dünyanın artan nüfusu ile beraber artan gıda ihtiyacını karşılamak için çoğu hayvansal protein üretim kolunda yardımcı üreme tekniklerinden faydalanılmaktadır. Hayvancılıkta, özellikle büyükbaş hayvancılık özelinde manda yetiştiriciliğinde üreme performansının zayıf olması nedeniyle yardımcı üreme teknikleri kullanılır (Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020). Bu sayede mandalarda kalıtsal üreme sorunlarının çözümü sağlanabilmektedir. Ayrıca nesli çoğu bölgede nesli tehlikede olan bu hayvanların reproduktif hücresel kaynaklarının yok olması önlenabilmekte ve doğal koşullarda hayvandan elde edilebilecek yavru sayısı bu teknikler sayesinde arttırılmaktadır (Palta ve Chauhan 1998, Gasparrini 2002, Baruselli ve ark. 2020).

Hayvancılık alanında üstün genetik yeteneğe sahip ırkların elde edilmesinde ve hastalıkların yayılmasına engel olunmasında Suni Tohumlama (ST) ve Embriyo Transferi (ET) teknolojilerinin önemli bir payı vardır (Akyol 2006, Sağırkaya 2009, Karaşahin 2017). Bu yardımcı üreme tekniklerinden biri olan ET, istenen genetik kaynağın daha hızlı çoğalması için kanıtlanmış bir enstürman olarak sığır yetiştirmede yaygın biçimde kullanılmakta ve mandalar için de uygulanabilir olarak kabul edilmektedir (Hufana-Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020,

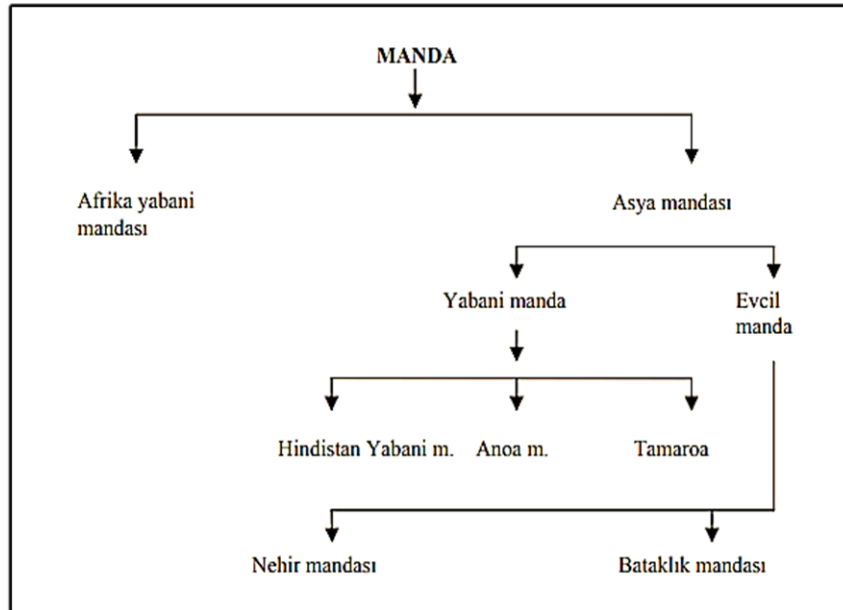
Kumar ve ark. 2020). Bir donör hayvandan alınan (*in vivo*) veya laboratuvar ortamında (*in vitro*) olgunlaştırılan embriyoların taşıyıcı bir hayvanın uterusuna nakledilmesi süreci, ET olarak tanımlanmıştır (Machaty ve ark. 2012, Sağırkaya 2009, Karaşahin 2017). Genel olarak ET tekniğinin en büyük avantajı yüksek genetik kapasiteye sahip hayvanlardan bir yılda birçok yavru elde edilmesini sağlamaktır. Genel olarak kabul edilen, ST kullanılarak her generasyonda erkek gametler sayesinde sağlanan %50 genetik ilerlemenin, ET teknolojisi kullanılarak %100 hale getirilebilmesi mümkündür (Mapletoft ve Hasler 2005, Sağırkaya 2009, Karaşahin 2017). Bu özelliklerinden dolayı, yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalan ırkların uzun yıllar korunması amacıyla gen bankaları oluşturulmuş, spermalar ve embriyolar bu bankalarda saklanmaya başlanmıştır (Medeiros ve ark. 2002, Bailey ve ark. 2000). Ülkemiz şartları düşünüldüğünde ST ile verim kabiliyeti yüksek (et-süt) ırkların elde edilmesi için gereken 15 yıla yakın bir süreyi ET teknolojisi 2-3 yıl gibi kısa bir süreye indirebilmektedir (Givens ve Marley 2008, Mapletoft ve Hasler 2005, Sağırkaya 2009, Karaşahin 2017).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Manda (*Bubalus bubalis*)

Mandalar (*Bubalus bubalis*) zoolojik olarak, ruminantlar familyasına ait Bubalina grubunda sınıflandırılmıştır. İsimleri aynı olmasına rağmen Amerikan buffalosunu (*Bison bison*) ve Afrika buffalosundan (*Syncerus caffer caffer*) ayır edilebilmesi için suyu çok sevmeleri sebebiyle su mandaları (*water buffalo*) olarak adlandırılmışlardır. Su mandaları da, nehir mandaları (*River buffalo*) ve bataklık mandaları (*Swamp buffalo*) olarak iki gruba ayrılır (Mason 1974). Kromozom sayıları farklı olan bu iki gruptan mandadan; nehir mandalarında kromozom sayısının 50, bataklık mandalarında ise 48 olduğu bildirilmiştir (Jindal ve ark. 1980, Şekerden 2001, Özbeyaz 2015). Bataklık mandaları için sadece tek ırktan bahsedilirken, nehir mandaları grubunda Akdeniz, Jafarabadi, Kündi, Murrah, Meksana, Nagpuri, Nilli-Ravi, Surti, Pandharpuri gibi birçok farklı ırk mevcuttur (Moioli ve Borghese 2008). Manda ırklarına ait genel gruplandırma şekil 2.1.'de, farklı manda ırklarına ait görüntüler ise çizelge 2.1.'de detaylı bir şekilde gösterilmiştir (Atasever ve Erdem 2008).

Çizelge 2.1. Manda ırklarına ait genel gruplandırma (Atasever ve Erdem 2008).

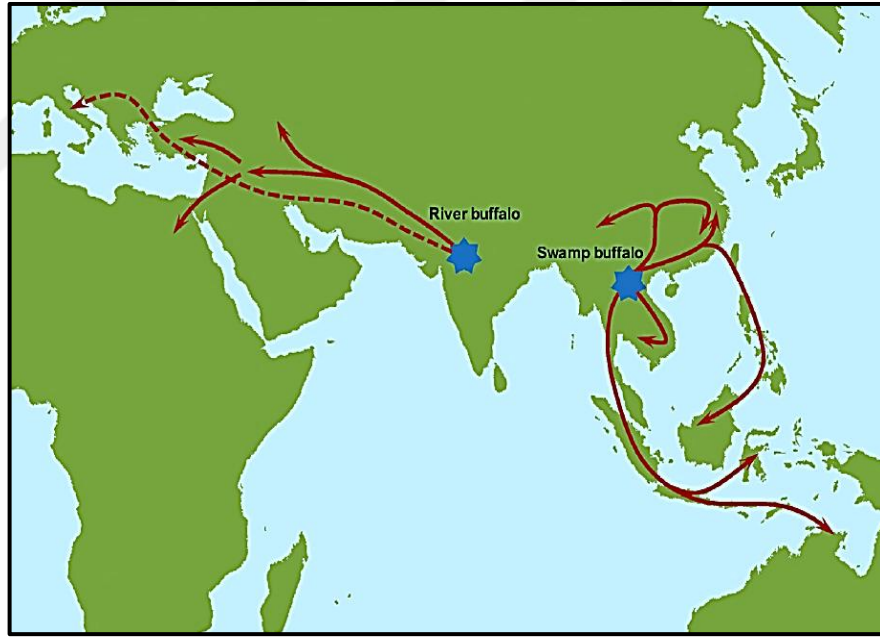




Şekil 2.1. Asyada çeşitli manda ırklarına ait morfolojiler (a) Shanghai mandası, bataklık mandası, Çin (b) Toraja Spotted mandası, bataklık mandası, Endonezya (c) Sylhet mandası, bataklık mandası, Bangladeş (d) Akdeniz mandası, nehir mandası (e) Murrah mandası, nehir mandası, Hindistan (f) Nili-Ravi mandası, nehir mandası, Pakistan, (Zyang ve ark. 2020).

Mandalarda evcilleştirmenin milattan önce (M.Ö.) yaklaşık 5000 yıllarında başladığı bildirilmektedir (Nanda ve Nakao 2003, Soysal 2009, Zhang ve ark. 2020). Arkeoloji ve tarım tarihi bulguları mandaların Hindistan'ının İndus bölgesinde M.Ö. yaklaşık 2500 yıllarında evcilleştirilmiş olduğunu göstermiştir. Günümüzde Pakistan ve Hindistan'da yetiştiriciliği yoğun olarak yapılan mandaların atasının bu bölgeden köken aldığı

bildirilmiştir (Chantalakhana ve Falvey 1999). İndus bölgesinden dünyaya mandanın ilk olarak milattan sonra ilk yüzyılda Arap tüccarlar tarafından “*Tarin*” adıyla Anadolu ve Ortadoğu bölgesine getirildikleri bildirilmiştir. Mandanın, Anadolu ve Ortadoğu’dan Avrupa’ya orta çağda Hristiyan hacılar tarafından veya haclı seferi sürecinde eve dönen haclıların, hem yük hayvanı hem de besin kaynağı olarak kullanmak amacıyla götürdüğü bildirilmiştir. Avrupa’da evcil manda popülasyonu İtalya, Bulgaristan, Macaristan, Romanya ve diğer Balkan ülkelerinde halen mevcuttur (Şekerden 2001, Nanda ve Nakao 2003, Moioli ve Borghese, 2008, Soysal 2009, Özbeyaz 2015). Hem bataklık mandalarının (*Swamp buffalo*) hem de nehir mandalarının (*River buffalo*) dünyaya dağılımlarını gösteren harita şekil 2.2.’de gösterilmektedir (Colli ve ark. 2018). Bu haritada kesikli oklar nehir mandalarının (*River buffalo*) Anadolu’ya ve Ortadoğu’ya oradan da Avrupa’ya götürülmesinin tahmini yolunu, düz oklar ise diğer mandaların hareket yollarını göstermektedir (Zhank ve ark. 2020).



Şekil 2.2. Mandalarının dünyaya dağılımlarını gösteren harita (Colli ve ark. 2018).

Nehir mandası (*River buffalo*) ırklarının en fazla alt gurubu yaklaşık 25 adetle Hindistan’da bulunmaktadır (Perera 2011, FAO 2020). Çoğunlukla gücünden ve etinden faydalanan Bataklık manda ırkları (*Swamp buffalo*) yine Hindistan, Filipinler, Çin, Endonezya gibi Güneydoğu Asya ülkelerinde yetiştirilir (Perera 2011). Manda yetiştiriciliği

Güney Amerika, Kenya ve Güney Afrika ülkelerinde dışarıdan manda ithal edilerek başlandığı bilinmektedir. Güney Afrika'da Afrika yabani mandasının (*Syncerus caffer caffer*, *Syncerus caffer nanus*, *Syncerus caffer equinoctialis*) evcilleştirilerek yetiştirilmesi için çalışmalar hala yapılmaktadır (Atasever ve Erdem 2008, Uğurlu 2017).

2.2. Anadolu Mandası

Anadolu'da manda varlığının milattan önce (MÖ) 3000 yıllara kadar dayandığı bilinmektedir. Fakat Anadolu'ya evcilleşmiş mandaların Anadolu'ya çok sonradan getirildiği düşünülmektedir. Günümüzde Anadolu mandası adı verilen ülkemize özgü bir ırk bulunmakta olup, Akdeniz mandalarından ayrı veya küçük yapılı bir alt gurubu oldukları kabul edilmektedir (Şahin ve Küçükkebabçı 1999, Uğurlu 2017, Yılmaz ve Kara 2019). Ülkemizde bulunan mandalar, nehir mandasının bir alt gurubu Akdeniz mandasına genetik olarak yakın ama ondan daha küçük cüsselidir. Bu nedenle Anadolu mandası olarak adlandırılmaktadır (Soysal 2013). Anadolu mandası; Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından 2004 yılı itibariyle ırk tescili yaptırılmış ve tanımlanmıştır (Yılmaz ve Kara 2019).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin 2020 verilerine göre Türkiye manda varlığı 188.771 baştır. Anadolu'da 1980'lerde bir milyondan fazla olan manda sayısının 2007 yılında 85.000 başa (TÜİK 2020) düştüğü görülmüştür. Ülkemiz manda varlığı bir milyon başın üzerinden 100.000 başın altına keskin düşüş son derece kaygı verici bulunmuş ve Anadolu mandası'nın yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmasına yol açmıştır (Sarıözkan 2011, Yılmaz ve Kara 2019). Ülkemizde manda; Karadeniz, Marmara ve İç Anadolu bölgelerinde yoğun, diğer bölgelerde ise az sayıda yetiştiriciliği yapılan bir çiftlik hayvanıdır. Manda sayısı en fazla olan iller sırasıyla Samsun, Diyarbakır, İstanbul, Tokat, Bitlis, Muş, Afyon, Kayseri, Sivas ve Amasya'dır. Türkiye'de 1980 yıllarda bir milyon manda varlığı varken, 2007 yılında 85.000 bine kadar düşmüş, 2008 yılında 86.297 adet anaç Anadolu mandası bulunmaktaydı (TÜİK 2020, Cruz 2010). Son 10 yıl içinde Anadolu mandası yetiştiriciliğinde devlet teşviklerinin uygulanmasıyla birlikte varlığı 2015 yılında 143.073 baş olmuştur (Ermetin 2017, Aköz ve ark. 2017). Ülkemizde 2018 yılı itibari ile toplam manda sayısı 178.397 baş olarak, son veri ise 2020 Haziran ayı itibariyle 188.771

olarak kayıt altına alınmıştır. Türkiye geneli ve en yüksek 20 ile ait 2017 yılı manda sayıları çizelge 2.2.'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir (TÜİK 2020).

Çizelge 2.2. Türkiye geneli ve en yüksek 20 ile ait 2017 yılı manda sayıları (TÜİK 2020).

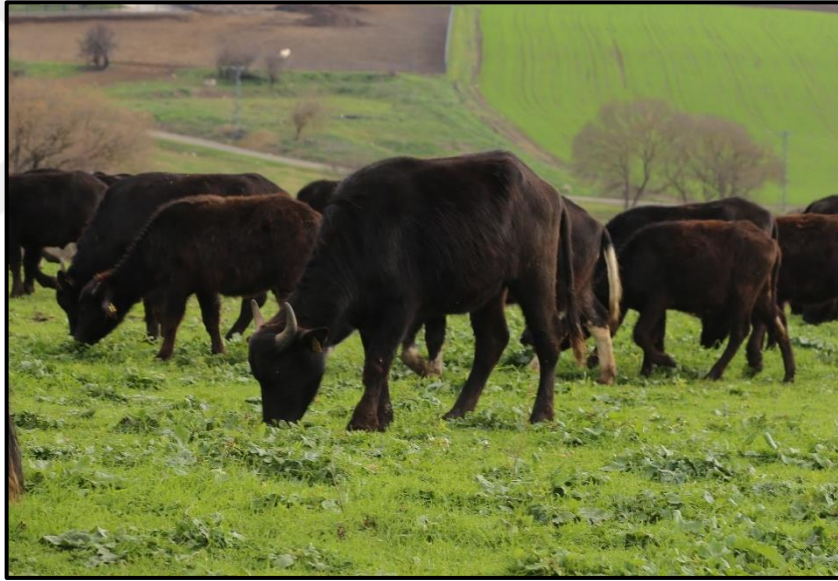
İL	Ergin Manda Sayısı (Baş)	Malak Sayısı (Baş)	Toplam Manda sayısı (Baş)
Samsun	13.904	4.040	17.944
Diyarbakır	10.805	2.360	13.165
İstanbul	8.935	2.165	11.100
Tokat	6.714	2.380	9.094
Bitlis	7.211	1.127	8.338
Muş	5.435	2.000	7.435
Afyonkarahisar	4.290	1.308	5.598
Kayseri	4.222	1.241	5.463
Sivas	4.008	917	4.925
Amasya	3.115	1121	4.236
Balıkesir	3.234	460	3.694
Giresun	2.543	784	3.327
Kütahya	2.453	726	3.179
Düzce	2.306	793	3.099
Bartın	2.000	898	2.898
Çorum	2.138	635	2.773
Yozgat	2.092	511	2.603
Kocaeli	1.629	455	2.084
Iğdır	1.458	440	1.898
Erzincan	1.196	599	1.795
Türkiye Geneli	110.700	31.373	142.073

Anadolu'da yaygın olan manda yetiştirme biçimi çoğunlukla aile işletmeleri şeklinde, aile tüketimi için ve genellikle ortalama 1-5 baş arası anaçtan oluşur. Kapalı ahır besisi için oluşturulan sürülerde 50-100 başlık büyüklüğe ulaşabilir. Geleneksel olarak küçük işletmelerde sadece bataklık, sazlık veya nehir kenarlarında manda yetiştiriciliği yapılırken, günümüzde yüksek sayılarda ve modern işletmelerde de manda yetiştiriciliği yapılmaktadır (Ermetin 2017, Aköz ve ark. 2017, Yılmaz ve Kara 2019).

Anadolu mandası'nın fenotip olarak; genelde rengi siyah, yay boynuz denilen geriye kavisli biçimde boynuzludur (Ermetin 2017, Aköz ve ark. 2017). Anadolu manda boğası ve anaçlarına ait resimler Şekil 2.3. ve Şekil 2.4.'de verilmiştir (UHAEM 2020, Yavuz 2020).



Şekil 2.3. Anadolu mandası boğası (Karahisar) (UHAEM 2020).



Şekil 2.4. Anadolu mandası anaçları (İDMYB 2015).

2.3. Mandaların Üreme ve Fizyolojik Özellikleri

2.3.1. Mandalarda Pubertas ve Gelişme

Mandalarda reproduktif verimlilik birçok değişkenden etkilenir. Bunlar arasında hem erkek ve hem de dişi bireylerde geç olgunlaşma ve doğal çiftleşmeden sonra gebelik oluşma

oranının az olmasıdır (Bodhipaksha ve ark. 1978, Chantarakhana ve ark. 1981, Fischer ve Bodhipaksha 1992, Na-Chiangmai 2002). Gelişmenin 5-6 yaşa kadar devam ettiği bildirilmiştir. Doğal yaşamda ömürleri yaklaşık olarak 30 yıl kadardır. Mandalarda genelde pubertasa ulaşma yaşı sığırdan daha uzun sürmektedir. Bu sebepten dolayı bir yaşına kadar erkek ve dişi mandalar beraber barınabilmekte ve merada bulunabilmektedir. Manda düveleri 13-14 aylıkken pubertaya ulaşırlar (Fischer ve Bodhipaksha 1992, Na-Chiangmai 2002, Atasever ve Erdem 2008, Şahin ve ark. 2013, Özbeyaz 2015).

Sığırlarda uygulandığı gibi manda düveleri ergin canlı ağırlıklarının %75'ine ulaştığında istenildiği takdirde tohumlanabilir. Ancak mandalarda erken yaştaki gebeliklerde beslenme sorunları sonucu gelişme geriliği ve düşük süt verimi riski bulunmaktadır. Erkek mandalar 2 yaştan sonra manda boğası olarak 5-6 yaşa kadar kullanılabilirler. Manda boğalarının damızlıkta kullanılabilme yaşı 2-15 yıldır (Aksoy ve Tekeli 1993, Özbeyaz 2015, Uğurlu 2017).

2.3.2. Mandalarda Gebelik ve Doğum

Mandaların ilk buzağılama yaşı 3,6 ile 4,9 arasında değişmekte, ortalama yaş $4,2 \pm 0,8$ olarak bildirilmektedir. Ortalama buzağılama aralığı ise 490 ila 700 gün arasında değişmekle beraber, genel olarak ortalama $573,3 \pm 117$ günlük ortalama buzağılama aralığı bulunmaktadır (Na-Chiangmai 2002). Mandaların süttten kesme yaşı, buzağılamadan yaklaşık 8 ay sonradır. Mandalarda, sığıra göre uzun buzağılama aralığı ve 8 aylık süttten kesim yaşı üreme verimliliğini etkileyen önemli faktörlerdir (Chantarakhana ve ark. 1981, Aksoy ve Tekeli 1993, Atasever ve Erdem 2008, Uğurlu 2017).

Genel olarak bütün manda ırkları göz önüne alındığında gebelik süreleri birçok faktöre göre 300-345 gün arasında değişir. Bu süre ortalama olarak 315-320 gündür. Mandalarda doğum sığırlara göre daha kolay ve daha kısa sürede gerçekleşir. Bunda manda pelvik kanalın geriye doğru düşük ve sığıra göre biraz geniş olması etkilidir. Mandalarda doğumun gerçekleşmesi plasentanın atılması dahil ortalama 4-5 saat sürmektedir. Sığırdan ise bu süre ortalama 8-9 saattir. Manda plasentası 3-3,5 kg ağırlığındadır. Doğumdan sonra uterusun involüsyonu için gereken süre 15-67 gün ya da ortalama olarak 40 ± 2 gün kadardır. İkiz doğum mandada çok nadir görülür. Manda yetiştiriciliğinde ikizlik genelde yavru atmayla sonuçlanma olasılığı yüksek olması nedeniyle istenmemektedir (Chantarakhana ve

ark. 1981, Aksoy ve Tekeli 1993, Na-Chiengmai 2002, Atasever ve Erdem 2008, Uğurlu 2017, Özbeyaz 2015).

2.3.3. Mandalarda Östrus ve Yardımcı Üreme Tekniklerinin Kullanımı

Mandalar yılboyu östrüs gösterebilen poliöstrik hayvanlardır. Fakat seksüel faaliyetlerde yıl içinde önemli dalgalanmalara rastlanmaktadır (Rahumathulla ve ark. 1987). En yoğun östrus siklusu faaliyeti Eylül - Şubat ayları arasında görülür (Aksoy ve Tekeli 1993). Yılboyu görülen tüm östrüslerin yaklaşık dörtte üçü Eylül-Şubat ayları arasında görülürken, Mart ve Ağustos ayları arasında östrüslerin dörtte biri meydana gelmektedir. Doğumların aylara göre dağılımı da ineklerden oldukça farklıdır ve mevsimsel bir özellik gösterir (Gurdial ve ark. 1985, Baruselli ve ark. 1997).

Mandalarda östrus sığırlardaki kadar belirgin değildir ve östrus dönemi sığra göre sakin geçer (Aksoy ve Tekeli 1993, Özbeyaz 2015). Östrus sırasında mandada belirtiler; sütün azalması, hareketliliğin artması, tedirginlik, vulvada ödem, çara akıntısının gelmesi ve manda boğasının sürekli peşinde dolaşmasıdır. Mandalarda kızgınlığı en kolay tespit yöntemi arama boğası kullanmaktır (Chantarakhana ve ark. 1981, Baruselli ve ark. 1997, Atasever ve Erdem 2008, Özbeyaz 2015).

Üreme özelliklerinden de anlaşıldığı üzere mandalar yardımcı üreme teknolojilerinin kullanımına sığırlardan daha çok ihtiyaç duyar. Bu amaçla son yıllarda mandalarda ST, sabit zamanlı tohumlama (ovsynch) uygulamaları (Purohit ve ark. 2019), östrus senkronizasyonları (Atabay ve ark. 2020), *in vivo* ve *in vitro* embriyo üretimi çalışmaları yapılmakta ve üreme sorunlarına çare olunmaya çalışılmaktadır (Duran ve ark. 2017, Uğurlu 2017, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

2.4. Hayvanlarda Embriyo Transferinin Tarihçesi

Memelilerde ilk ET uygulaması 1890 yılında Heape tarafından Birleşik Krallık'ta tavşanlarda yapılmış, başarılı transferler gerçekleştirilmiş ve sağlıklı yavrular elde edilmiştir. Sığırlarda ilk başarılı ET çalışması 1951 yılında ABD'de Cornell Üniversitesinde Willet ve ark.'ları tarafından cerrahi yöntemle yapılmıştır. Sığırlarda günümüzdeki gibi cerrahi olmayan yöntemle ilk başarılı nakil 1965 yılında Japonya'da gerçekleştirilmiştir

(Sugie 1965). Sığır oositlerinde yapılmış ilk başarılı *in vitro* Maturasyon (IVM) ve *in vitro* Fertilizasyon (IVF) çalışması Iritani ve Niwa (1977) tarafından Japonya’da yapılmıştır. IVF ile doğan ilk buzağı 1981 yılında elde edildikten sonra bu çalışma Brackett ve ark.’nın (1982) ABD’de yaptığı çalışmalara da öncülük etmiştir (Gordon 2003, Hasler 2014).

Embriyo transferi teknolojisi 1980’li yıllardan sonra çiftlik hayvanlarında üretim kalitesini arttırmak amacıyla değerli bir enstrüman olarak sahada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Mapletoft 2013, Hastler 2014, Kumar ve ark. 2020). Genel olarak memelilerde fertilizasyon olayının daha iyi anlaşılması ancak 20. yüzyılın ortalarında sperma kapasitasyon mekanizmasının anlaşılmasıyla mümkün olmuştur. Konu ile ilgili önemli gelişmeler kronolojik olarak sıralanarak çizelge 2.3.’de özetlenmiştir (Gordon 2003, Hufana-Duran 2008, Karaşahin 2012).

Çizelge 2.3. Memelilerde embriyo transferi çalışmalarında önemli gelişmeler (Gordon 2003, Hufana-Duran 2008, Karaşahin 2012).

Bilimsel Gelişmeler	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)
Sığırlarda ilk başarılı embriyo transferi	Sugie (1965)
İnsan oositi <i>in vitro</i> fertilizasyonu	Bavister ve ark., Edwards ve ark. (1969)
Embriyo dondurma/çözme sonrası ilk buzağı	Wilmot 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)
İlk embriyo transferi manda malağı doğdu	Drost ve ark. (1983)
Nükleer transfer yoluyla ilk koyun doğdu	Willadsen (1986)
IVF, IVM yapılan oositten buzağı	Hanada (1986)
IVP embriyodan ilk ikizler doğdu	Lu ve ark. (1988)
IVF manda malağının doğumu	Madan ve ark. (1991)
Klonlama yoluyla ilk canlı (Dolly)	Wilmot ve ark. (1997)
Fare primordiyal hücreden <i>in vitro</i> embriyo	O’Brien ve ark (2003)
Sığır primordiyal hücrelerden <i>in vitro</i> embriyo	Telfer and McLaughlin (2017)

Dünyada ET konusu 1972-1974 yılları arasında popülerliğinin yüksek olduğu yıllardır. Bu dönemde ET konusunda dünyada bir standart oluşturmak ve uygulamaların başarısını arttırabilmek amacıyla konu ile ilgili çalışan ve birçok ülkelerden gelen araştırmacıların katılımıyla 26 Mayıs 1974'te ABD'de IETS (International Embryo Transfer Society - Uluslararası Embriyo Transfer Derneği) kurulmuştur. Bu dernek 2015 yılına kadar bu isimle faaliyetlerini sürdürmüştür. Dernek 2015 yılında adını IETS (International Embryo Technology Society - Uluslararası Embriyo Teknoloji Derneği) olarak değiştirmiştir. Dernek 2020 yılında 46. toplantısını 16-19 Ocak 2020 yapmış ve faaliyetlerine devam etmektedir (Kaymaz 2015, IETS 2021).

2.5. Embriyo Transferi Teknolojileri

Embriyo transferi, donör (verici) hayvanın genital kanalından toplanan veya laboratuvar koşullarında IVF elde edilen embriyoların, taşıyıcı hayvanlara nakledilmesi olarak tanımlanır (Kanagawa ve ark. 1995, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020). Bir diğer tanımlama ise genetik kapasiteleri ve verim düzeyleri belirlenmiş olan üstün genetik kapasiteye sahip inek ve boğalardan elde edilen embriyoların (*in vivo* veya *in vitro*) taşıyıcı ineklere nakledilmesi işlemine verilen isimdir (Gordon 2003, Akyol 2006, Kaymaz 2015).

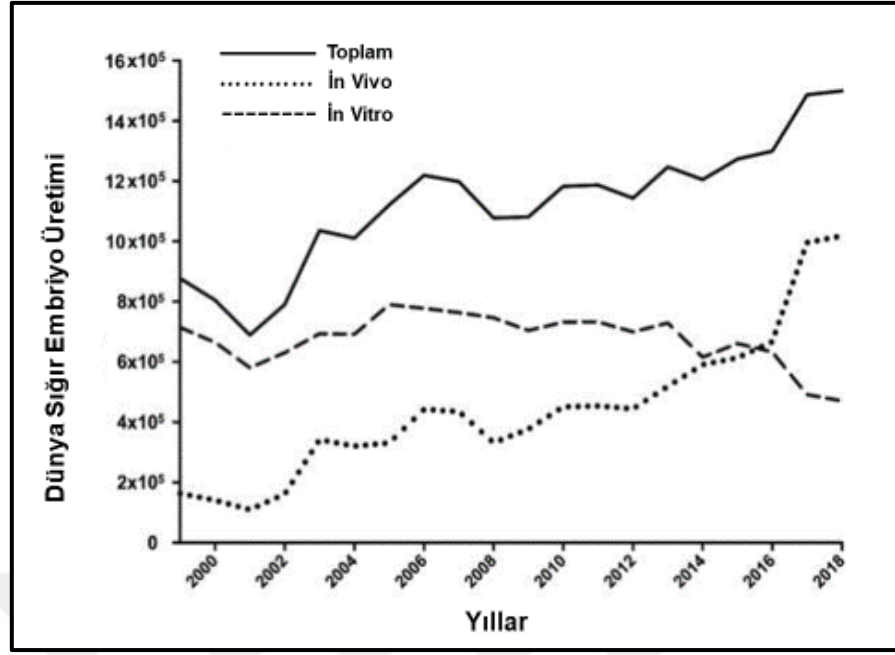
Tavşanlardan ilk *in vitro* ortamda üretilen embriyodan yavru elde edilmesinin ardından, sonraki yıllarda folikül-oosit fizyolojilerinin daha iyi anlaşılması ve spermatozoonların fertilizasyon kabiliyetlerinin aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalarla birlikte *in vitro* embriyo üretimi alanındaki gelişmeler hızlı bir şekilde gelişerek günümüze ulaşmıştır (Gordon 2003, Karaşahin 2012, Hasler 2014). Ayrıca, *in vivo* embriyo üretimi (Multiple Ovulation Embryo Transfer, MOET) uygun protokoller kullanılarak, donör (verici) hayvanların genital kanalından toplanan embriyoların cerrahi veya servikal yöntemlerle alınıp değerlendirildikten sonra çeşitli yöntemlerle dondurulup saklanması veya taze transfer edilmesi işlemidir (Gordon 2003, Karaşahin 2012, Hasler 2014, Kaymaz 2015).

Dünyada hayvansal protein kaynaklarına ihtiyaç artmaya başlayınca üretimin arttırılmasına yönelik çalışmalar 1900'lü yıllarda ıslah çalışmaları ve sonrasında yüzyılın ortalarında suni tohumlama ile devam etmiş, 1950'lerden sonra ET gibi yardımcı üreme tekniklerinin kullanılması daha da yaygınlaşmıştır. *In vitro* embriyo üretimi (*In Vitro*

Embryo Production, IVP) dişi genital ortamına ihtiyaç duyulmadan, tamamen laboratuvar ortamında; *in vitro* maturasyon (IVM), *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve *in vitro* kültür (IVC) ortamları hazırlanarak embriyo üretiminin başarıyla gerçekleştirilmesidir (Gordon 2003). IVF canlı hayvanlarda işleyen sürecin laboratuvar şartları da taklit edilerek çok çeşitli aşamaların birbirini takip etmesiyle oluşan karmaşık bir süreçtir (Kaymaz 2015, Duran ve ark. 2017, Baruselli ve ark. 2020). IVP üzerine çalışmaların yapıldığı ilk yıllarda, ovulasyona yakın *Graaf* foliküllerinden veya ovulasyon sırasında alınan oositler kullanılırken (Gordon 2003, Merton ve ark. 2003), günümüzde birçok ülkede, geliştirilen IVM ve *in vitro* kapasitasyon metotları sayesinde, tamamen canlı hayvanlardan bağımsız şekilde IVM, IVF ve IVC prosedürleri geliştirilmiştir (Hasler 2014, Kaymaz 2015, Karaşahin 2017).

Hayvansal üretim biyoteknolojisi alanında avantajlar sağlayan IVF birçok laboratuvarında embriyo elde etme oranı %25-30 arasındayken son 10 yılda geliştirilen teknolojiler aracılığı ile %60'lara kadar çıkarılabilmektedir (Gordon 2003, Akyol 2006, Karaşahin 2012). IETS'nin verilerine göre dünya çapında IVP kendisini kanıtlamış ve ticari olarak üretilen embriyolar bu yolla üretilmeye başlamıştır. Ancak bu oran mandalarda %20'nin altında kalmaktadır (Gasparrini ve ark. 2006, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

Dünya sığır embriyosu üretiminin 1998-2018 yılları arasında *in vivo* üretim, *in vitro* üretim ve toplam üretim şekil 2.5.'te verilmiştir (IETS 2019). Bunun hem sığırlarda hem de mandalardaki başlıca nedeni IVC koşullarının ve IVM'nun önündeki problemlerin henüz tamamen aşılamamış olmasıdır (Kaymaz 2015, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020). Günümüzdeki güncel başarı düzeyi yüksek olmasa da IVP, gelişmiş ülkelerin pek çoğunda hayvan ıslahı için yerini almıştır (Akyol 2006, Kaymaz 2015, Duran ve ark. 2017, Kumar ve ark. 2020). Dünya sığır embriyosu 1998-2018 yılları arası *in vivo* üretim, *in vitro* üretim ve toplam üretim miktarları şekil 2.5.'te grafik olarak verilmiştir (IETS 2019).



Şekil 2.5. Dünya sığır embriyosu 1998-2018 yılları arası *in vivo* üretim, *in vitro* üretim ve toplam üretim (IETS 2019).

2.6. Mandalarda Embriyo Transferi Çalışmaları

Mandalara uyarlanmış ve aktarılmış yardımcı üreme teknolojilerinin verimliliği yıllarca düşük kalmıştır. Ancak son yıllarda ET teknolojilerinin geliştirilip maliyetlerinin azalmasıyla manda endüstrisinde de genetik ilerlemeyi hızlandırıcı katkılar sunulmaktadır (Warriach ve ark. 2015). Mandalar üzerine yapılan çalışmalarda *in vivo* embriyo toplama (uterine flushing) oranı ile sığırlar arasında çok büyük fark bulunmuş, mandalarda düşük oranların olmasının ovidukt tarafından yakalama işlemi tam yapılamaması veya oosit taşınmasında oviduktal peristaltik yetmezliğine bağlı sorunlardan olabileceği bildirilmiştir (Bellve ve McDonald 1970, Baruselli ve ark. 2000, Carvalho ve ark. 2007, Carvalho ve ark. 2012, Singh ve ark. 2015). Mandalarda daha ileri çalışmalar gerektiren ET ve IVP çalışmalarında başarı için detaylı ve derin çalışmalar yapmak ayrıca *in vitro* embriyo üretimi ve embriyoların dondurarak saklanması tekniklerinin de geliştirilmesi gerektiği birçok araştırmacı tarafından önemle vurgulanmıştır (Palta ve Chauhan 1998, Gasparrini 2002, Nandi ve ark. 2002, Hufana-Duran ve ark. 2005, Hufana-Duran 2008, Carvalho ve ark. 2007, Carvalho ve ark. 2012, Singh ve ark. 2015).

Mandalarda yoğun çalışmalara rağmen *in vivo* embriyo üretiminde yıkama başına embriyo üretimi başlangıçta 1-2 adet iken son çalışmalarda 2,5-3,5 ortalama oranlarına ulaşmıştır. Bu oranlar çeşitli faktörlerin etkisiyle sığırlardaki *in vivo* embriyo üretimi ile kıyaslandığında çok düşük kalmıştır. Mandalarda süperovulasyona zayıf cevap nedeniyle hala canlı embriyoların toplanması sınırlı olduğundan, *in vivo* embriyo üretimi oldukça düşüktür ve bunun sebebi hala net bir şekilde açıklanamamıştır (Drost 2007, Gasparrini ve Tyagi 2007, Warriach ve ark 2015). Mandalarda reproduktif verimliliğin artırılması için senkronizasyon ve embriyo üretimi ile diğer protokollere örnek olabileceği düşünülerek yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (Manik ve ark. 2002, Presicce ve ark. 2003, Presicce ve ark. 2004, Awasthi ve ark. 2006, Carvalho ve ark 2012, Singh ve ark. 2015, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020). Fakat hala mandalarda senkronizasyon protokolleri, süperovulasyon, *in vitro* fertilizasyon, nükleer transfer ve embriyonik manuplasyon tekniklerinin geliştirilerek işleme konulabilmesi için ovaryum fonksiyonelliğinin yanı sıra foliküler dinamikler ile ilgili bilgilerin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir (Şahin ve Küçükkebabçı 1999, Drost 2007, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020). Manda ovaryumlarındaki primer folikül popülasyonunun (Primordial hücre sayısı ortalama 12.000) ineklerdekine göre yeni doğan yavrularda %89 daha az olduğu bildirilmiştir (Drost 2007).

Sığırlarda olduğu gibi mandalarda da ıslah çalışmalarında genetik ilerlemenin sağlanması uygulanacak seleksiyona ve iyi bir damızlık seçimine bağlıdır. Damızlık seçiminde progeny testing, Best Linear Unbiased Prediction (BLUP), Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET) gibi metotlarla genetik ilerlemeyi hızlandırmak için embriyo transferi, *in vitro* fertilizasyon gibi yardımcı üreme teknikleri kullanılmaktadır (Palta ve Chauhan 1998, Gasparrini 2002, Drost 2007, Warriach ve ark. 2015, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

Doğal veya senkronize östrus yoluyla suni tohumlama, dünyada mandaların üremelerine yardımcı olmak için yaygın olarak kullanılan yardımcı üreme tekniklerindendir. Suni tohumlama, süperovulasyon ve ET teknolojisi ile birleştirip üstün hayvanların üretim potansiyellerinden yararlanmış, süt yönlü seleksiyon yaparak mandalarda genetik gelişimi artırmaya çalışmıştır (Cruz ve ark. 1991). *In vivo* yolla elde edilip sonrasında transfer edilen ilk manda malağı ABD de Drost ve ark. (1983) tarafından, *in vitro* koşullarda ilk kez üretilen,

transfer edilen ve doğumu gerçekleşen manda malağı ise Madan ve ark (1991) tarafından Hindistan’da yapılmıştır.

2.6.1. Mandalardan Oosit Elde Edilmesi

In vitro embriyo üretimim başarısı için oositlerin aspirasyonu, toplanması ve değerlendirilmesi aşamalarının hızlı ve dikkatli yapılması gerekmektedir (Akyol 2005, Karaşahin 2012). Bu aşamaların hızlı ve düzgün yapılmaması maturasyonların (Akyol 2006) gerçekleşmemesine, fertilizasyonda sorunlara (Akyol 2005), özellikle embriyo gelişim aşamalarında bölünmelerin olmamasına ve devamında blastosist meydana gelmemesine yol açar (Gordon 2003, Imai 2005, Kaymaz 2015).

Mandalarda IVF için oositler, Ovum Pick-Up (OPU) ile canlı hayvanlardan veya kesilen hayvanların ovaryumlarından toplanır. OPU, genetik ilerlemeye dişi katkısını artırmak için en güvenilir genetik materyal kaynağını sağlarken, mezbahadan türetilen ovaryumların genetik iyileştirme üzerinde çok az etkisi olmasına rağmen, bunlar istenen hayvan türünün araştırılması ve çoğaltılması için ucuz ve bol miktarda oosit kaynağı sağlar (Kumar ve ark. 1997, Galli ve ark. 1998, Galli ve ark. 2001).

Ovaryumlar toplama ve işlemede, 28 ila 33°C’de fizyolojik tuzlu su (100 µg streptomisin / ml ve 100 IU penisilin / ml ile %0,9 sodyum klorür) taşımada kullanılan en yaygın vasatlardandır (Gordon 2003, Akyol 2006, Kaymaz 2015). Matsushita ve ark. (2004), sığırlara mezbaha materyalinin taşınması ve 15-21°C de 24 saat süreyle saklanması ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, bunun *in vitro* maturasyon oranına ve devamında embriyo gelişimine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Schernthaner ve ark. (1977), 24 saat 15 ile 21°C arasında saklanan sığır ovaryumlarının blastosist oranını etkilemediğini belirtmiştir. Blastosist gelişimi için ovaryum taşıma sıvısının 20°C’nin en uygun sıcaklık olduğunu gösteren diğer çalışma Osaki ve ark. (2004) tarafından yapılmıştır. Mandalarda yapılan çok sınırlı çalışmaya rağmen, embriyo üretiminin başarı oranını artırmak için *in vitro* embriyo üretiminin ilk aşaması olan ovaryumların mezbahadan laboratuvara taşınmasının özenle yapılması gerektiğini göstermektedir (Boni ve ark. 1999, Kumar ve ark. 1997, Osaki ve ark. 2004, Hufana-Duran 2008).

Folikül aspirasyonu, ovaryumların dilimlenmesi ve foliküllerin delinmesi oositlerin elde edilmesinde kullanılan yöntemlerdir (Boni 1994, Boni ve ark. 1994, Das ve ark. 1996).

Manda oositlerinin elde edilmesinde dilimleme yöntemi fazla sayıda oosit elde edilmesini sağlar (Kumar ve ark. 1997, Gasparrini 2002), ancak bu yöntemin çok fazla sayıda kalitesiz oosit elde edilmesine yol açtığı rapor edilmiştir (Hufana-Duran 2008, Kumar ve ark. 2007). Nehir mandalarında folikül diseksiyonu pratik değildir. Foliküller, ovaryumun stromal bölgesine derinlemesine gömülüdür (Gasparrini 2002), bu nedenle hızlı uygulanabilmesi nedeniyle aspirasyon en yaygın kabul gören tekniktir (Nandi ve ark. 2002).

Aspirasyon yöntemiyle elde edilen oositlerin Dulbecco Fosfat Buffer Solution (D-PBS) içine eklenen %3 Sığır Serum Albümini (BSA) veya %5 Fötal Buzağı Serum (FCS) ile hem foliküllerden çıkarılan oositlerin dejenerasyon ihtimalini azalttığı hem de oositler arasında daha yüksek gelişme potansiyeli sağladığı bildirilmiştir (Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020). Mandalarda donör başına *in vivo* embriyo üretimi ortalamasının çok düşük olması nedeniyle, *in vitro* embriyo üretim tekniğinin etkin bir şekilde kullanıldığında ticari embriyo üretiminin daha cazip olacağı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Drost 2007, Carvalho ve ark. 2012, Singh ve ark. 2015, Kumar ve ark. 2020).

2.6.2. Manda Oositlerinin Değerlendirilmesi

Oosit kalitesinin iyi değerlendirilmesi, oositlerin maturasyonunu, fertilizasyonunu 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 1993, Madison ve ark. 1992, Gasparrini 2002).

In vitro maturasyon için oosit seçiminde, türden bağımsız olarak, oositler, kumulus-korona radyata katmanlarına ve ooplazmanın homojenliğine bakılarak seçilir. Mandalarda birkaç çalışma, kompakt ve eşit şekilde granüle edilmiş kumulus hücrelerine sahip oositlerin daha yüksek olgunlaşma oranları verdiğini ortaya koymuştur (Suzuki ve ark. 1991, Chauhan ve ark. 1998a, Abdoon ve ark. 2001, Duran ve ark. 2017, Rubessa ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020). Bu bulgu, sığırlardaki çalışmalarla da desteklenmektedir (De Loos ve ark. 1989, Smith ve ark. 1996, Gordon 2003, Akyol 2006, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015). Bazı araştırmacılar tarafından oosit, kumulus hücreleri ve oosit sitoplazması tamamen değerlendirmeye alınır. Bu sınıflandırmada birden dörde kadar 1-2-3-4. kalite şeklinde

rakamsal kodlamayla yapılmaktadır. Oosit kalitesinin bütün morfolojik yapılarına göre rakamlarla yapılan sınıflandırma çizelge 2.4.'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir (Gasparrini 2002, Gordon 2003, Akyol 2006, Kaymaz 2015).

Sonuç olarak, kumulus hücresi olmayan oositlerin %20'si mikroskopik olarak incelendiğinde anormal veya dejenere olmasına rağmen, kumuluslu oositlerin yaklaşık %50'si olgunlaşma bölünmesine uğradığı ve yarısının fertilizasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuçlar, kumulus hücrelerinin oosit ooplazmasının gelişimsel yeterliliğinin mevcut olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilir (Raghu ve ark. 2002a, Hufana-Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

Çizelge 2.4. Oosit kalitesinin bütün morfolojik yapılarına göre rakamlarla yapılan sınıflandırma (Gasparrini 2002, Gordon 2003, Akyol 2006, Kaymaz 2015).

Kalite	Total Kumulus Oosit Kompleksi	Kumulus Yapısı	Ooplazma Özelliği
1	Açık ve şeffaf görünümlü,	Çok katmanlı (En az 4 katman)	Homojen yapıda düzgün
2	Biraz koyu ve daha az şeffaf görünümlü	Homojen yapıda ama az katmanlı (4 den az katmanlı). Zona %20 den az kısmında kumulusuz	Kaba görünüm, Zonada koyuluk veya hafif seffaflaşma
3	Koyu görünümlü ve 1-2 sıralı kumulus hücreli	Daha az kumulus yapı, Kumulus koyu kümeler halinde, Zona %20'den fazla bölgeler kumulusuz	Kaba görünümlü, Zonada koyuluk ve düzensizlik
4	Koyu ve düzensiz, Kumuluslar expansive veya tamamen erimiş halde	Genişlemiş kumulus yapı, Dağınık kumulus hücreleri, Zona tamamen kumulusuz	Ooplazma fazla şeffaf, Zonada koyuluk ve yer yer düzensiz görünümlü

Pratik ve hızlı olması açısından sadece kumulus hücrelerinin morfolojilerine bakılarak A, B, C ve D şeklinde de sınıflandırma yapılabilmektedir. Bu sınıflandırmaya göre dördüncü grup çok düşük *in vitro* maturasyon yeteneğinde olarak değerlendirilir. 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 alfabetik sıralamayla sığır oosit

sınıflandırması Kumulus Oosit Kompleks (COC) yapılarına göre çizelge 2.5.'de ayrıntılı olarak verilmiştir (Brackett ve Zuelka 1993, Kanagawa ve ark. 1995, Raghu ve ark. 2002a, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Karaşahin 2012). Bazı araştırmacılar ise sitoplazması homojen, zona pelusida üzerinde sağlam ve kompakt yapıda kumulusa sahip oositleri gelişime uygun, heterojen sitoplazmalı ve ekspans olmuş dağılmış kumulus hücrelerine sahip oositleri de gelişime uygun olmayan oositler olarak sınıflandırmışlardır (Gordon 2003, Acar 2008, Karaşahin 2012). Ayrıca, oositlerin sınıflandırmasında farklı bir yöntem daha kullanılmıştır. Bu sınıflandırmada oositlerin fertilizasyon sonrası 3. ve 5. günlerdeki kalite durumları incelenmekte, bölünme oranları ve morula-blastosiste ulaşma durumuna göre oositler A, B veya C kalite olarak sınıflandırılmaktadır (Carvalhais ve ark. 2009).

Çizelge 2.5. Oosit kalitesinin COC morfolojisine göre sınıflandırılması (Kanagawa ve ark. 1995, Raghu ve ark. 2002a, Gordon 2003, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).

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 veya çok az bulunan oositler.
D Kalite	Etrafındaki kumulus hücre yığını dejenere durumda olan oositler.

2.6.3. Manda Oositlerinin *In Vitro* Maturasyonu

In vitro maturasyon canlılarda oosit gelişimini taklit etmek üzere planlanan bir süreçtir (Gordon 2003, Kaymaz 2015). Memelilerde oosit maturasyonu, dişi germinal vezikülünden metafaz II aşamasına kadar, birinci polar cisimciğin oluşması ile sonuçlanan, hücresel ve sitoplazmik değişiklikleri içeren bir süreç olarak tanımlanır (Topuzoğlu 2011). Manda oositlerinin maturasyonu sığırlarda olduğu gibi, nükleer ve sitoplazmik maturasyon olmak üzere iki evrede meydana gelir. Bu aşamalardan sonra manda oositleri fertilizasyona hazır hale gelir. Oositlerin nükleer maturasyonu, oosit çekirdeğinin germinal vezikül aşamasından

metafaz II aşamasına geçmesi olayıdır. Sitoplazmik maturasyon ise oositin germinal vezikül aşamasından metafaz II aşamasına ulaşması sırasında olgun bir oosit oluncaya kadar geçirmiş olduğu ultra-strüktürel değişimleri ifade eder. Oositlerinin *in vitro* maturasyonu sırasında kullanılan maturasyon medyumunun içeriği ve kullanılan maturasyon yöntemi, *in vitro* fertilizasyon ve embriyo gelişimini etkilemektedir (Totey ve ark. 1992, Gasparrin ve ark. 2006, Duran ve ark. 2017, Baruselli ve ark. 2020). *In vitro* maturasyon çok çeşitli faktörlerden etkilenir. Bunlar; ovaryumları alınan hayvanın fizyolojik durumu, östrus siklusu ve foliküler dalga dönemi, follikül büyüklüğü, kumulus oosit kompleksi, oosit kalitesi, maturasyon süresi, sıcaklık, nem ve çevresel gaz bileşenleri, maturasyon ortamlarının ozmotik değeri, maturasyon ortamına katılan maddeler olarak sıralanabilir (Karaşahin 2012). Manda oositlerinin *in vitro* maturasyonunda kullanılan medyumlar, basit ve kompleks olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Basit kültür sistemleri genellikle bikarbonat tamponlu fizyolojik tuzlara ilave piruvat, laktat ve glukoz katılmasıyla hazırlanan medyumlardır. Oosit maturasyon medyumlarının basit olarak tanımlananları genellikle antibiyotik, serumlar ve albüminlerle desteklenirler. Kompleks medyumlarda ise temel unsurların yanında amino asitler, vitaminler ve diğer bazı maddeler bulunmaktadır (Gordon 2003, Gasparrini ve ark. 2006, Pandey ve ark. 2010).

2.6.3.1. *In Vitro* Maturasyona Etki Eden Faktörler

Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonuna etki eden birçok faktör vardır. Bunlar; oosit vericisinin fizyolojik durumu, ovaryumu alınan hayvanların östrus siklusu, foliküler dalgalanma dönemi, foliküllerin büyüklüğü, kumulus oosit kompleksleri, oosit kalitesi, maturasyon süresi, sıcaklık, nem ve çevresel gaz bileşenleri, maturasyon ortamlarının ozmotik değeri, maturasyon ortamına katılan maddeler olarak sıralanabilir (Karaşahin 2012). Maturasyon medyumlarına hormon, büyüme faktörleri, serumlar, fizyolojik sıvılar ve özel kimyasal maddelerin ilavesi oositlerin maturasyon kabiliyetini artırmak ve embriyo elde etme başarısını etkilemektedir (Gordon 2003, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).

2.6.3.1.1. Medyumlar

Manda oositlerinin *in vitro* maturasyonu için en yaygın biçimde kullanılan maturasyon medyumları, doku kültür medyumları (TCM-199)'dur (Totey ve ark. 1992, Gordon

2003, Gasparini ve ark. 2006, Pandey ve ark. 2010, Duran ve ark 2017, Baruselli ve ark 2020). İçerisinde laktat, piruvat, amino asitler, vitaminler, HEPES (N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-etanosülfonik asit) ve sodyum bikarbonat bulunmaktadır (Gordon 2003, Gasparini ve ark. 2006, Pandey ve ark. 2010, Marin ve ark. 2019). Ham's F10, Menezo-B2 gibi maturasyon amacıyla kullanılan medyumlar kompleks yapı kültür medyumlarıdır ve bu medyumların kullanımı TCM-199 ile elde edilen maturasyonun yeterli olduğu düşünüldüğünden kısıtlıdır (Gordon 2003, Marin ve ark. 2019, Pandey ve ark. 2010).

2.6.3.1.2. Hormonlar

Mandalarda oosit maturasyonu için ilk uygulamalarda Luteinleştirici Hormon (LH) olmaksızın TCM 199'un %20 manda östrus serumu veya %10 fetal calf serumu (FCS), Folikül Stimüle edici Hormon (FSH), estradiol-17 β (E2) ve Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ile takviye edildiğinde yüzde $81,7 \pm 14,5$ nükleer olgunlaşma ve maturasyon meydana geldiği bildirilmiş (Totey ve ark. 1992). Ham's F-10 vasatına %20 manda östrus serumu ve LH eklendiğinde $76,8 \pm 18,3$ IVM oranı oluşturduğu, ancak FSH eklendiğinde bu etkinin görülmediği bildirilmiştir. Bu durum LH'nin FSH ve E2 ile sinerjik olarak hareket etmediğini göstermiştir (Madan ve ark. 1994). TCM 199'da tek başına %10 manda östrus serumu ile 20 ila 24 saat kültürlenmiş oositlerde %78,1'lik bir maturasyon oranı elde edildiği rapor edilmiştir (Abdoon ve ark. 2001, Gupta ve ark. 2002, Raghu ve ark. 2002b).

2.6.3.1.3. Büyüme Faktörleri

Mandalarda oosit maturasyonu için İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I kullanıldığında granüloza hücreleri ortamda bulunsun ya da bulunmasın mayotik olgunlaşmada FSH ile pozitif etkileşime girerek Deoksi Ribonükleik asit (DNA) ve protein sentezine olumlu yönde etki gösterdiği bildirilmiştir (Hufana-Duran 2008). Bununla birlikte, LH'nin İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I'i (ILGF-1) baskıladığı bulunmuştur. Gebe Kısarak Serum Gonadotropini (PMSG) ile birlikte EGF, manda oosit olgunlaşmasında ve embriyo bölünmesinde yüksek oranlar elde ettiği rapor edilmiştir (Nandi ve ark. 2001). BSA, FSH, insülin, transferrin, selenyum ve EGF içeren maturasyon kültür ortamlarında blastosist aşamasına kadar manda oositlerinin *in vitro* gelişimini gözlemlenmiş ve sonuç olarak FSH

ve EGF ile takviyenin manda oositlerinin olgunlaşma oranlarını önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur (Hufana-Duran 2008). Blastosist sayısı maturasyon medyumlarında EGF ve insülin-transferrin ve selenyum olan medyumlarda da yüksek olmuştur (Das ve ark. 1997).

2.6.3.1.4. Kumulus Hücre Yapıları

IVM sırasında ko-kültür yöntemi, özellikle foliküllerden alındıktan sonra kumulus hücrelerinden yoksun oositlerde, oositlerin olgunlaşmasında somatik hücrelerin yararlarını değerlendirmek için incelenmiştir. Kumulus hücresi olmayan manda oositlerinin gelişimsel yeterliliğinin çok düşük olduğu ve IVM sırasında kültür ortamına kumulus hücrelerinin ortama eklenmesiyle dahi maturasyonun geliştirilemediği bildirilmiştir (Das ve ark. 1997). Bununla birlikte, bir tek tabakalı kumulus hücreleri (Korona Radyata) ihtiva eden ve yapay olarak (pipetasyonla) soyulmuş oositlerde daha yüksek maturasyon oranları meydana geldiği bildirilmiştir (Pawshe ve ark. 1998).

2.6.3.1.5. Serumlar ve Fizyolojik Sıvılar

Serumlar, büyüme ve gelişme için zengin biyolojik kalıntı kaynağı olarak bilinir. Fötal Buzağı Serumunun oosit ve embriyo kültüründe etkisini belirlemek için çalışmalar yapılmış, Totey ve ark. (1993b) fetal buzağı serumunun (FCS) maturasyon yeterliliğine ulaşmada manda östrus serumundan daha etkili olduğunu belirtmiştir (Gasparrini 2002, Hufana-Duran 2008). Bununla birlikte, yapılan birçok çalışma, kullanılan serum kaynaklarının (manda östrus serumu, süperovüle edilmiş manda serumu, fetal sığır serumu, östrus döngüsünün farklı aşamalarında manda serumu, insan serumu) oositlerde maturasyona fazla etkili olmadığını göstermiştir (Chauhan ve ark. 1998a, Chuangsoongneon ve Kamonpatana 1991, Samad ve ark. 1998, Nandi ve ark. 2001b, Totey ve ark. 1993b). Mandalarda oosit maturasyonu için TCM 199'a ek olarak olarak gonadotropinler, steroidler, proteinler, büyüme faktörleri, inhibin, sterol ve diğer maddeleri içeren kistik ve normal foliküler sıvı denenmiştir (Gupta ve ark. 2001). Sonuç olarak kolay bulunan, FSH ve LH etkisine sahip ucuz FBS (Chauhan ve ark. 1998a, Nandi ve ark. 2001), ucuz ve kolay üretilen PMSG veya saf olarak koyun ve domuzlardan üretilen FSH tercih edilmekte ve yeterli

olduğu bildirilmektedir (Gupta ve ark. 2001, Abdoon ve ark. 2001, Hufana-Duran 2008, Kumar ve ark 2020).

2.6.3.1.6. Süre

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 (Karaşahin 2012, Kaymaz 2015). IVF için ideal süreyi belirlemek için ideal IVM süresi Neglia ve ark. (2001) tarafından çalışılmış, mikroskop ile *in vitro* maturasyondaki oositlerin metafaz II aşamasında olduğunu kontrol edilerek en düşük oranın 16. saatte %16 maturasyon oranı olarak, en yüksek 25. saatte %85 maturasyon oranı olarak elde edildiği, 28. saatte oranın düştüğü bildirilmiştir. Manda oositleri için daha kısa IVM süresi önerilmiştir. Gasparrini (2002) tarafından yapılan çalışmada 20 ila 24 saat aralığının manda oositlerinin maturasyonu için uygun zaman olduğu bildirilmiştir. Olgunlaşmadaki farklılıkların, maturasyon için kullanılan oositlerin heterojen olduğunu gösterir. Bu da embriyo kültüründe varyasyonun en az olmasının homojen bir oosit popülasyonu için etkili ve verimli seçim parametrelerinin belirlenmesi gerektiği anlamına gelir. Sonuç olarak embriyo üretmek için neredeyse tamamı kaliteli oositlerin maturasyona alınması ve kullanılması gereklidir (Hufana-Duran 2008).

2.6.3.1.7. Gazlar

Yüksek oksijen konsantrasyonu hem oosit maturasyonunu durdurduğu hem de oositlerin yüksek oranda maturasyonuna engel olduğu için iyi ayarlanmalıdır. Bunu için CO₂ ortamında %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 N bileşimi gazlar kullanılmaktadır. Bu sayede IVM aşamasında sürdürülebilir sabitlikte bir gaz ortamı sağlanmaktadır (William ve Shapiro 1990, Bavister 2002, Hufana-Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020). *In vitro* maturasyonda TCM-199 medyumunu kullanılarak yapılan maturasyonlarda genellikle %5 CO₂ ortam yeterli olmaktadır (Akyol 2006). Ayrıca farklı maturasyon medyumları kullanılırken farklı gazlı ortamlar tercih edilebildiği bildirilmiştir (Nagai 2001, Hufana-Duran 2008, Duran ve ark. 2017).

2.6.3.1.8. Sıcaklık

In vitro embriyo üretimde en uygun sıcaklık sağlanması oositlerin maturasyonu açısından çok önemlidir. *In vitro* maturasyon amacıyla geçmişte yaklaşık 37°C ısı kullanılmaktaydı. Düşük sıcaklık seviyelerinde maturasyon oluşumunun durması nedeniyle 39°C'ye yakın sıcaklıklarda gerçekleştirilen maturasyon işlemlerinin uygun olduğu bildirilmiştir (Nagai 2001, Karaşahin 2012). Mandalarda maturasyonda çoğu araştırmacı 38,5°C sıcaklığın ideal olduğunu bildirmiştir (Nandi ve ark. 2004, Gasparrini ve ark. 2006, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020).

2.6.3.1.9. Nem

Bazı araştırmacılar CO₂'li ortamda, maturasyon medyumunun buharlaşmaması ve pH değerinin değişmemesi amacıyla bağıl nemin %95'in üzerinde olması gerektiği bildirmişlerdir. Nem oranının ayarlanması diğer aşamalar (IVF ve IVC) içinde önem arzeder. Genellikle bağıl nem bütün aşamalar için %98 olarak bildirilmiştir (Gasparrini ve ark. 2006, Karaşahin 2012).

2.6.3.1.10. Folikül Büyüklüğü

Farklı büyüklükteki foliküllerden [küçük (0,5-3 mm), orta (3-8 mm), büyük (8 mm)] aspire edilmiş manda oositlerinin maturasyonu üzerine çalışılmış, foliküler sıvı miktarının manda oositlerinin maturasyonu ve blastosist aşamasına kadar gelişimi üzerine etkinliğinin düşük olduğu görülmüştür. Manda ovaryumlarında 0,5 mm büyüklüğünde foliküllerden 8 mm büyüklüğündeki foliküllere kadar aspirasyon gerçekleştirilmesinde embriyo gelişimi açısından herhangi bir sakınca olmadığı bildirilmiştir (Nandi ve ark. 2004, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020).

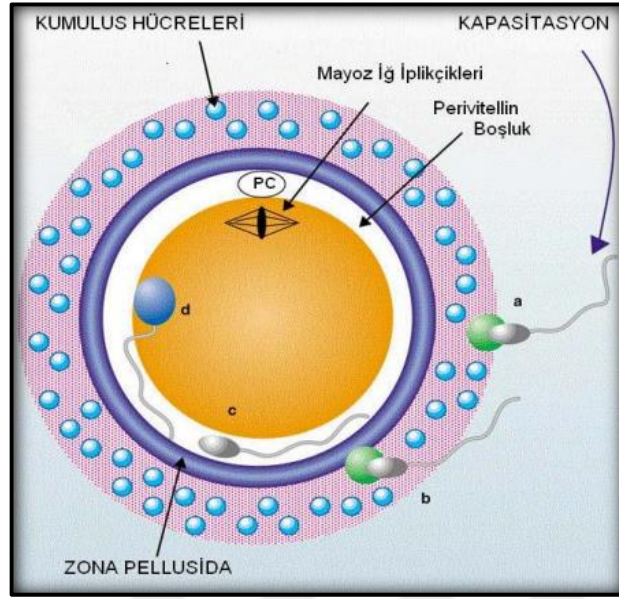
2.6.3.2. Manda Oositlerinde Maturasyon Belirleme Yöntemleri

In vitro maturasyon çalışmalarında kullanılan başarı kriterleri oldukça fazladır. Bu amaçla kumulus ekspansiyonu; kumulus oosit kompleksi oositi çevreleyen kumulus

hücrelerinin genişlemesi bakımından değerlendirilir. Germinal vezikülün kırılması ve birinci polar (kutup) cisimciğin atılması, kumulus hücrelerinin genişlemesi ile yakından ilişkilidir. Buna göre kumulus hücrelerinde genişleme olan oositler maturasyonu gerçekleştirmiş olarak kabul edilir (Suzuki ve ark. 1996, Birler ve ark. 1997, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015). Diğer bir değerlendirmede ise I. polar cisimciğin görülmesi; kumulus ekspansiyonu olan oositler, pipetasyon işlemi ile kumulus hücrelerinden tamamen ayrılır. Daha sonra bu oositler stereo mikroskop altında incelenerek I. polar cisimciğin varlığı açısından incelenir. I. polar cisimciğini perivitellin boşluğa atan oositler matur olarak değerlendirilir (Acar 2008, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015), fakat bu yöntem kullanılması durumunda *in vitro* embriyo üretiminin diğer aşamalara geçilemeden sadece oran belirleme çalışmaları ve *in vitro* maturasyon üzerine yapılan araştırmalarda kullanılan bir yöntemdir (Gasparrini ve ark 2006, Hufana-Duran 2008, Manik ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020).

2.6.4. Manda Oositlerinin *In Vitro* Fertilizasyonu

In vitro fertilizasyon, maturasyonunu tamamlamış olan oositle, fertilizasyon yeteneğinin kazanmış spermatozoonların laboratuvar şartlarında uygun koşullarda bir araya getirilmesi (Kaymaz 2015) şeklinde tanımlanırken, bazı araştırmacılar kapasite olmamış spermatozoonların laboratuvar ortamında kapasite edilmeleri ve kapasitasyonu gerçekleştirilen bu spermatozoonlarla da dişi gamet hücresi olan oositlerin fertilize edilmesi işlemi olarak tanımlanmaktadır (Bavister 2002). Fertilizasyon, oosit ile spermatozoonun çekirdeklerindeki genetik materyalin kaynaşmasıyla oluşan ve oositten embriyo meydana getirmek amacıyla oluşan ilk hücrenin (zigot) oluşumu ile sonuçlanan olaylar zinciridir (Karaşahin 2012). Fertilizasyon, spermatozoonların laboratuvar şartlarında kapasite edilmesi ve maturasyonu gerçekleştirmiş dişi gamet hücresi olan oositlerin, kapasite edilmiş bu spermatozoonlarla birleşerek tek bir hücre ve tek bir nükleus meydana getirmesi olarak da tanımlanmaktadır (Hufana-duran 2008, Acar 2008, Karaşahin 2012). Şekil 2.6.'da fertilizasyon aşamaları şema halinde verilmiştir (Akyol 2005, Karaşahin 2012).



Şekil 2.6. Fertilizasyon; a) Kapasitasyonu gerçekleşmiş ve kumulus hücrelerine penetre olmuş spermatozoon, b) Kumulus katmanını geçip zona pelusidaya penetre spermatozoon, c) Zona pelusidayı geçmiş ve perivitellin boşluğata spermatozoon, d) Dişi pronücleusda genetik materyali ile bir araya gelmiş spermatozoon (Akyol 2005, Karaşahin 2012).

2.6.4.1. *In Vitro* Fertilizasyon Yöntemleri

Mandalarda IVF için taze spermanın dondurulmuş spermadan daha iyi fertilizasyon meydana getirdiği, ancak IVF'de taze manda sperması kullanmanın pratikliğinin, mevsime göre manda sperm kalitesindeki ciddi değişiklikler nedeniyle uygulamasında çeşitli zorluklar barındırdığı bildirilmiştir (Hufana-Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Soliman ve ark. 2018, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020).

Dondurulmuş-çözülmüş sperm düşük motilitesi, swim up (Nandi ve ark. 1998) veya percoll gradyan tekniği (Totey ve ark. 1996) ile motil manda spermatozoonlarının toplanmasıyla aşılmıştır. Bununla birlikte, motil spermetazonları toplamak için ek 1,5 saat gerektirdiğinden, swim up tekniği zaman alıcı olmasından motil spermatozoonları ayırmak için sadece birkaç dakika süre yeterli olan, percoll gradyan tekniğinin daha verimli olduğu bildirilmiştir (Hufana-Duran 2008). Fakat yüksek endotoksin seviyeleri nedeniyle 1996 yılında percoll'un kullanımına kısıtlamalar getirildi veya yasaklandı. Percoll'ün yasaklanması ile yerini alabilecek kimyasallar araştırıldı ve sperm kapasitasyonunu arttırmak ve spermatozoanın oosit içine nüfuz etmesini sağlamak için heparin ve kafein gibi

sperm hareketliliği arttırıcı maddeler kullanılmaya başlandı (Nandi ve ark. 1998, Hufana-Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

In vitro fertilizasyon için spermanın hazırlamanın en yaygın yöntemlerinden birisi dondurulmuş-çözülmüş spermanın Brackett ve Oliphant (BO) solüsyonu kullanılarak (Brackett ve Oliphant 1975) santrifüj edilip yıkanarak hazırlanmasıdır. Dondurulmuş-çözülmüş sperma kapasitasyonu için temel ortam olarak modifiye TALP (Tyrode albumin laktat piruvat) veya BO solüsyonlarının etkinliği karşılaştırılmış, BO ortamında hazırlanan ve kafein ve heparin kullanılarak dondurulmuş-çözülmüş spermatozoonların, TALP ile heparin kullanılarak yapılan kapasitasyondan daha yüksek fertilizasyon başarısı sağladığı görülmüştür (Totey ve ark. 1992, Hufana-Duran 2008). BO direkt yıkama ortamında hazırlanmış spermatozoonlarla muamele edilen oositlerin, TALP kullanılarak yapılan fertilizasyondan daha fazla bölünme kabiliyetine sahip olduğu bildirilmiştir (Ravindranatha ve ark. 2003, Duran ve ark. 2017, Rubessa ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020).

Spermatozoonlarda diğer motilite arttırıcı maddeler; teofilin (Chauhan ve ark. 1998a), pentoksifilin (Ramesha ve ark. 2000), taurin (Abdoon ve ark. 2001) ve penisilamin, hipotaurin ve epinefrin kombinasyonları kullanılmıştır (Totey ve ark. 1996). Motilite arttırıcı maddelerin fertilizasyon oranını arttırıcı etkisi değişkendir ve boğalar arasındaki farklılıklar göz önünde bulundurduğu için her boğa için ayrı ayrı test edilmesi gerektiği birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Totey ve ark. 1996, Chauhan ve ark. 1998a, Abdoon ve ark. 2001, Ramesha ve ark. 2000, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

2.6.4.2. *In Vitro* Fertilizasyona Uygun Spermatozoon Konsantrasyonu

In Vitro Fertilizasyon ortamındaki spermatozoon konsantrasyonu fertilizasyon başarısında önemli bir etkiye sahiptir. Bunun için uygun spermatozoon konsantrasyonunun 1 ml'de 2×10^6 olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirmiştir (Totey ve ark. 1993a, Hufana-Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Soliman ve ark. 2018, Kumar ve ark. 2020). Daha yüksek sperm konsantrasyonları (1 ml'de 3×10^6 ve 1 ml'de 4×10^6) oosit penetrasyonunu fazlasıyla arttırdığı ve bunun da polispermiye yol açtığı görülmüştür (Hufana-Duran 2008). Bazı çalışmalarda yüksek sperm konsantrasyonu kullanıldığında polispermi oluşumunun,

inkübasyon süresinin kısaltılmasıyla giderilebildiği de bildirilmiştir (Gasparrini 2002, Marin ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

Hem *in vitro* koşullarda hemde *in vivo* koşullarda önemli bir husus olan boğa etkisi sorununun hem sığırlarda (Gordon 2003, Akyol 2006, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015) hem de mandalarda bazen bir problem oluşturabildiği rapor edilmiştir (Duran ve ark. 2017, Kumar ve ark. 2020). Bu yüzden mandalarda IVF için uygun sperm konsantrasyonunun belirlenmesinde boğa etkisinin dikkate alması gerektiği birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Soliman ve ark. 2018, Duran ve ark. 2017, Kumar ve ark. 2020).

2.6.4.3. Manda Oositlerinin *In Vitro* Fertilizasyon Süresi

In vitro kapasitasyon ve fertilizasyonun başarısını, fertilizasyon solüsyonunun heparin yoğunluğu ve spermatozoonların heparinle muamele edilme zamanı belirlemektedir (Bavister 2002, Akyol 2005). Bu nedenle *in vitro* koşullarda 3-4 saat heparine maruz kalan spermatozoonlar mature oositle fertilizasyona alındıklarında yeteri derecede oosit penetrasyonu sağladığını birçok çalışma rapor etmiştir (Imai ve ark. 2002, Gordon 2003). Bazı araştırmacılar ise *in vitro* fertilizasyon amacıyla 16-21 saat arasında inkübasyon süresinin daha başarılı olduğunu bildirmiş ve önermişlerdir (Fukui ve ark. 1990). Mandalarda 20-22 saat sperm-oosit inkübasyon süresinin mandalarda IVF için uygun süre olduğunu birçok araştırmacı tarafından rapor bildirilmiştir (Totey ve ark. 1993a, Hufana-Duran 2008).

2.6.4.4. Manda Oositlerinin *In Vitro* Fertilizasyon Kriterleri

In Vitro fertilizasyonun kriterleri olarak Brackett ve ark. (1981) tarafından yapılan bir çalışmada perivitellin boşlukta iki kutup hücresinin tespiti, oositlerin bölünmesi ve kortikal granüllerin kaybolmasını göstermiştir. Shioya (1993)'ya göre; spermatozoon kuyruğunun veya spermatozoon başının oosit stoplazması içerisinde görülmesi, erkek ve dişi pronükleusların sitoplazmadaki varlığı, birinci ve ikinci kutup cisimciklerinin tespit edilmesi, zona pellusida veya perivitellin boşlukta spermatozoonun görülmesi ve ikinci mayoz bölünmenin telofaz aşamasının meydana geldiği görülerek fertilizasyonun gerçekleşmiş olduğu kabul edilebilir (Acar 2008). Ayrıca Karaşahin (2012) sığırlarda ve

Kumar ve ark. (2020) mandalarda yaptıkları çalışmalarda ilk 24 saatte bölünme oranının fertilizasyon oranı olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir.

2.6.4.5. Mandalarda Oositlerinin *In Vitro* Kültürü

In vitro fertilizasyon işlemi yapıldıktan sonra fertilize olmuş oositlerin (zigot) istenilen gelişim sürecine ulaşana kadar uygun ısı, nem ve gaz ortamında, ihtiyaç duyacakları tüm maddelerin katılabildiği vasatlarda (TCM-199, SOF, CR1aa vb.) inkübe edilmeleri olarak tanımlanabilir (Gordon 2003, Kaymaz 2015). Oositlerin *in vitro* maturasyonu ve fertilizasyonunun ardından oluşan tek hücreli zigotun morula-blastosist aşamasına kadar bekletildikleri medyum ortamına *in vitro* kültür denilmektedir (Gordon 2003).

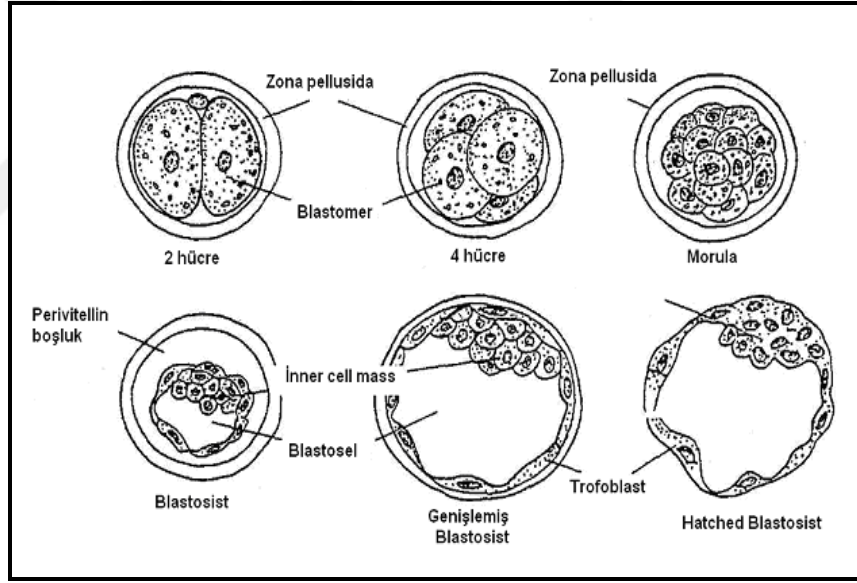
Doğal ortamlarında zigot, erken blastosist aşamasına kadar oviduktta gelişimlerini sürdürür ve uterusu doğru bir yolculuk yapar (Karaşahin 2012). Sığır embriyolarının *in vitro* koşullarda kültüre edilmesi için kültür ortamının, oviduktun sahip olduğu en yakın ortama sahip olması gerektiği bildirilmiştir (Gordon 2003, Duran ve ark. 2017, Kumar ve ark. 2020).

Bütün memelilerde olduğu gibi mandalarda da embriyo kültürünün, embriyonun gelişim için gereksinim duyulan biyolojik ve kimyasal maddeler ile diğer bileşenlerin bulundurulmasına dayalı, hem otokrin hem de parankrin faaliyetlerin hücreler tarafından gerçekleştirilebilmesi ile birlikte enerji metabolizmasının hücresel düzeyde düzenlenmesi prensipleri gözetilerek oluşturulmaya çalışıldığı, birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Hafez 2000, Gordon 2003, Gasparrini ve Tyagi 2007, Hufana-Duran 2008, Karaşahin 2012).

Memeli embriyo gelişimine katkıda bulunan faktörler üzerine sürekli yeni aştırmalar yapılmaktadır. Embriyo gelişimini etkileyen sinyal iletim mekanizmaları ve yeni yolların keşf edilmesi gibi yeni faktörler keşf edilmektedir. Bu fizyolojik mekanizmaların tam olarak çözülmesi sonucu embriyo gelişimi ve kültür ortamı arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılması gerçekleşecektir. Bu sayede daha verimli IVF protokollerinin geliştirilebileceği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Gordon 2003, Gasparrini ve Tyagi 2007, Hufana- Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020).

2.6.5. Mandalarda Embriyo Gelişim Aşamaları

Mandalarda embriyonun gelişim aşaması bütün memelilerde olduğu gibi kültürde bulunduğu güne göre değişim gösterir (Gasparrini ve Tyagi 2007). Manda embriyolarının sığırlara göre gelişimlerinde süre olarak bir gün önünde olduğu bildirilmiştir (Ocampo ve ark. 1997). Manda oositleri embriyo kültürünün 1. ve 2. gününde 2-8 hücreli olarak ilk bölünmelerini yaparlar. Embriyo kültürünün 3. gününde genelde 8-16 hücreli embriyolar meydana gelir. Genel olarak embriyo kültürünün 4.-5. gününde morula, 6. gününde ise kompakt morula ve erken blastosistler oluşur (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Barucelli 2020, Kanagawa ve ark. 1995, Kumar ve ark. 2020). Şekil 2.7.'de ilk bölünmeden itibaren embriyo gelişim aşamaları verilmiştir (Kanagawa 1995, Gordon 2003, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).



Şekil 2.7. Memelilerde embriyo gelişim aşamaları (Kanagawa 1995, Gordon 2003, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).

Kültürün 7 günden sonra ise blastosist, genişlemiş (expanded) blastosist ve Hatching Blastosist aşamasında embriyolar elde edilebilir (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Barucelli 2020, Kanagawa ve ark. 1995, Kumar ve ark. 2020). Embriyo kültür ortamında manda oositlerinin gelişme aşamaları çizelge 2.6.' da verilmiştir (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002).

Çizelge 2.6. Kültür ortamında manda oositlerinin gelişme aşamaları (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002).

Kültürdeki Gün	Gelişme Safhası
1-2	Bölünme gerçekleşmiş 2-8 hücreli embriyo
3-4	Morula (16-32 hücre)
5	Kompakt morula
6	Erken Blastosist
7	Blastosist, Expanded Blastosist
8	Hatching Blastosist / Hatched Blastosist

2.6.5.1. Morula Aşaması

Hücre sayısının 16'nın üzerine çıkmasıyla birlikte embriyo morula olarak adlandırılır. Hücreler bir yığın haline gelmeye başlamıştır. Tek tek hücreleri ayırt etmek zorlaşmaya başlamıştır. Trofoblast hücreleri yassılaşmaya başlamıştır. Bu aşamada henüz perivitellin boşluk çok geniş değildir (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Imai 2005).

2.6.5.2. Kompakt Morula Aşaması

Bu aşamada hücreler tamamen birleşip kompakt bir yapı halini almıştır. Trofoblast hücreleri iyice yassılaşmıştır. Perivitellin boşluk morula aşamasına göre daha geniştir. Genellikle bu aşama fertilize olmamış oositle (UFO) karıştırılan aşamadır (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Imai 2005).

2.6.5.3. Erken Blastosist Aşaması

Bir kısım hücrelerin lizisi ile içi sıvı dolu ve adına "Blastosel" denen bir boşluk oluşmaya başlamıştır. Perivitellin boşluk erken blastosist aşamasına göre biraz daha geniş olabilir. İleri dönemlerde "Inner cell mass" (ICM-İç hücre kümesi) ve "Trophoblast" hücre toplulukları gelişir. Zona pelucidanın altında perivitellin boşluğun bitiminde trofoblast hücreleri uzunlamasına bir yapı oluşturmaya başlamış ve ICM belirginleşmiştir. Bu haliyle blastosist taşlı yüzük görünümündedir (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Barucelli 2020, Kanagawa ve ark. 1995, Kumar ve ark. 2020).

2.6.5.4. Blastosist Aşaması

Dış kısımda trofoblast hücreleri ve daha koyu görünümlü ICM oluşmuştur. İleride genel hatları itibariyle, birinciden plasenta diğerinden ise fötüs gelişecektir. Blastosist kavitesi oldukça genişlemiş, perivitellin boşluk neredeyse tamamen dolmuş durumdadır (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Barucelli 2020, Kanagawa ve ark. 1995, Kumar ve ark. 2020).

2.6.5.5. Genişlemiş (expanded) Blastosist Aşaması

Embriyonun çapı 1,2-1,5 katı kadar artmış, zona dikkate değer biçimde (1/3 katı) incelmıştır. Bazı durumlarda kısmi blastosel kaybına bağlı olarak embriyoda çöküntüler görmek mümkündür (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Barucelli 2020, Kanagawa ve ark. 1995, Kumar ve ark. 2020).

2.6.5.6. Zona serbest (hatched) Blastosist Aşaması

Embriyo zonadan tamamen kurtulmuş (hatched) olabilir ya da kurtuluyor (hatching) halde olabilir. Bu aşamada Zona pellusida çatlamış durumdadır. Zona pellusidasından tamamen çıkmış hatched olmuş bir embriyoda hücrel dejenerasyonlar ve yıkımlar daha net olarak görülebilir. Ancak bu durumdaki bir embriyo deneyimsiz çalışanlar tarafından başka oluşumla da karıştırılabilir (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Barucelli 2020, Kanagawa ve ark. 1995, Kumar ve ark. 2020).

2.6.6. Mandalarda Embriyo Kalite Değerlendirilmesi

Hem *in vitro* hem de *in vivo* embriyo üretimi sırasında elde edilen embriyoların kalite sınıflandırması üretim aşamasının çok önemli ve hayati basamaklarından biridir (Gordon 2003, Akyol 2005, Kaymaz 2015). Bunun için dünyada tam bir bütünlük sağlanamasa da en önemli otorite IETS olarak bilinir (Bo ve Mapletoft 2018). Embriyo kalitesi derecelendirme IETS tarafından sayısal kodlar kullanılarak yapılır. Bu derecelendirme temel olarak embriyoların morfolojik bütünlüğüne dayanmaktadır. Embriyo kalitesi derecelendirmesi

için kodlar "1" ile "4" arasındadır. Buna göre Kod 1 derece embriyolar Mükemmel veya İyi kalite olarak sınıflandırılır. Kod 1 derecede embriyolar donma ve çözünmeye dayanıklı, donma çözülme sonrası transfer edilebilir embriyolardır. Ayrıca bu embriyolar uluslararası ticarete uygun olarak sayılırlar. Kod 2 derecelendirilen embriyolar makul kabul edilir ve embriyoların hayatta kalması dondurma-çözdürme prosedürü sonrası düşüktür. Bu sınıflandırmaya alınan embriyolar ancak taze transfere uygundur. Ticari olarak da satışı yapılamaz. Bu nedenle bu embriyolara genellikle taze transfer edilebilir ama dondurulamaz olarak sınıflandırılır. Kod 3 olarak derecelendirilen zayıf yapıda embriyolar donma-çözülme sırasında hayatta kalmazlar. Transfer prosedürü ile gebelik oranları çok düşük embriyolardır. Kod 4 olarak derecelendirilen embriyolar ise ölü, dejenere ve UFO halinde kalan embriyolardır. Bu sınıfa giren embriyolar oositler veya bir hücreli fertilizasyon gerçekleşmemiş embriyolardır. Cansızdırlar ve atılmaları gerekir (Stringfellow ve Givens 2010). IETS kılavuzunda belirtilen bu görsel embriyo değerlendirme sistemi öznel bir değerlendirmedir. Biyolojik sistem ile yapılmamış ve kesin bir derecelendirme değildir. Bu nedenle, gebelik oranları bazen beklenenden daha düşük olabilir (Stringfellow ve Givens 2010, Bo ve Mapletoft 2018).

Memelilerde embriyo kalite değerlendirmeleri farklı sınıflandırmalarla da yapılmaktadır. (Gordon 2003). Embriyo kalite değerlendirmesi IETS kıstasları dışında embriyoların çeşitli morfolojik özelliklere bakılarak yapılabilmektedir (Ocampo ve ark. 1997). Embriyolar yuvarlak yapıda ve zona pelucida olarak bilinen yarı saydam jelatin benzeri bir kabukla çevrili hücrelerden (blastomerler) oluşur. Ayrıca manda embriyoları sığırlara göre gelişimlerinde bir gün öndedir (Ocampo ve ark. 1997) ve bu nedenle kültürün 6. gününde de embriyoların değerlendirilmesi yapılabilir. Manda embriyolarında kalitenin değerlendirilmesinde önemli ölçütler şunlardır (Hufana- Duran ve Hufana 2015).

- 1- Embriyo ve blastomerlerin şekli
- 2- Zona pelucida'nın bütünlüğü
- 3- Embriyonun boyutu
- 4- Embriyonun görünümü
- 5- Hücrelerin homojen yapısı (Dejenerasyon düzeyi)
- 6- Embriyonun gelişim aşaması
- 7- Embriyonun yaş bilgisi

Özetle memeli embriyo değerlendirilmesi morfolojik yapı itibariyle; şekil, renk, sitoplazma yoğunluğu, hücrelerin homojenliği ve dejeneratif alanların tespiti şeklinde yapılmaktadır. Ayrıca birçok araştırmacıya göre Hatching Blastosist aşaması embriyo kalitesinin iyi bir göstergesidir (Totey ve ark. 1992, Gasparrini 2002, Kumar ve ark. 2020). Embriyo sınıflandırılması yaygın olarak aşağıdaki şekilde yapılmaktadır (Totey ve ark. 1992, Kanagawa ve ark. 1995, Gasparrini 2002, Gordon 2003, Kaymaz 2015, Barucelli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

2.6.6.1. Mükemmel Kalite Embriyo (Kod 1 kalite, 1. Kalite)

Mükemmel kalitede bir embriyoda fark edilebilecek hiçbir kusuru yoktur. Bu kalitede embriyo düzgün, yuvarlak, küresel, simetrik, hücresel yapı ve renk homojen yapıdadır. Mükemmel kalitede embriyoların zonası düzgün ve sağlam, dejenerasyon alanı yok denecek kadar az embriyolardır. Bu kalitede embriyoların ticaretine izin verilir (Stringfellow ve Givens 2010).

2.6.6.2. İyi Kalite Embriyo (Kod 1 kalite, 2. Kalite)

İyi kalite embriyo önemsiz birkaç kusura sahiptir. Örneğin, gruptan ayrılmış düzensiz şekil veren birkaç blastomer ya da birkaç vezikül mevcuttur. Bütün bu bozukluklar hücrenin %10 kadarını veya daha azını teşkil eder. Bu kalitede embriyolarında ticaretine izin verilir (Stringfellow ve Givens 2010).

2.6.6.3. Vasat Kalite Embriyo (Kod 2 kalite, 3. Kalite)

Vasat kalitede embriyo, içerisinde hücre grubundan ayrılmış düzensiz şekil veren birçok blastomer ya da birçok vezikül mevcuttur. Embriyoya düzensiz şekil veren blastomer, vezikül bozukluklar ve dejenerasyon alanları toplamda %10-30 arasındadır. Bu kalitede embriyolar dondurma ve çözdürmeye uygun olmayan embriyolardır. Taze transfere uygundur. Bu kalitede embriyoların ticaretine izin verilmez (Stringfellow ve Givens 2010).

2.6.6.4. Zayıf Kalite Embriyo (Kod 3 kalite, 4. Kalite)

Zayıf kalitede embriyo, içerisinde hücre grubundan ayrılmış düzensiz şekil veren çok fazla blastomer ya da birçok bölgesinde vezikül mevcuttur. Zayıf kalitede bir embriyoda genel olarak %30-50 arasında dejenerasyon alanı görülür. Bu dejenere bölgeler, farklı büyüklükte hücresel oluşumlar, geniş veziküller içerir. Çalışma amaçlı transferler gerçekleştirilebilir. Taze transfer başarısı dahi %10-20 arasındadır. Bu kalitede embriyoların ticaretine izin verilmez. Bu kalitedeki embriyolar genellikle kullanılmadan atılır (Stringfellow ve Givens 2010).

2.6.6.5. Fertilize olmamış Oosit (UFO) ve Dejenere Embriyo (Kod 4 kalite, 5. Kalite)

In Vitro Fertilizasyondan sonra kültüre alınmış ancak hiç bölünme gerçekleşmemiş, fertilize olmadığı için koyu renkli tek bir hücre yığını şeklinde görülen hücrelerdir. Hücre içerisindeki yapılar vezikül yoğundur. Bu kalitede yapılar Compact morula (CM) aşaması ile çok karışır. Taze transfer başarısı yoktur ve ticaretine izin verilmez. Bu kalitedeki embriyolar da zayıf kalite embriyolar gibi genellikle atılır (Stringfellow ve Givens 2010).

2.6.7. *In Vitro* Kültür (IVC) Sistemleri

Hayvanlarda embriyoların *in vitro* kültürü için üç farklı kültür sistemi kullanılabilir. Bunlar; *in vivo kültür ortamları*, genellikle aynı tür veya farklı canlıların uterusu, *in vitro kültür ortamları* vasatlarla çeşitli biyolojik maddeler eklenerek oluşturulan kültür medyumları ve *ko-kültür*, kültür medyumları içerisine çeşitli hücreler katılarak oluşturulan kültür ortamlarıdır (Karaşahin 2012). Manda embriyolarının üretimi için en iyi sistemi belirlemek için fertilizasyon gerçekleşmiş manda oositleri farklı ortamlarda kültüre alınmıştır. Bunlardan bazıları; bağlanmış tavşan veya koyun oviduktunda (Galli ve ark. 1998), karmaşık ortamlarda TCM 199 (Madan ve ark. 1994, Yadav ve ark. 2000), basit ortamlarda (Totey ve ark. 1996, Boni ve ark. 1999, Abdoon ve ark. 2001) ve serum veya somatik hücreler ile desteklenmiş kültür ortamları (Raghu ve ark. 2002b), hücreler veya oviduktal epitel hücreli (Totey ve ark. 1992) *ko-kültür* ortamlar denenmiştir.

2.6.8. *In Vivo* Kültür Ortamları

Sığır embriyolarının *in vivo* kültüründe tavşan oviduktları en sık ve yaygın kullanılan bir ortam olmuştur. Her ovidukta 10-20 arasında embriyo bırakılmaktadır. Bu yöntemde ovidukt bağlanmakta ve bırakılan embriyoların toplama oranının %70 olduğu bildirilmektedir. Koyun oviduktları da sadece koyun embriyoları için değil, diğer türlerin embriyoları içinde iyi bir kültür ortamı oluşturmaktadır. *In vivo* kültür sırasında embriyoların koyun uterusu içerisine geçmelerini engellemek için uterusla tuba uterina arası bağlanır. Koyun oviduktu sığır embriyolarının blastosist aŗamasına kadar kültür ortamı olarak rahatlıkla kullanılabilir. Koyun oviduktları gerek yapısının büyük olmasından gerekse koyunların östrus sikluslarının kolay bir şekilde kontrol edilebildiğinden, tavşan oviduktlarına göre daha fazla tercih edilmiŗtir. Bazı araŗtırıcılar sığır oviduktlarının sığır embriyolarının *in vivo* kültürü için en uygun ortam olduğunu söylemektedirler. Farklı hayvanlara ait embriyolar dört günlük d llenmiŗ tavuk yumurtasının amnion kesesinde de geliŗmelerini sürdürebilmektedirler (Karaŗahin 2012). Günümüzde artık hücre kültürü ve embriyo kültürü sistemlerinin optimizasyonları neredeyse tamamlandığı için *in vivo* kültür ortamlarının kullanımı rutinde uygulanmamaktadır. Bu gibi uygulamalar daha çok araŗtırma amaçlı yapılmaktadır (Thompson 2000, Hufana-Duran 2008, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

Manda embriyolarının kültür ortamı için birçok  alıŗma yapılmıŗtır (Totey ve ark. 1996, Boni ve ark. 1999, Abdoon ve ark. 2001, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020). Mandalarda kültür medyumunu olarak; Charles Rosenkran's 1 amino asit (CR1aa), Charles Rosenkran's 2 amino asit (CR2aa), modifiye Sentetik Ovidukt Sıvısı (mSOF), Tissue Culture Medium (TCM 199), Menez-B2, Kohonen Self-Organizing Map (KSOM), Whittens Medyum, Ham's F10, Chatot Ziomek Bavister (CZB), Minimum Essential Medium (MEM) ve modifiye Roswell Park Memorial Institute (mRPMI) gibi medyumlar araŗtırıcılar tarafından kullanılmıŗ ve mandalarda *In vitro* kültür (IVC) sistemleri üzerine daha fazla  alıŗmaya ihtiyaç olduğu birçok araŗtırmacı tarafından bildirilmiŗtir (Chuangsoongneon ve Kamonpatana. 1991, Totey ve ark. 1992, Madan ve ark. 1994, Abdoon ve ark. 2001, Gasparrini ve Tyagi 2007, Hufana- Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

Manda embriyoları için ideal olmayan kültür koşulları, gelişimsel anormalliklere ve azalmış canlılığa sahip embriyoların üretimine yol açabilir. Bu nedenlerle embriyo kültürü olarak mandalarda CR1aa'nın, blastosist gelişimi açısından en iyi ortamlardan biri olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Rosenkrans ve ark. 1993, Madan ve ark. 1994, Gasparrini ve Tyagi 2007, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Presicce ve ark. 2020, Baruselli ve ark. 2020).

2.6.9. *In Vitro* Ko-Kültür Ortamları

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, %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, Gordon 2003, Gasparrini ve ark. 2006). Günümüzde artık hücre kültürü ve embriyo kültürü sistemlerinin optimizasyonları neredeyse tamamlandığı için *ko-kültür* ortamlarının kullanımı araştırma amaçlı olmaktadır (Thompson 2000, Hufana-Duran 2008, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

2.6.10. *In Vitro* Kültürde Kullanılan Bazı Maddeler ve Etkileri

Manda oositlerinin embriyo gelişimine etkili birçok madde kültür ortamlarında çalışılmış; BSA, FSH, EGF ve insülin-transferin, selenyum içeren serumsuz ortamda blastosist aşamasına kadar geliştirilebildiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar, embriyoların üretimindeki etkinliğin ortam ve takviyelere göre değiştiğini göstermektedir (Raghu ve ark. 2002b, Kumar ve ark. 2020). Antioksidanların ortam tamamlayıcısı olarak kullanıldığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Bu raporlarda, antioksidanların IVM, IVF ve IVC ortamlarına katılarak başarı oranlarını iyileştirdiği, embriyo gelişimi ve kalitesi üzerine olumlu etkiler meydana getirdiği bildirilmiştir (Gasparrini ve ark. 2000, Karaşahin 2012). Diğer yandan, beta-merkaptotanol (BME) kullanımının, oositlerin eşzaman pronükleus oluşum oranını önemli ölçüde iyileştirdiği bulunmuştur (Rosenkrans 1990).

Mandalarda da oositlerin ve embriyoların gelişimi için uygun bir ortam sağlamak için kültür ortamında antioksidanlara ihtiyaç duyulduğu birçok araştırmacı tarafından

bildirilmektedir (Songsasen ve Apimeteetumrong 2002, Gasparrini ve ark. 2000, Gordon 2003, Hufana- Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020). Mandalarda embriyo gelişimi için çeşitli büyüme faktörlerinin de olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir. İnsülin benzeri büyüme faktörü-I varlığında elde edilen manda blastosistlerinin trofektoderm ve iç hücre kütleindeki morfoloji ve hücre sayısının, insülin benzeri büyüme faktörü-I olmadan geliştirilen blastosistlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Narula ve ark. 1996). Ayrıca, EGF (Chauhan ve ark. 1999, Raghu ve ark. 2002b), EGF ve fibroblast büyüme faktörü beraber kullanımı (Gupta ve ark. 2002, Raghu ve ark. 2002b), insülin benzeri büyüme faktörü-I (Narula ve ark. 1996, Pawshe ve ark. 1998, Chauhan ve ark. 1998b) ve oosit kültür ortamında insülin benzeri büyüme faktörü-II (Chauhan ve ark. 1998b) mandalarda kumulus ekspansiyonu, nükleer olgunlaşması ve fertilizasyon sonrası bölünme oranlarını artırdığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Hufana-Duran 2008, Duran ve ark. 2017, Marin ve ark. 2019, Rubessa ve ark. 2019, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020).

2.6.11. *In Vitro* Kültür Ortamını Oluşturan Bileşenler

In vitro kültür ortamının oluşturulma amacı ideal embriyo gelişimini sağlamaktır (Gasparrini 2002, Gordon 2003, Kaymaz 2015). Çeşitli *in vitro* kültür medyumları mevcut olsa da hepsinde ortak olan bileşenler vardır (Hafez 2000, Gordon 2003). Genel olarak *in vitro* kültür ortamının ortak bileşenleri; ortamın gazının, sıcaklığının, kullanılan medyumların kimyasal yapısının, ortamın pH'sının, enerji ve protein miktarlarının embriyo gelişiminin doğal ortamı olan uterusun doğal şartlarına oldukça yakın olması gerekmektedir (Karaşahin 2012).

2.6.11.1. Gazlar

In vitro kültür ortamındaki gaz miktarının değişik oranlarda olduğu bazı araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Gordon 2003, Kaymaz 2015). Yapılan araştırmalar sonucunda memeli oviduktunda oksijen miktarının %10'nun altında olduğu görülmüştür. *In vitro* kültür için oksijen konsantrasyonunun atmosferik oksijen miktarından düşük olması gerektiği bildirilmiştir (Karaşahin 2012). Kültür ortamında somatik hücre desteğinin olmadığı

durumlarda oksijenin %5'in altında olması gerektiği bildirilmektedir (Nagao ve ark. 1994). Embriyoların, *in vitro* kültürü boyunca metabolizması için CO₂'ye ihtiyacı vardır. Ayrıca CO₂, alkaliye kayma eğiliminde olan kültür ortamlarının pH'sının stabilize edilmesinde büyük öneme sahiptir (Gordon 2003). Zhang ve ark. (2003), memeli embriyolarının *in vitro* kültürü için %5 CO₂ gaz ortamını 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, Karaşahin 2012). IVC için tercih edilen gaz ortamı kullanılan kültür medyumuna göre değişiklik göstermektedir.

2.6.11.2. Sıcaklık

In vitro kültür ortamı için en uygun sıcaklığın 38-39°C arasında olduğu belirtilmektedir (Gordon 2003). 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 (Karaşahin 2012). 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).

2.6.11.3. Işık

Sığır ve manda zigot ve embriyoları ışıktan ve ultraviyole ışıktan olumsuz yönde etkilenmektedir (Hafez 2000, Gordon 2003). 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 (Karaşahin 2012).

Farklı ışık kaynaklarının embriyo gelişimi üzerine olumlu etkileri olsa da doğal ortamında ışık bulunmaması nedeniyle ışıklı ortamda geliştirilen embriyolarda ne gibi zararların meydana geldiği hakkında detaylı çalışmalar mevcut değildir (Bunch ve ark. 1999).

2.6.11.4. pH

In vitro kültür medyumlarının pH'sı embriyoların gelişimi üzerinde oldukça etkili bir faktördür (William ve Shapiro 1990). Medyumların pH'sının kontrolü ortama gerekli miktarda bikarbonat ekleyerek yapılır. Ayrıca *in vitro* kültürde medyumların pH'sının kültür kabini içerisindeki CO₂'nin yardımı ile de dengelendiği bildirilmiştir. *In vitro* kültür ortamında 7,2 ile 7,4 arasında bir pH'ın olmasının embriyo gelişimi için uygun olduğu bildirilmiştir (Gordon 2003, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).

Son yıllarda mandalarda yardımcı üreme teknolojilerinde pek çok gelişme sağlanmıştır. Birçok ülkede IVF tekniği ile mezbahada kesilen manda ovaryumları değerlendirilerek *in vitro* ortamda kaliteli embriyolar elde edilmektedir. Yapılacak çalışmada Anadolu mandasın mezbaha materyalinden elde edilen ve yok olacak oositlerin embriyo üretim kapasitesi belirlenerek ekonomiye katkıda bulunma olanakları araştırıldı. Konuyla ilgili küçük çaplı denemeler ve ön çalışmalar yapılmış olsa da literatürde geniş bir şekilde bilgi mevcut değildi. Bu çalışma Anadolu mandası üzerine yapılacak *in vitro* fertilizasyon çalışmalarına başlangıç oldu. Yapılan bu çalışmayla resmi kayıtlarda ve literatürde bulunmayan Anadolu mandasına ait *in vitro* emriyo gelişimi ve embriyo üretimi potansiyeli araştırıldı. Çalışmada, mezbahadan alınan Anadolu mandasında ait ovaryumlardan elde edilen oositlerin embriyo gelişim ve üretim aşamalarındaki çeşitli parametreleri ile embriyo kaliteleri belirlenmeye çalışıldı. Çalışmayla elde edilecek bulgularla, Anadolu mandasında *in vitro* ortamda embriyo gelişimi hakkında veriler oluşacak ve bu sayede gelecekte yapılacak çalışmalara bir alt yapı oluşturulmaya çalışılacaktır. Bütün bunlarla beraber çalışma ile Anadolu mandası hakkında bilgi alt yapısının geliştirildiği ve literatür bilgilerine katkı sağlandığı düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 29.08.2018 tarihli ve 155 sayılı kararı ile Etik Kurul onayı verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan oosit kaynağını Afyonkarahisar ve Çorum illerinde kesilen Anadolu mandası ovaryumları oluşturdu. Çalışmalar Ankara, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü bünyesinde bulunan ET-IVF Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma yaşları, siklus dönemleri, verim özellikleri, yaşadıkları bölge şartları, mevsimsel farklar, sıcaklık stresi gibi özellikleri göz ardı edilen Anadolu mandalarından alınmış ovaryumlarda yapıldı.

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Laboratuvarda Bulunan Cihazlar

- CO₂ İnkübatör (PANASONIC MCO-170M-PE)
- Stereo Mikroskop (OLYMPUS SZH10)
- Mikromanipilatör (NIKON ECLIPSE TE300)
- Biyogüvenlik kabini (NUAIRE Biological Safety Cabinets CLASS II)
- Benmari (Sıcak su banyosu) (Memert, Germany)
- Hassas Terazı (Sartorius ED224S, Germany)
- pH metre (MANNA Instruments, HI221, Woonsochket, USA)
- Medikal Kit Dolabı (+4)
- Derin Dondurucu (-21)
- Ozmometre
- Santrifüj
- Vorteks
- Sterilizatör
- Termos (ovaryum taşınması için)
- Bunzen Beki

3.1.2. Laboratuvar Sarf Malzemeleri

- Embriyo Kùltür Sıvısı (Sigma-Aldrich®, W1503, St Luis, MO, USA)
- TCM-199 (Gibco®, Grand Island, NY, USA)
- Enjektör filtresi (0,22 µm)
- Plastik petri 35 mm'lik (3001,1008) ve Altı çizgili plastik petriler 90 mm'lik
- Pastör pipetleri (230 mm cam)
- Otomatik pipet ve steril pipet uçları (10, 50, 100, 1000'lik)
- Santrifüj tüpü (steril, dereceli, kapaklı 15 ve 50 ml'lik) ve Eppendorf Tüpleri
- Enjektörler (2.5-5-10-20-50'lik) ve Enjektör uçları (18 G)
- Cam mezuralar (10, 20, 50, 100, 250, 500 ml'lik)
- Konik Erlenmeyer (10 ve 50 ml'lik)
- Thoma Lamı, Normal Lam ve Lameller

3.1.3. Kimyasal Maddeler ve İlaçlar

Özel olarak belirtilmediğı sürece kullanılan kimyasallardan Sigma-Aldrich olarak belirtilenler medyumlar ve kimyasallar, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA, Gibco olarak belirtilen medyumlar ve kimyasallar, 3175 Staley Rd., Grand Island, NY 14072, USA menşelidir. Kullanılan diğ er maddeler ve ilaçlar özel olarak geçtiğı bölümde belirtmiştir.

3.2. Ovaryumların Laboratuvara Taşınması

Bu çalışmanın ovaryum kaynağını Anadolu Mandası Halk Elinde Islahı Ülkesel Projesi yürütölen, il mezbahalarında (Afyonkarahisar, Çorum) kesilen Anadolu mandası ovaryumları oldu. Çalışma 2019 ve 2020 yıllarında 6 replikasyon halinde gerçekleştirildi. Çalışma amacıyla mezbahadan laboratuvara getirilen bazı ovaryum görüntüleri şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Laboratuvara getirilmiş Anadolu mandası ovaryumları.

Anadolu mandalarının kesimlerinin yapıldığı mezbahadan temin edilen ovaryumlar, 15-21°C deki 100 mg/L Kanamisin Sülfat (Vetaş- KANOVET®, İstanbul, Türkiye) ihtiva eden %0,9'luk serum fizyolojik içerisinde (Matsushita ve ark. 2004), azami süre (3-4 saat) içerisinde müdürlüğümüz IVF-ET laboratuvarına getirildi (Imai 2005, Akyol 2006).

Çizelge 3.1. Ovaryum taşıma solüsyonu.

Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
NaCl	Sigma- Aldrich S5886	9 gr	1000 ml için
Kanamisin Sülfat	Vetaş- KANOVET®	0,5 ml	1000 için/ 100mg/L

3.3. Oositlerin Aspirasyonu, Toplanması ve Değerlendirilmesi

3.3.1. Aspirasyon Solüsyonu (D-PBS + %3 FCS) Hazırlanması

Mezbahadan getirilen ovaryumlardan COC aspirasyonunda kullanılan solüsyon için stok D-PBS hazırlanması aşağıda çizelge 3.2.'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Hazırlanacak

D-PBS + FCS + Penisilin-Streptomisin (Çizelge 3.3.) solüsyonu COC aspirasyonunda, elde edilen oositlerin değerlendirilmesi ve COC'ın maturasyon öncesi yıkanması için kullanıldı.

Çizelge 3.2. Oosit aspirasyonu, yıkanması ve değerlendirmesi için hazırlanan D-PBS solüsyonunun (Imai 2005, Akyol 2006, Kaymaz 2015).

				Kimyasal Madde	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
PBS -	PBS +	M-PBS	D- PBS	NaCl	Sigma- Aldrich S5886	8 gr	1000 ml için
				KCl	Sigma- Aldrich P5405	0,20 gr	1000 ml için
				KH ₂ PO ₄	Sigma- Aldrich P5655	0,20 gr	1000 ml için
				Na ₂ HPO ₄	Sigma- Aldrich S3264	1,15 gr	1000 ml için
				MgCl ₂ 6H ₂ O	Sigma- Aldrich M2393	0,10 gr	100 ml tamamlanır ve 4-5 seferde ana solüsyona eklenir.
				CaCl ₂	Sigma- Aldrich C1016	0,10 gr	
				Na Piruvat	Sigma- Aldrich P4562	0,036 gr	1000 ml için
				Glukoz	Sigma- Aldrich G6152	1,00 gr	1000 ml için
				BSA	Sigma- Aldrich A7030	3,00 gr	1000 ml için
				Antibiyotik	Gibco/Pen-Strep 15140	100 µl	(100 IU Penesilin) (100 µg /0,1 ml Streptomisin)

Bu amaçla hazırlanan ana solüsyonun bir kısmı (aspirasyon yapılacak ovaryum sayısına göre) 0,22 µm filtre (0,22 mikron, MILLIPORE, Carrigtwohill, Cork, Ireland) kullanılarak filtrasyon yapıldıktan sonra 37°C'lik benmaride aspirasyonda kullanılmak üzere bekletildi. Solüsyonun bir kısmı da 4-6 adet 35 mm petri kutusu içerisine 2,5 ml konuldu. Üzeri 2 ml mineral yağ ile kaplandı. Anadolu mandası oositlerinin aspirasyonundan 2 saat önce 38,5 °C'de %98 bağıl nemli %5 CO₂ ayarlanmış karbondioksitli inkübatöre ekilibrasyon (dengelenme) amacı ile konuldu (Imai 2005).

Çizelge 3.3. Ovaryumdan oosit aspirasyonu ve oositlerin yıkamak için hazırlanacak solüsyon (Imai 2005, Akyol 2006, Kaymaz 2015).

Kimyasal Madde	Miktarı
D-PBS	97 ml
FCS	3 ml
Penisilin-Streptomisin	100 µl

Laboratuvarında, içerisinde %5 fetal buzağı serumu (FCS) ilaveli Fosfat Tampon Solüsyon (D-PBS) bulunan 5 ml'lik enjektöre takılmış 18 Gauge'lik kanül yardımıyla ovaryum yüzeyindeki 2-8 mm çapındaki foliküllerden oositler aspire edildi. Aspirasyon yapıldıktan sonra dilimleme yöntemiyle kesilen ovaryumlar aynı solüsyonla yıkanarak 90 mm'lik petrilerde bulunan D-PBS içerisine alındı. Aynı solüsyon içerisinde değerlendirilerek A ve B kalite oositler sayıldıktan sonra maturasyona alındı. C kalite ve D (Dejenere) oldukları değerlendirilen oositlerin sayıları kayıt altına alındı. Bu oositler devam edecek olan aşamalar için değerlendirme dışı bırakıldı.

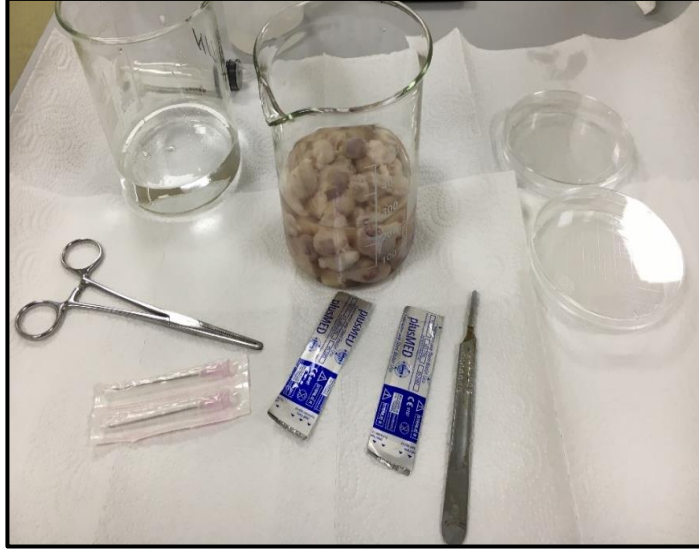
Hazırlanan sıvı 0,22 µm filtre (0,22 mikron, MILLIPORE, Carrigtwohill, Cork, Ireland) kullanılarak filtrasyon yapıldıktan sonra yeteri kadar 35 mm petri içerisine 2,5 ml konup üzerine 2 ml mineral yağ kaplandı ve aspirasyonlardan en az 2 saat önce CO₂ inkübatöründe dengelenmede bekletildi.

Manda ovaryumlarından oosit aspirasyonu için gerekli malzemeler aşağıda verilmiştir.

- Makas
- 5-10 ml tek kullanımlık enjektör
- 18 gauge enjektör ucu
- 90 ml petri kutusu (Altı Çizili)
- 35 ml petri kutusu (Tabanı Düz)
- Pastör pipeti veya (0,1-20 ml) micro pipet ve ucu. (Imai 2005, Akyol 2006, Kaymaz 2015).

3.3.2. Oositlerin Aspirasyonu

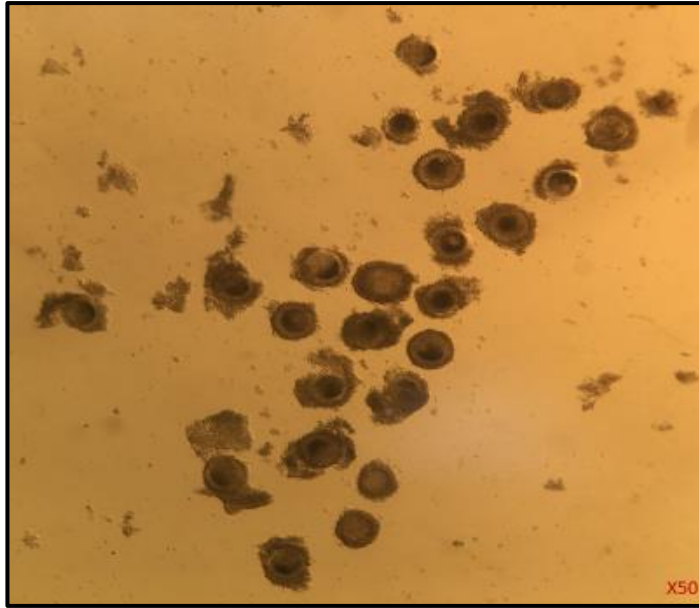
Ovaryum üzerindeki foliküllerin ucuna 18 G iğne takılmış 5 ml veya 10 ml enjektörler kullanılarak aspire edildi. Yapılan uygulamada enjektör ucu yukarı bakacak şekilde ve aspirasyonu gerçekleştirilecek folikülün 1-2 mm uzağından ovaryum dokusundan girilerek folikül patlatılmadan içerisindeki sıvı ile Kumulus Oosit Kompleks (COC) yapısının tamamı enjektöre çekildi ve konik tüplere alındıktan sonra 90 mm çapta petriler içerisine toplandı (Akyol ve ark. 2005, Kaymaz 2015).



Şekil 3.2. Ovaryumdan oosit aspirasyonu için gerekli malzemeler.

3.3.3. Oositlerin Değerlendirilmesi

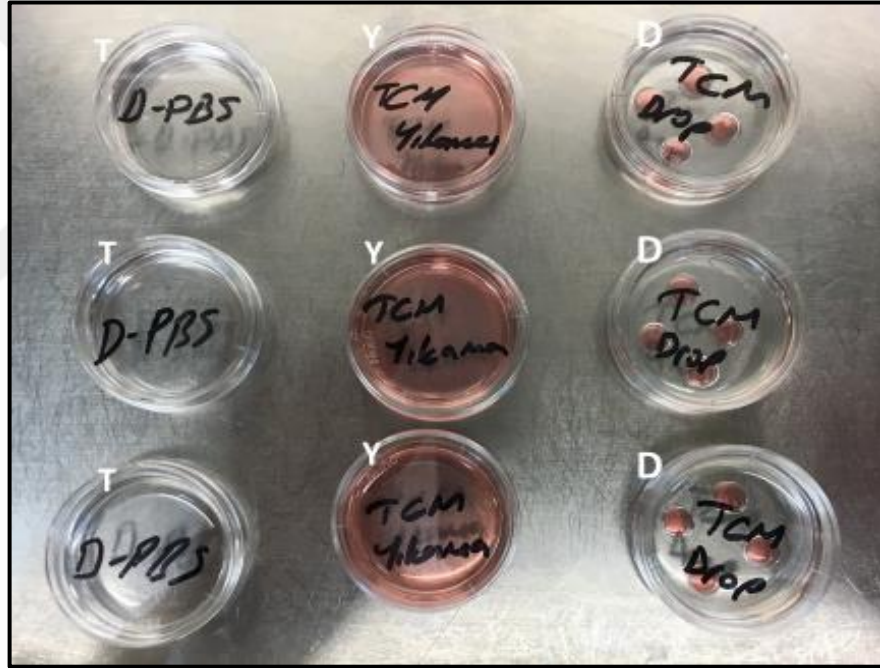
Yapılan bu çalışmada zaman kaybının azaltılması ve oosit dejenerasyonlarının en aza indirilmesi düşünülerek harfle yapılan sınıflandırma sistemi kullanılarak oositler A, B, C ve D (dejenere) olarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 3.3. Anadolu mandası ovaryumlardan oosit aspirasyonu sonrası TCM-199 solüsyonu içerisinde kalite sınıflandırması yapılmamış oositler. (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020).

3.4. In Vitro Maturasyon (IVM)

Maturasyon için %10 Fötal buzağı serumu (FCS)+ 5,5 mg/ml Na piruvat, 0,02 IU/ml FSH, 10 ng/ml EGF ve 50 µg/ml Penisilin-Streptomisin (Gibco, Pen-Strep 15140) içeren TCM-199 medyumunu kullanıldı. Hazırlanacak medyum oosit başına 5 mikrolitrede 1 oosit olacak şekilde; 100 mikrolitrelik dropta 20 oosit olacak şekilde, üzeri mineral yağ ile kapatılmış olan droplarda CO₂ inkübatörde; 38,5°C de, %5 CO₂ ve %95 bağıl nem ortamında 22-24 saat inkübe edildi. Oositlerde kumulus ekspansiyonu gerçekleşmiş oositler maturasyon olmuş kabul edildi. Ayrıca belirlenebilmesi durumunda diğer maturasyon kistası olarak nükleer maturasyonu (I. polar cisimciğin tespiti) gerçekleşmiş oositler de maturasyon olmuş kabul edildi.



Şekil 3.4. Anadolu mandası oositlerin aspirasyon sonrası yıkama solüsyonu D-PBS ve TCM-199 + %10 FCS maturasyon medyumunu, T; D-PBS oosit yıkama solüsyonu 35 mm petri, Y; TCM-199 + %10 FCS maturasyon solüsyonu 35 mm yıkama petrisi, D; TCM-199 + %10 FCS droplı 35 mm petri, (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).

3.4.1. In Vitro Maturasyon Solüsyonunun Hazırlanması

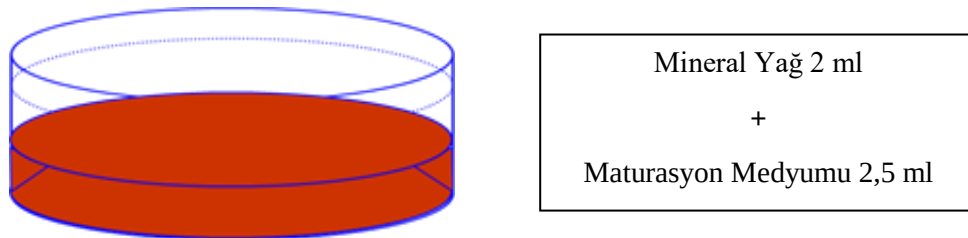
Oositlerin maturasyonu amacıyla kullanılan TCM-199+%10 FCS medyumunu, içeriği çizelge 3.3.'te verildiği gibi hazırlandı. Daha sonra filtre (0,22 mikron, MILLIPORE,

Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland) edildikten sonra 35 mm petrilere 100 mikrolitrelik damlalar hazırlanarak, üzerleri mineral yağ ile kapatıldı. Oositlerin maturasyona alınmasından 2 saat önce CO₂ inkübatörde dengelenmesi sağlandı.

Çizelge 3.4. *In vitro* maturasyon medyumunun içeriği (Akyol 2006, Gasparrini ve ark 2006, Kumar ve Anand 2012, Lemuel ve ark. 2015).

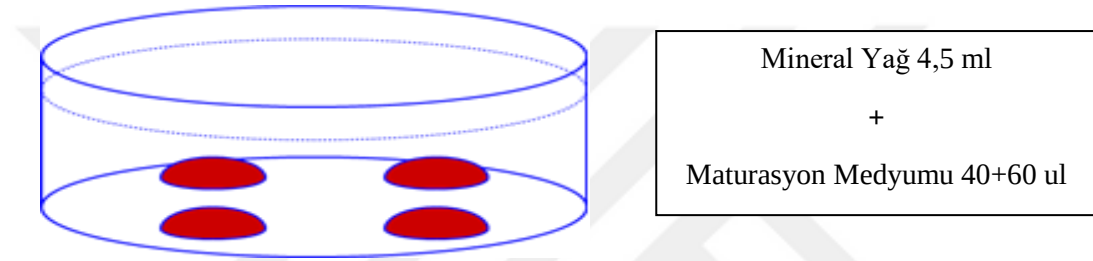
Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
TCM-199	Gibco/12340-030 BRL	45 ml	---
FCS	Sigma- Aldrich F9665	5 ml	---
FSH	Sigma- Aldrich F8174	5 µl	(2 µg /ml)
Na Piruvat	Sigma- Aldrich P4562	25 µl	(5,5 mg/ml)
Epidermal Büyüme Faktörü	Sigma- Aldrich E5056	5 µl	(10 ng/ml)
Antibiyotik	Gibco/Pen Strep 15140	50 µl	(100 IU Penesilin) + (100 µg /0,1 ml Streptomisin)

Ovaryunlardan aspirasyonu yapılan A-B kalitedeki COC yapıları maturasyon işlemine alındı (Gordon 2003, Macun 2004, Akyol ve ark. 2007, Acar 2008, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015). COC'ların yıkama işlemi için yeterli sayıda 35 mm petrilere (normal) 3 ml maturasyon medyumuna (Çizelge 3.4.) konuldu, yine yeterli sayıda 35 mm petriye 2 ml maturasyon medyumuna, üzeri 2 ml mineral yağ ile (Şekil 3.5.) kapatıldı. Yıkama işleminden yaklaşık 2 saat önce kullanılacak medyumlar %95 üzeri nemli 38,5 °C de %5 CO₂ inkübatöre ekilibrasyona bırakıldı (Imai 2005, Akyol 2006, Kaymaz 2015).



Şekil 3.5. Yıkama vasatı hazırlanması ve içeriği (Imai 2005, Akyol 2006, Kaymaz 2015).

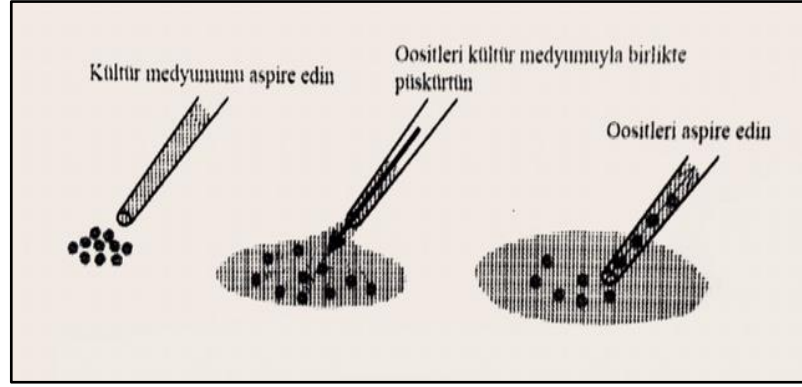
Maturasyon dropları için bir adet 35 mm'lik petri (derin) alınıp içerisine 3 ml %10 FCS+TCM-199 konuldu. Yeterli sayıda 35 mm'lik petriye önce 4 adet 40 µl %5 lik TCM-199 + %10 FCS medyumundan droplar yapıldı. Bunların üzeri tamamen mineral yağ (4,5 ml) ile kapanacak şekilde kapatıldı (Akyol 2006, Kaymaz 2015). Ardından 40 µl'lik dropların üzerine petri içerisine TCM-199 + %10 FCS vasat, 60 µl daha ilave edilerek her drop 100 µl'ye şekil 3.6.'da gösterildiği gibi tamamlandı. Daha sonra bu droplar %95 bağıl nemli 38,5 °C de %5 CO₂ inkübatörüne kaldırıldı ve yaklaşık 2 saat inkübe edildi (Imai 2005, Akyol 2006, Kaymaz 2015).



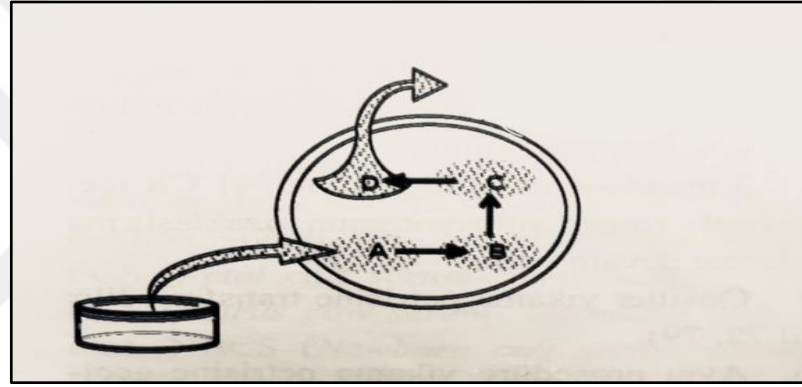
Şekil 3.6. Oosit maturasyon droplarının hazırlanması (Imai 2005, Kaymaz 2015).

3.4.2. Oosit Yıkama ve Maturasyon İşlemi

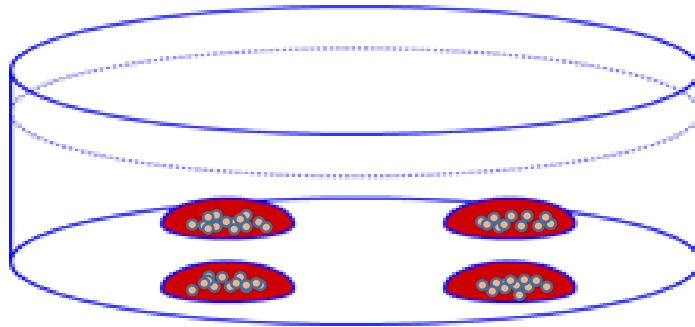
Aspirasyondan sonra elde edilen A-B veya 1-2. kalite özelliklerine sahip oositler %5 FCS'lu D-PBS ile yıkandıktan sonra 35 mm petride bulunan %10 FCS TCM-199 içerisinde dörder kez cam pipet yardımıyla şekil 3.7.'de ve şekil 3.8.'de gösterildiği gibi yıkandı. CO₂ inkübatöründeki petrilere içerisine her dropta ortalama 20 adet oosit olacak şekilde (Şekil 3.9.) paylaştırıldı ve CO₂ inkübatöründe 20-22 saat inkübasyona alındı (Imai 2005, Akyol 2006).



Şekil 3.7. Petri kabında oositlerin yıkanması (Kaymaz 2015).



Şekil 3.8. Petride oositlerin yıkanması ve başka bir petriye aktarılması (Kaymaz 2015).

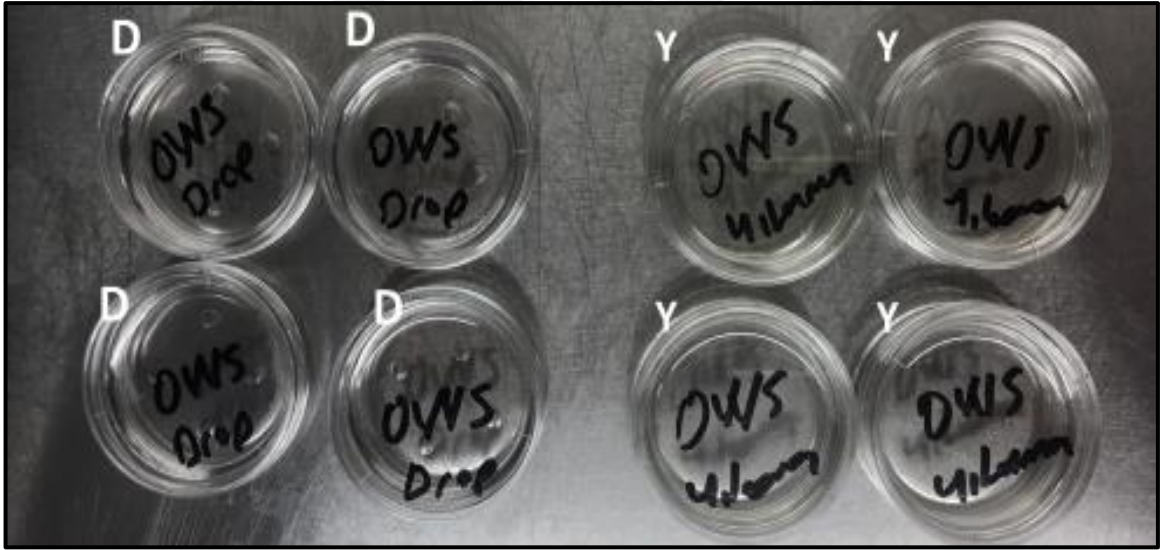


Şekil 3.9. COC'in maturasyon droplarına yerleştirilmesi (Imai 2005).

3.5. In Vitro Fertilizasyon (IVF)

Oositlerin fertilizasyonu amacıyla BO direkt yıkama metoduna uygun olarak solüsyonlar hazırlandı. Dondurulmuş/çözündürülmüş Anadolu mandası boğası spermatozoonlarından kriyoprotektanların uzaklaştırılması, sulandırılması ve kapasitasyonu için modifiye BO solüsyonu kullanıldı.

BO solüsyonu stok A çizelge 3.5.'de ve stok B olarak çizelge 3.6.'da verilen miktarlara göre hazırlandı. Stok A ve stok B buzdolabında +4 °C'de 1 ay boyunca muhafaza edilerek her çalışma için bu stoklardan çizelge 3.7.'de belirtildiği gibi BO ana solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyondan da çizelge 3.8.'deki gibi Oosit Yıkama Solüsyonu (OYS), çizelge 3.9.'daki gibi Sperm Dilüsyon Solüsyonu (SDS) ve çizelge 3.10.'daki gibi Sperm Yıkama Solüsyonu (SYS) hazırlandı. Hazırlanan OWS droplar (5 µl) ve yıkama medyumları (Şekil 3.10.) üzerine mineral yağ kapnadıktan sonra CO₂ İnkübatörüne 2 saat süreyle dengelenmeye bırakıldı.



Şekil 3.10. Anadolu mandası oositlerin fertilizasyonu amacıyla hazırlanan oosit yıkama solüsyonu (OYS), D: OYS droplu 35 mm petri, Y: OYS 35 mm yıkama petrisi (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).

3.5.1. BO Stok ve BO Ana Solüsyonlarının Hazırlanması

Çizelge 3.5. BO stok A solüsyonu (Bracket ve Oliphant 1975).

Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
NaCl	Sigma- Aldrich S5886	2,1546 gr	250 ml için
KCl	Sigma- Aldrich P5405	0,0987 gr	250 ml için
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Sigma- Aldrich C7902	0,2171 gr	250 ml için
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Sigma- Aldrich 71505	0,42 gr	10 ml Distile su ile tamamlanır ve stok solüsyondan 1 ml kullanılır.
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Sigma- Aldrich M2393	0,3485 gr	
Fenol Red	Sigma- Aldrich P3532	100 µl	%5 solüsyon (0,005 tartılır USS ile 1 ml'ye tamamlanır ve bu stoktan 100ul kullanılır)

Çizelge 3.6. BO stok B solüsyonun (Bracket ve Oliphant 1975).

Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
NaHCO ₃	Sigma- Aldrich S5761	1,2936 gr	100 ml için
Fenol Red	Sigma- Aldrich P3532	20 µl	%5 solüsyon (0,005 tartılır USS ile 1 ml'ye tamamlanır ve bu stoktan 20 ul kullanılır)

Çizelge 3.7. BO ana solüsyonu (Bracket ve Oliphant 1975).

Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
BO Stok A	---	76 ml	100 ml için
BO Stok B	---	24 ml	CO ₂ ile muamele edilir
Na Piruvat	Sigma- Aldrich P4562	0,0137	100 ml için
Antibiyotik	Gibco/Pen Strep 15140	100 µl	(100 IU Penisilin) + (100 µg /0,1 ml Streptomisin)

Çizelge 3.8. Oosit yıkama solüsyonu (OYS) (Bracket ve Oliphant 1975).

Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı
BO Ana Solüsyonu	---	40 ml
BSA	Sigma- Aldrich A3311	0,40 gr

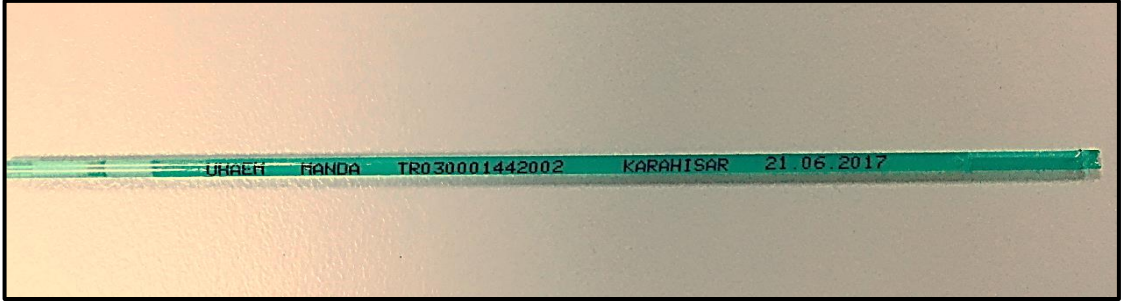
Çizelge 3.9. Sperma dilisyon solüsyonu (SDS) (Bracket ve Oliphant 1975).

Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı
BO Ana Solüsyonu	---	10 ml
BSA	Sigma- Aldrich A3311	0,20 gr

Çizelge 3.10. Sperma yıkama solüsyonu (SYS) (Bracket ve Oliphant 1975).

Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
BO Ana Solüsyonu	---	50 ml	---
Kafein	Sigma- Aldrich C4144	0,20 gr	50 ml için
Heparin	Sigma- Aldrich H3149	50 µl	5000 UI/ml Stoktan

Maturasyonunu tamamlamış Anadolu mandası oositleri BO medyumunu ile direkt yıkama metodu kullanılarak 16-18 saat süreyle fertilizasyonları sağlandı. Bu amaçla, içerisinde yaklaşık 25×10^6 spermatozoon bulunan 0,25 ml'lik payetler halinde dondurulan şekil 3.11. gösterilen Anadolu mandası spermaları kullanıldı.

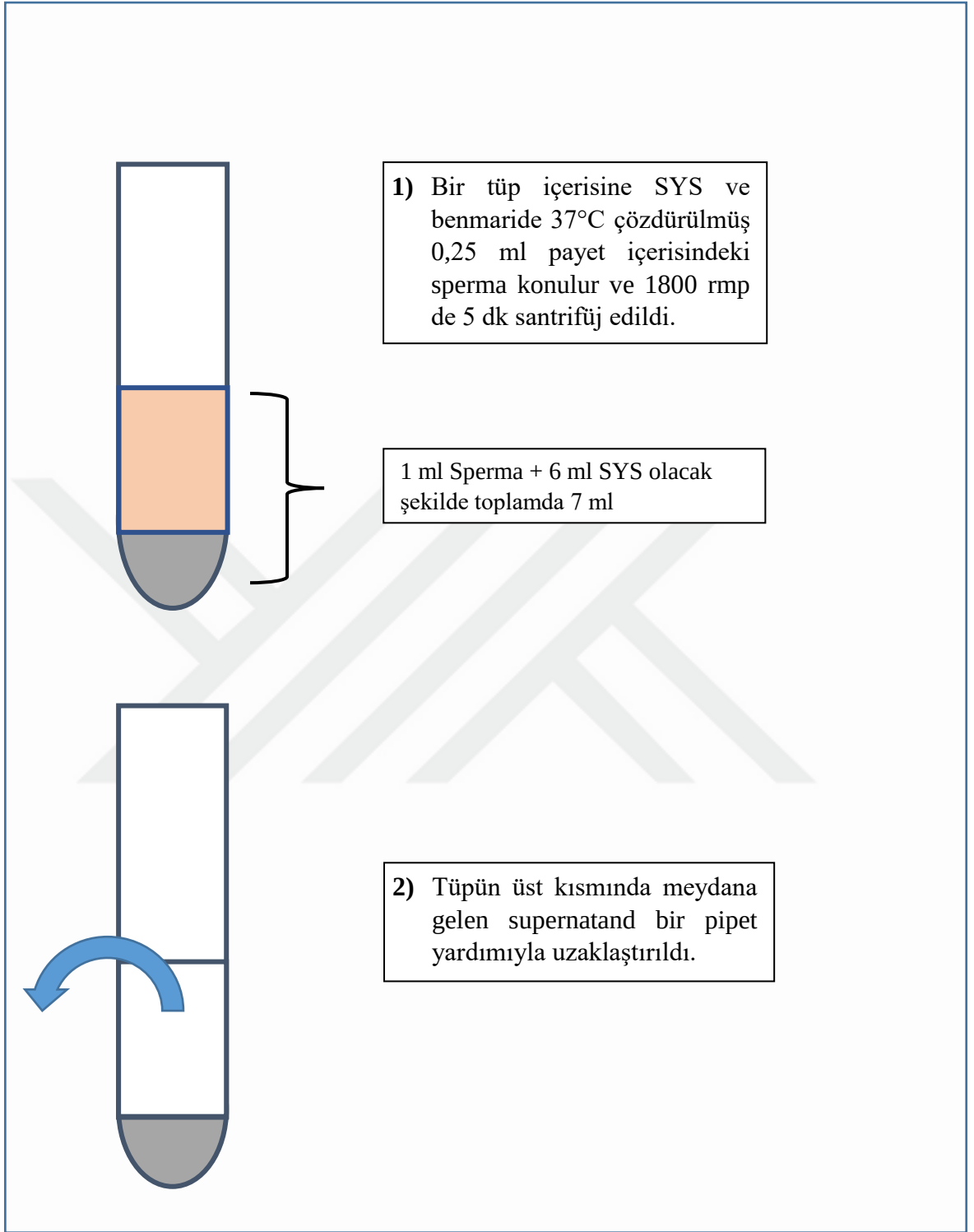


Şekil 3.11. IVF için kullanılan Anadolu mandası sperması 1 adet 0,25 ml payet (UHAEMM 2020).

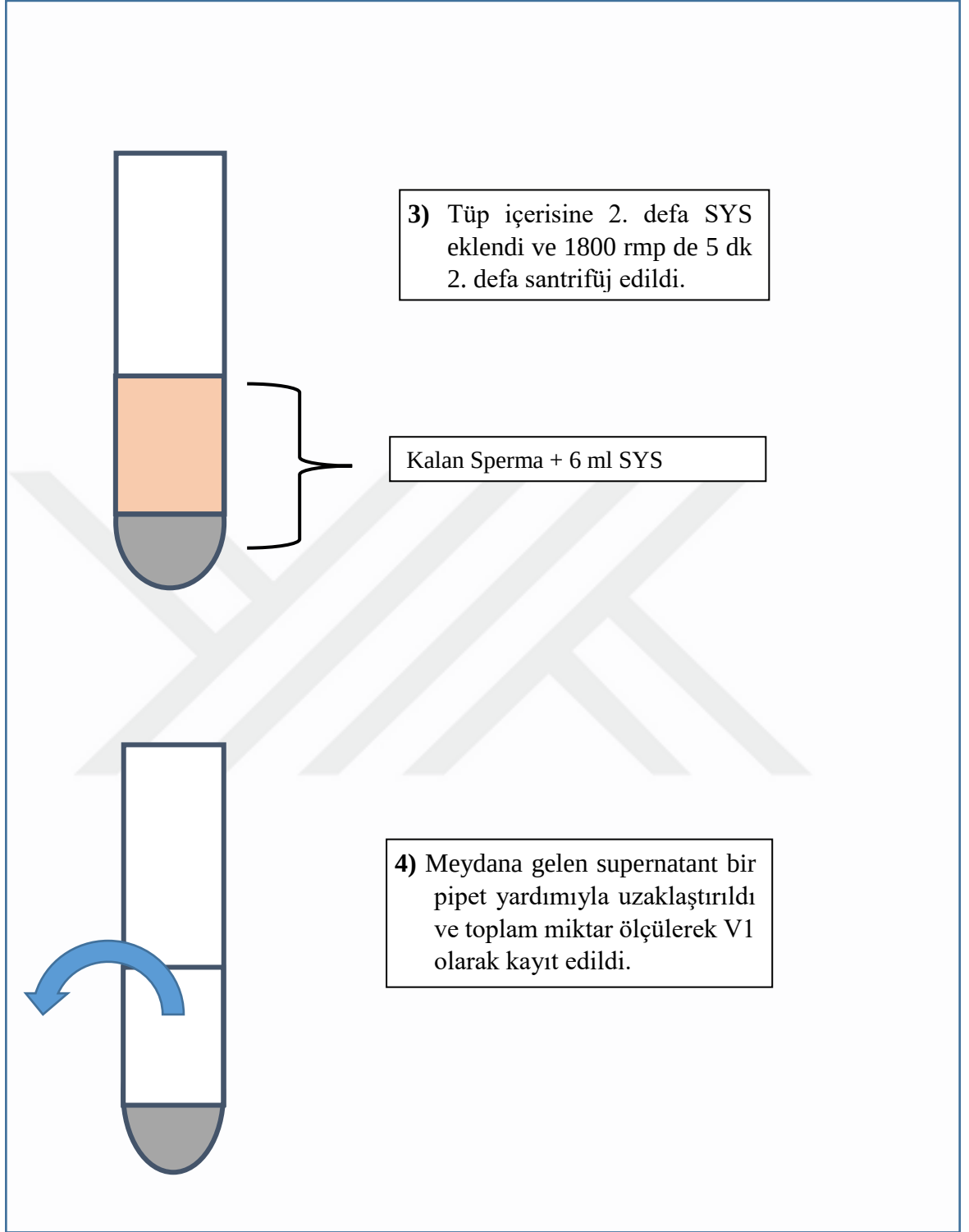
3.5.2. *In Vitro* Fertilizasyon Uygulamasının Yapılışı

Spermatozoonların kapasitasyonu amacıyla SYS içerisinde ml de 5 UI heparin ve 2 μ M kafein kullanıldı. Kapasitasyon ve uygun spermatozoa yoğunluğunun elde edilmesi amacıyla 37°C'deki su banyosunda çözündürülen spermalar (4 payet) üzerine sperm yıkama solüsyonu (SYS) ilave edilerek 1800 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmının ayrılmasının ardından aynı işlemler bir kez daha tekrarlandı. Sperm yıkama solüsyonu (SYS) ile ml de 2×10^6 spermatozoa olacak şekilde yapılan son sulandırma ile oluşturulacak fertilizasyon medyumlarında oositlerin fertilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Bunun için önceden hazırlanan CO₂ İnkübatörüne 2 saat süreyle dengelenmeye bırakılan OWS droplar ve yıkama medyumları (Şekil 3.10.) alınarak her fertilizasyon drobuna 90 μ l şekil 3.14.'de yoğunluğu hazırlanmış sperma kullanıldı.

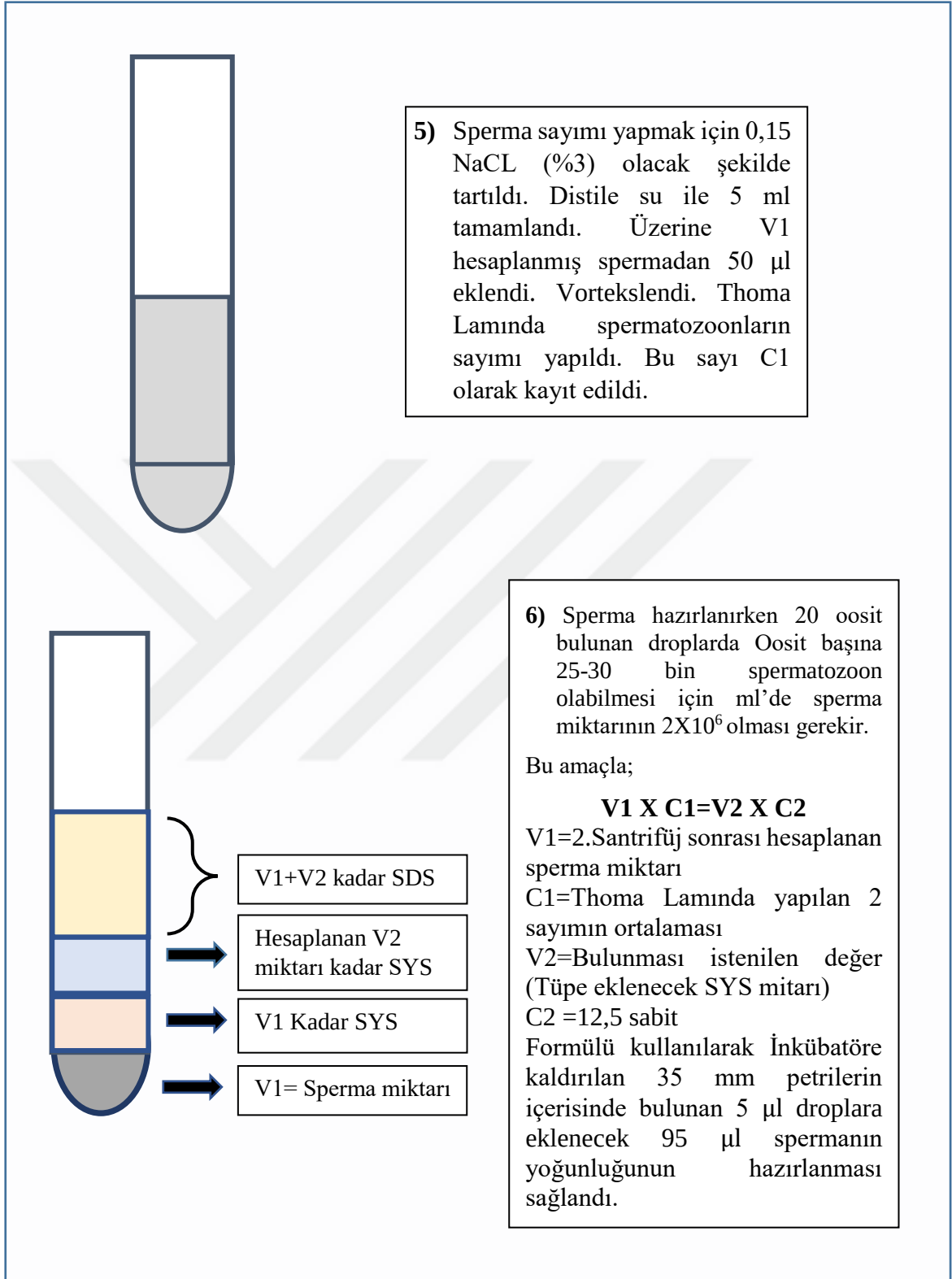
Kullanılan bu spermanın fertilizasyona hazırlama işlemi şekil 3.12., şekil 3.13., şekil 3.14.'te ayrıntılı bir şekilde 6 aşamada aşağıda gösterilmiştir. Hazırlanmış olan sperma 15.000-20.000 Spermatozoa/Oosit oranı olacak şekilde 100 adeti droplarda inkubasyon ortamında (38,5°C de, %5 CO₂ ve %95 bağıl nem) 16-18 saat bekletildi (Şekil 3.15.).



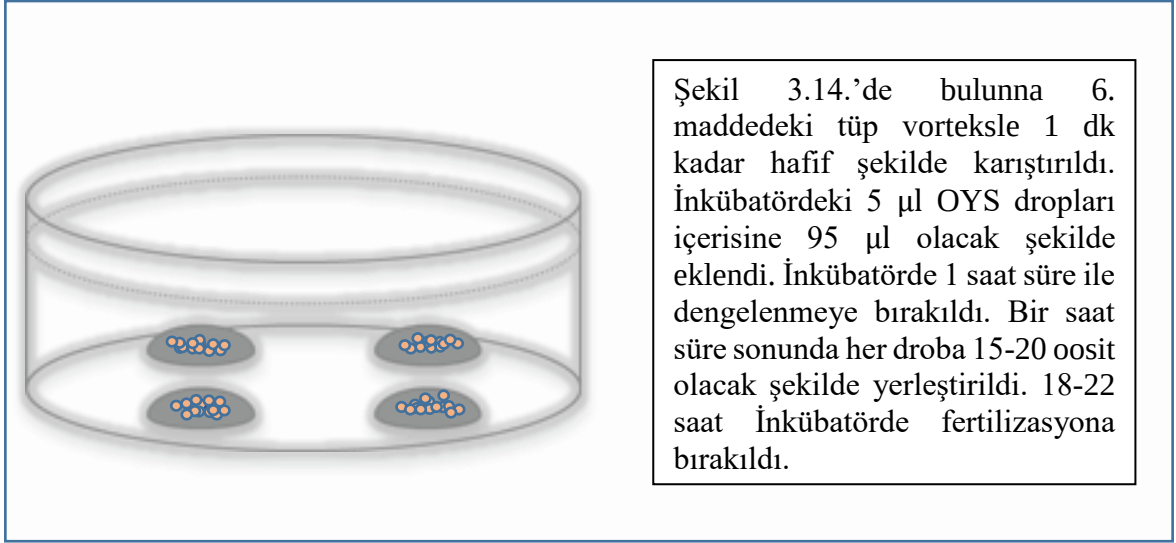
Şekil 3.12. Spermanın fertilizasyona hazırlanması 1. ve 2. aşama (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).



Şekil 3.13. Spermanın fertilizasyona hazırlanması 3. ve 4. aşama (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).



Şekil 3.14. Spermanın fertilizasyona hazırlanması 5. ve 6. aşama (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).



Şekil 3.15. Sperma ve oositlerin droplar içine yerleştirilmesi (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).

3.6. *In Vitro* Kültür (IVC)

Anadolu Mandası oositlerinin 8-9 gün sürecek gelişimlerini sağlamak amacıyla Charles Rosencrans 1 Aminoasit (CR1aa) kültür medyumunu kullanıldı. Anadolu mandası embriyoları için öncelikle çizelge 3.11.'de CR Stok A ve çizelge 3.12.'de gösterildiği gibi CR Stok B solüsyonları hazırlandı. Ardından çizelge 3.13.'de belirtilen şekilde CR1aa ana solüsyonu hazırlandı. Ayrıca fertilizasyon aşamasından sonra kumulus hücreleri mümkün olduğunca hızlı bir şekilde pipetlenerek uzaklaştırılan muhtemel zigotlar %5 FCS içeren CR1aa embriyo kültür medyumlarında yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama için 35 mm petri içerisine 2ml CR1aa kültür medyumuna üzerine 2,5 ml mineral yağ konulan medyum en az 2 saat CO₂ inkübatörde ekilibrasyonda bekletildi. Kültür periyodu için 35 mm'lik petrilerdeki 100 µl CR1aa içeren her droplar şekil 3.16. ve şekil 3.17.'de gösterildiği gibi hazırlandı. Üzerine 4,5 ml mineral yağla kaplandı. Hazırlanan petriler 38,5°C de, %5 CO₂, %98 bağıl nemli CO₂ inkübatörde en az 2 saat ekilibrasyonda bekletildi. Her droba 20 oosit üzerine olacak şekilde CO₂ inkübatörde 10 gün boyunca kültüre edildi. Aşağıda Embriyo kültür medyumunun hazırlanması ve dropların meydana getirilmesi ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

3.6.1. CR1aa Kùltür Medyumunun Hazırlanması

Çizelge 3.11. CR stok A solüsyonunun hazırlanması (Rosenkrans ve ark. 1990).

Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
NaCl	Sigma- Aldrich S5886	1,6757 gr	190 ml için
KCl	Sigma- Aldrich P5405	0,0577 gr	190 ml için
Na Piruvat	Sigma- Aldrich P4562	0,0110 gr	190 ml için
NaHCO ₃	Sigma- Aldrich S5761	0,5503 gr	190 ml için
Fenol Red	Sigma- Aldrich P3532	0,5 ml	%5 solüsyon (0,005 tartılır USS ile 1 ml'ye tamamlanır ve bu stoktan 0,5 ml kullanılır)

Çizelge 3.12. CR stok B solüsyonunun hazırlanması (Rosenkrans ve ark. 1990).

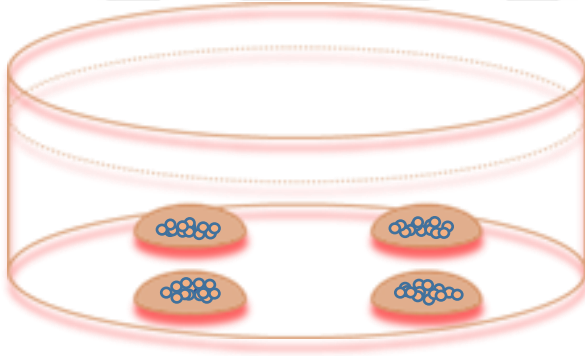
Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
Hemikalsiyum Laktat	Sigma- Aldrich L4388	0,1499 gr	50 ml için

Çizelge 3.13. CR1aa ana solüsyonunun hazırlanması (Rosenkrans ve ark 1990).

Kimyasal	Ürün Adı ve Kodu	Miktarı	Açıklama
CR Stok A	---	38 ml	50 ml için
CR Stok B	---	10 ml	50 ml için
BME (Beta Merkapt Etanol)	Sigma-Aldrich B6766	1 ml	50 ml için
MEM (Non Essential Amino Acid)	Sigma-Aldrich M7145	0,5 ml	50 ml için
L- Glutamin	Sigma-Aldrich G8540	0,5 ml	0,01 g tartılır 5 ml Stok solüsyon hazırlanır.
BSA (Fatty Acid Free)	Sigma-Aldrich A7030	0,15g	50 ml için
Antibiyotik	Gibco/Pen-Strep 15140	50 µl	(100 IU Penisilin) + (100 µg /0,1 ml Streptomisin)
FCS	Sigma- Aldrich F9665	%5 (2,5 ml)	2,5 ml medyum uzaklaştırılır.



Şekil 3.16. Anadolu mandası embriyo kültürü amacıyla hazırlanan kültür medyumunu, Y: CR1aa 35 mm yıkama petrileri, D: CR1aa droplu 35 mm petrileri (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).



CO₂ İnkübatöründe 35 mm petriler içerisinde, üzeri 4,5 ml mineral yağ ile kaplı 100 µl dropları halinde bulunan CR1aa kültür solüsyonu, 6-12 saat dengelenmede bekletildi. Süre sonunda dropları içerisinde her droba 15-20 oosit olacak şekilde yerleştirildi. ardından 10 günlük kültür için CO₂ inkübatörüne konuldu.

Şekil 3.17. Anadolu mandası oositleri fertilizasyon bitiminde temizleme işlemi yapılarak CR1aa kültür medyumuna yerleştirilmesi (Imai 2005, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015).

3.7. Değerlendirme

Anadolu mandalarında elde edilen toplam oosit sayısı, A-B kalite oosit sayısı, C kalite ve dejenere oosit sayısı, maturasyona alınan oosit sayısı, mature olmuş oosit sayısı, fertilizasyona alınan oosit sayısı, fertilizasyon meydana gelmiş oosit sayısı, kültüre alınan

oosit sayısı ve oranı, 24.-48. saat bölünme sayısı, 24.-48. saat bölünme oranı, 96. saat (4. gün) morula, kompakt morula sayısı, 96. saat (4. gün) morula, kompakt morula oranı, expanded blastosist oranı, 8.-10. gün hatched blastosist sayısı, 8.-10. gün hatched blastosist oranı, şeklinde belirtilen oosit kalitesi, embriyo gelişim parametreleri ve embriyo kaliteleri belirlendi.

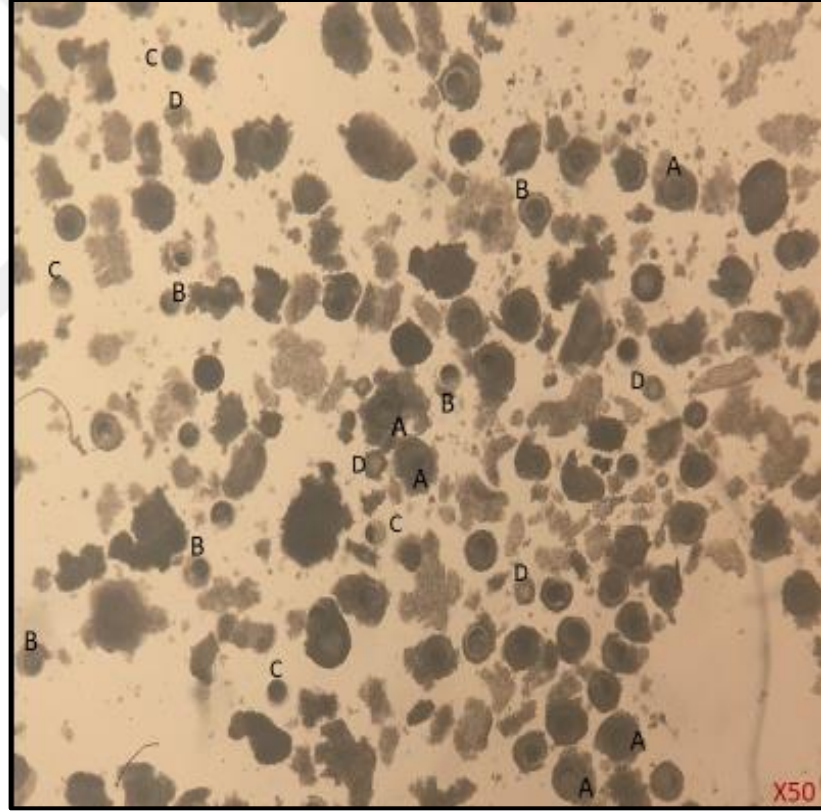
3.8. İstatistik Analizler

Çalışmada elde edilen veriler tanımlayıcı istatistikler kullanılarak hesaplandı. Bunun için 6 farklı uygulamadan elde edilen verilerin tamamının aritmetik ortalaması alındı. Çeşitli aşamalardan elde edilen sonuçlar yüzde (%) frekans olarak hesaplanarak tablolar oluşturuldu. Bu analizler için Office EXCEL 2010 ve Minitab 16 paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Anadolu Mandası Ovaryum Aspirasyon Bulguları

Yapılan çalışmada mezbahada farklı zamanlarda kesilen toplam 92 baş Anadolu mandasına ait 184 adet ovaryum uygun şartlar altında laboratuvara getirilerek kullanıldı. Ovaryumlar mezbahada kesilen Anadolu mandalarından kesimlerini müteakip en kısa sürede alındı. Ovaryumlar üzerinde bulunan yağ ve yabancı dokular uzaklaştırıldı. Azami süre (3-4 saat) içerisinde müdürlüğümüz IVF-ET laboratuvarına getirildi.



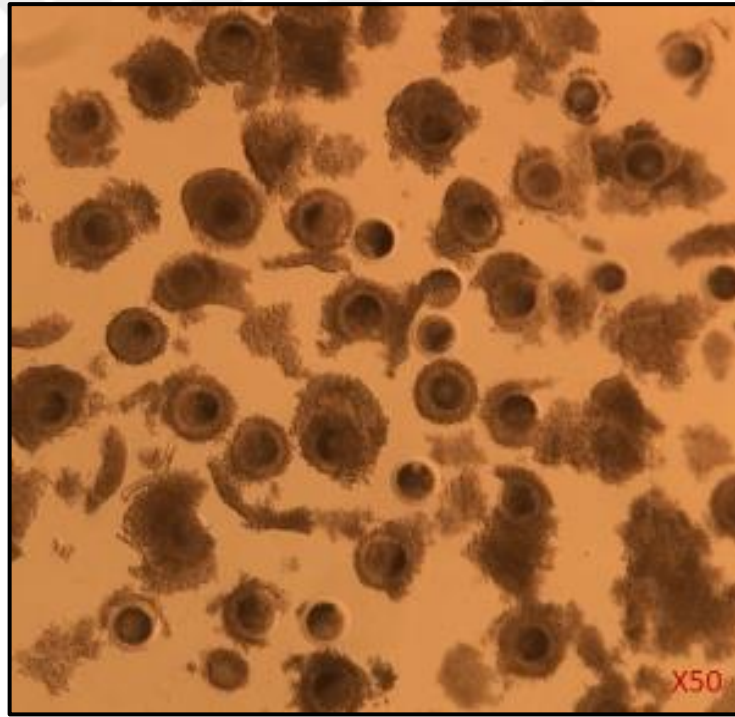
Şekil 4.1. Anadolu mandasından elde edilen oositler D-PBS içerisinde her harf simgelediği kalite sınıflandırmasını ifade etmekte, D dejenere oositleri ifade etmektedir (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020).

Laboratuvara getirilen ovaryumlardan toplam 395 adet oosit elde edildi. Hayvan başına ortalama 4,29 oosit aspire edilirken, ovaryum başına ortalama 2,15 adet oosit elde edildi. Toplam oositlerin 334 adedi A+B kalitede, 61 adedi C kalite ve dejenere durumdaydı.

Toplam A+B kalite oosit oranı %84,56, C ve Dejenere oosit oranı %15,44 olarak belirlendi. Ovaryum başına ortalama 1,81 adet A+B kalite oosit, 0,33 adet C kalite ve dejenere oosit elde edildiği görüldü.

Çizelge 4.1. Anadolu mandasından elde edilen ovaryum ve oositler.

PARAMETRE	Toplam	Oran (%)	Hayvan Başına Oosit	Ovaryum Adedi Oosit
Ovaryum Sayısı	184	-	-	-
A+B kalite oosit	334	84,56	3,63	1,81
C+ Dejenere kalite oosit	61	15,44	0,67	0,33
Genel	395	-	4,29	2,14



Şekil 4.2. Anadolu mandası oositleri, TCM-199 solüsyonunda maturasyon için hazırlanmış farklı kalitede oositler (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020).

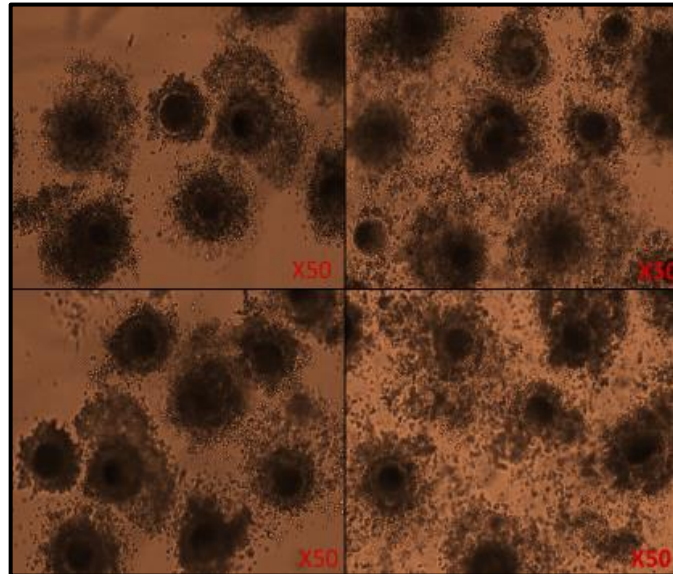
4.2. Anadolu Mandası *In Vitro* Maturasyon Bulguları

Maturasyona alınan 334 adet oositten 329 adedinin kumulus ekspansiyonu ve hücre homojenliklerine bakılarak mature olduğu tespit edildi ve maturasyon oranı %98,50 oldu. Oositlerden 5 adedinin dejenere olduğu görüldü. Maturasyon bulgusu gözlenmeyen oositlerin oranı %1,49 olarak gerçekleşmiş oldu (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Anadolu mandası oositlerinde *in vitro* maturasyon sonuçları.

PARAMETRE	Sonuç
Toplam maturasyona alınan oosit sayısı	334
Mature olan oosit sayısı	329
Mature olan oosit oranı (%)	98,50
Mature olmayan oosit sayısı	5
Mature olmayan oosit sayısı ve oranı (%)	1,49

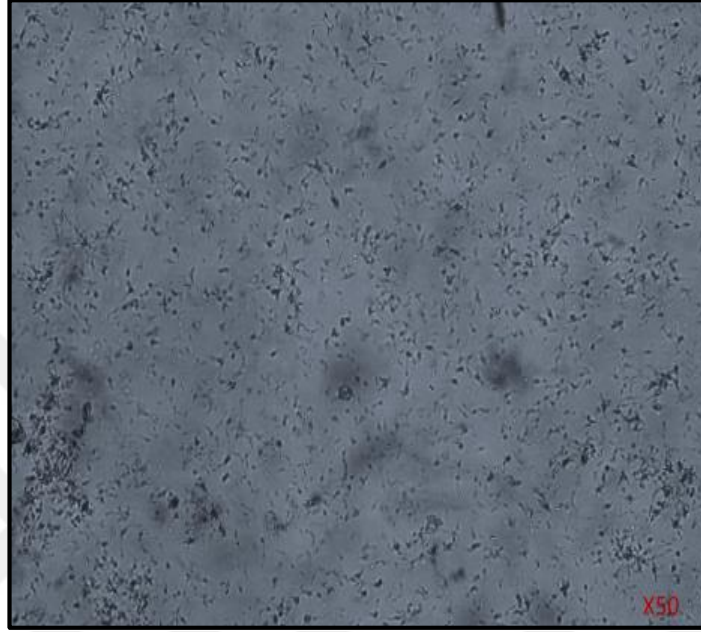
Anadolu mandalarının oositlerine ait ve farklı replikasyonlardan alınmış maturasyon periyodundan sonra droplardan alınmış görüntüleri şekil 4.3.'de bir arada verilmiştir.



Şekil 4.3. Maturasyon periyodu sonu Anadolu mandası oositleri (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020).

4.3. Anadolu Mandası *In Vitro* Fertilizasyon Bulguları

Fertilizasyon işlemi için şekil 3.10.'da anlatıldığı gibi hazırlanmış Anadolu mandası spermasının fertilizasyon dropları içerisindeki görüntüleri şekil 4.4.'de verilmiştir.



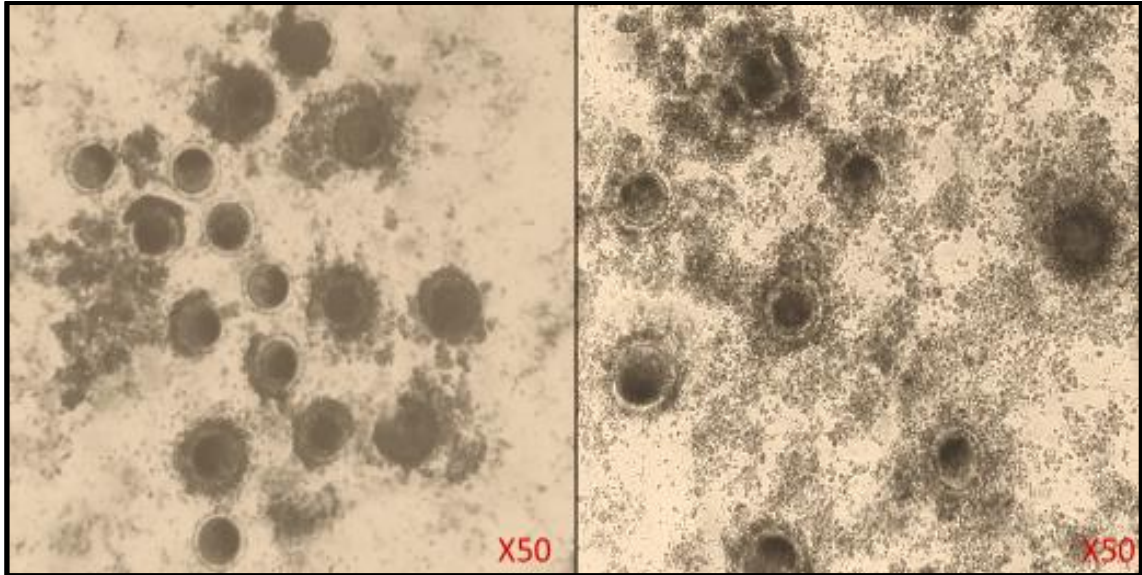
Şekil 4.4. OYS drop içerisinde CO₂ İnkübatörde 2 saat süreyle bekletilmiş fertilizasyona hazır Anadolu mandası spermatozonları (Stereo Mikroskop, OLYMPUS SZH10, X50, UHAEM, Ankara, 2020).

Maturasyonu gerçekleşmiş 334 adet oosit fertilizasyon sürecine alındı. Yaklaşık olarak 16-18 saatlik bir fertilizasyon periyodunun ardından bazı oositlerde II. polar cismin varlığı tespit edilebildi (Şekil 4.4). İlk kontrollerde *in vitro* fertilizasyona 334 adet oositin 5 adedi fertilizasyon gerçekleşmediği, 21 adedinin dejenerasyona uğradığı görüldü. Bu aşamada 308 adet oositin fertilizasyonu gerçekleştiği varsayılarak bir IVC aşamasına geçildi (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Anadolu mandasında *in vitro* fertilizasyon bulguları.

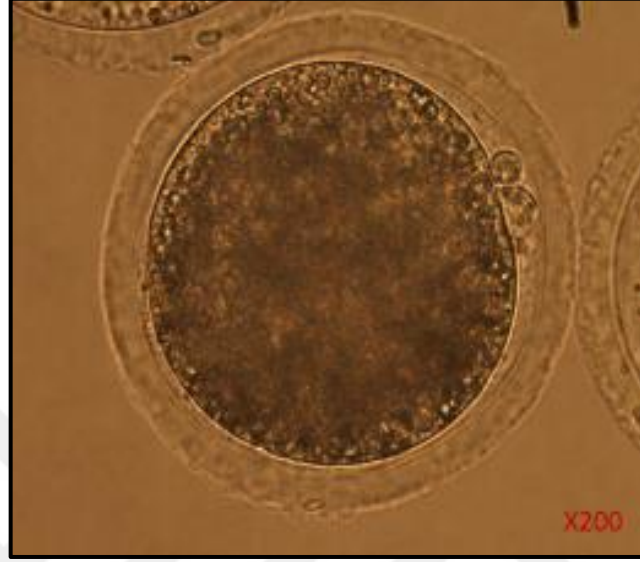
PARAMETRE	Sonuç
Toplam fertilizasyona alınan oosit sayısı	334
Fertilizasyon işlemi tamamlanan oosit sayısı	308
Fertilizasyon işlemi tamamlanan oosit oranı (%)	92,2
Fertilizasyona alınmayan oosit sayısı	5
Fertilizasyona alınmayan oosit oranı (%)	1,49
Dejenerasyon meydana gelen oosit sayısı	21
Dejenerasyon meydana gelen oosit oranı (%)	6,28

Bu aşamada bütün oositlerin II. polar cisim kontrolleri tamamında yapılamamıştır. Bunun nedeni oositlerin dış ortamda uzun süre bekletilmelerinin kültürdeki gelişmelerini olumsuz yönde etkileyerek kültür veri sonuçlarının etkilemesidir (Ramesha ve ark. 2000, Abdoon ve ark. 2001, Rubessa ve ark. 2019). Anadolu mandalarının oositlerine ait ve farklı replikasyonlardan fertilizasyon periyodundan sonra farklı zamanlarda droplardan alınmış görüntüleri şekil 4.5.'de bir arada verilmiştir.

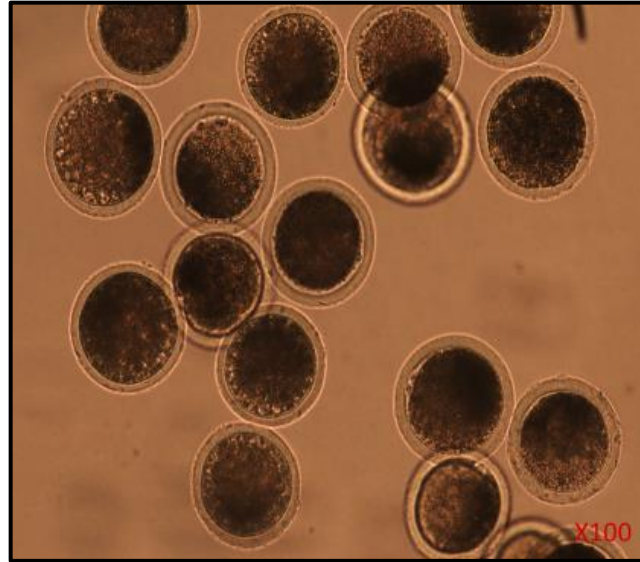


Şekil 4.5. Fertilizasyon dropları içerisinde spermatozonlar ve oositler. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X50, UHAEM, Ankara, 2020).

Anadolu mandalarının oositlerine ait ve farklı zamanlarda alınmış fertilizasyon işleminden sonra kumuluş hücreleri pipetasyon işlemi ile uzaklaştırıldıktan sonra görüntüleri şekil 4.6.'da ve şekil 4.7.'de, ayrı ayrı verilmiştir.



Şekil 4.6. Fertilizasyon gerçekleşmiş bir oosit ve çift polar cisim. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020).



Şekil 4.7. Fertilize oositler. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X100, UHAEM, Ankara, 2020).

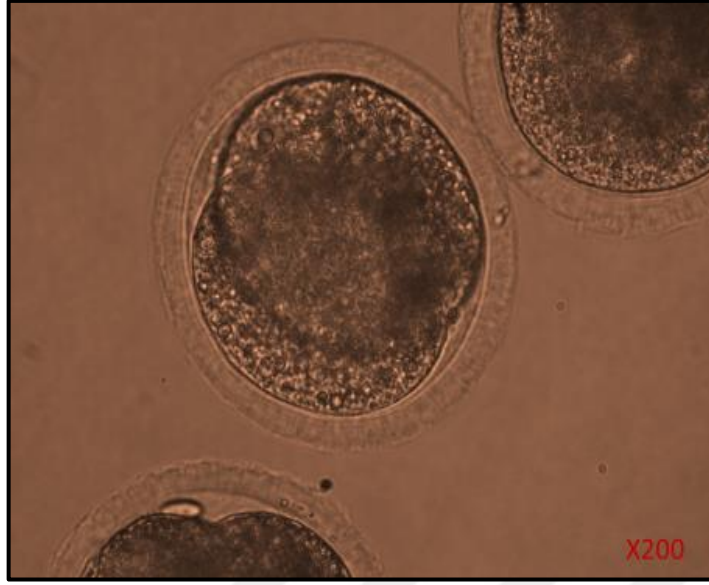
4.4. In Vitro Kùltür Bulguları

Fertilizasyon süresi bitiminden sonra 308 adet muhtemel zigot CR1aa içerisinde pipetasyon işlemi yapılarak temizlendi. Zigot olarak kabul edilen 308 adet embriyo CR1aa kùltürüne alındıktan itibaren 24. saatte yapılan mikroskobik incelemelerde, iki ve daha çok sayıda bölünme gözlemlenen 93 adet oositte fertilizasyon gerçekleştiği kabul edildi. Anadolu mandası oositlerinde CR1aa kùltürde ilk 24. saat bölünme oranı %30,19, bölünme gerçekleşmeyen oosit sayısı ve oranı 215 (%69,81) olarak gerçekleşti (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Anadolu mandası *in vitro* kùltür 24. saat bulguları.

PARAMETRE	Sonuç
Toplam kùltüre alınan oosit sayısı	308
Bölünme gerçekleşen oosit (fertilizasyon) sayısı	93
Bölünme gerçekleşen oosit (fertilizasyon) oranı (%)	30,19
Bölünme gerçekleşmeyen oosit ve UFO sayısı	215
Bölünme gerçekleşmeyen oosit ve UFO oranı (%)	69,81

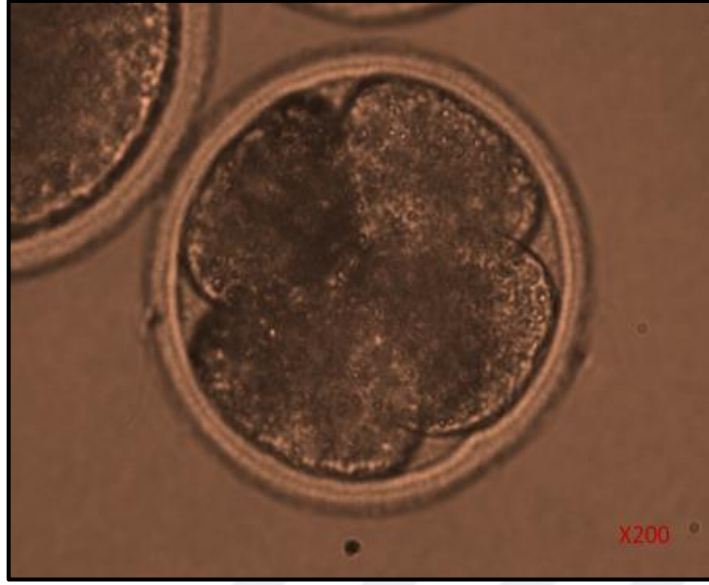
Anadolu mandalarının oositlerine ait ve farklı zamanlarda alınmış kùltür periyodunun ilk 24. saatinde bölünme sürecinde tespit edilmiş embriyo şekil 4.8.'de, ilk bölünme sürecini tamamladığı tespit edilmiş embriyo ve Zona Pelusida'ya penetre olmuş spermatozoon kalıntıları şekil 4.9.'da, 24. saat bölünme tespit edilmiş dört hücreli bir embriyo şekil 4.10.'da, 24. saat bölünmeler drop içerisinde toplu halde görüntüleri şekil 4.11.'de ayrı ayrı verilmiştir.



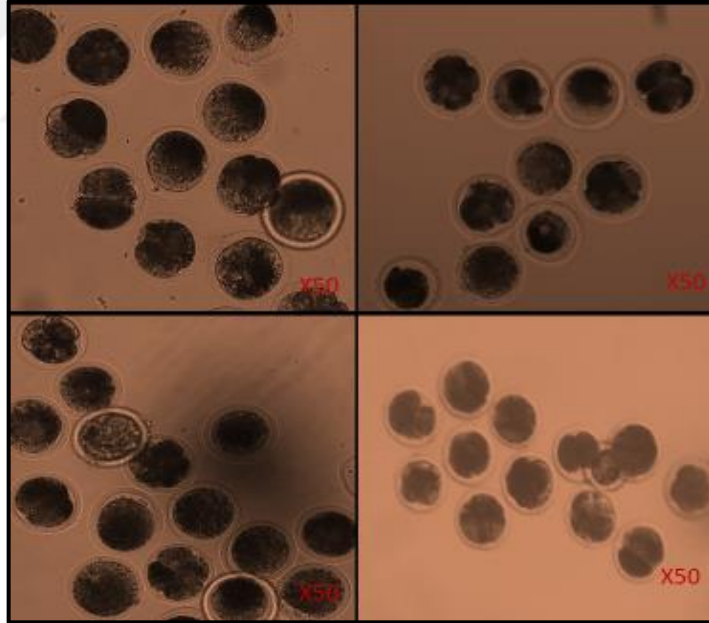
Şekil 4.8. *In vitro* kültür 24. saat bölünme sürecinde tespit edilmiş manda zigotu. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020).



Şekil 4.9. Anadolu mandasından *in vitro* kültür 24. saat ilk bölünme sürecini tamamladığı tespit edilmiş zigot, Oklar; Zona Pelusida'ya penetre olmuş spermatozoon kalıntıları. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020).



Şekil 4.10. Anadolu mandasından *in vitro* kültür 24. saat bölünme tespit edilmiş dört hücreli bir embriyo. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020).



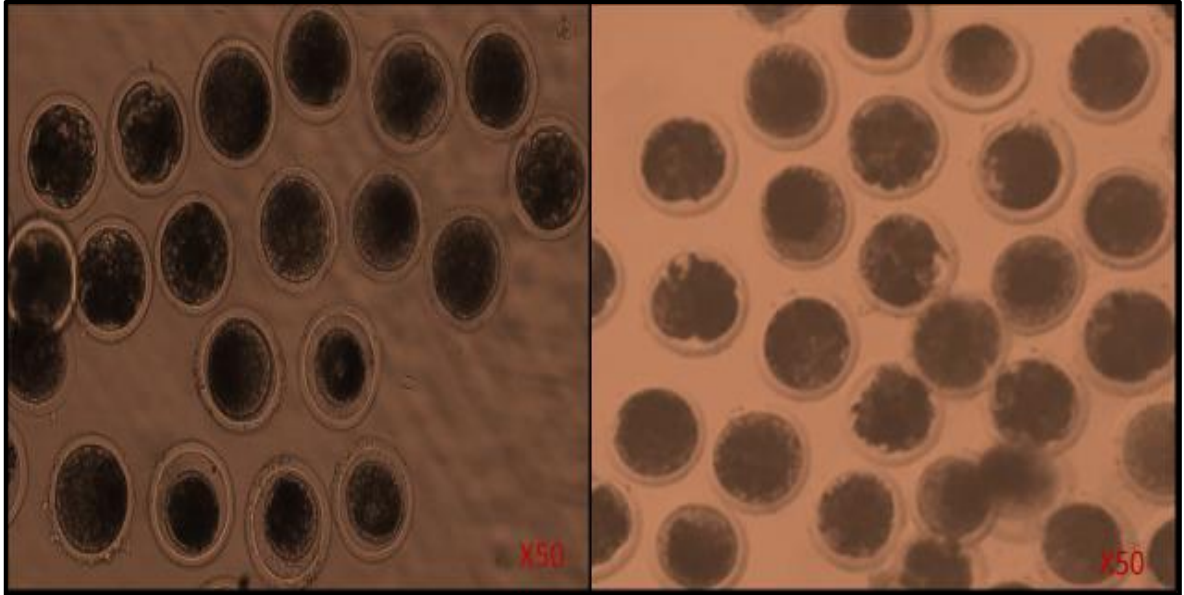
Şekil 4.11. *In vitro* kültür 24. saat bölünmeler. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020).

Anadolu mandası embriyoları CR1aa kültürüne alınışından itibaren 96.saatte (4. günde) yapılan mikroskopik incelemelerde, morula, kompakt morula sayıları 53 ve kültüre alınan oosit sayısına oranı ise %17,21 olarak gerçekleşti (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Anadolu mandası *in vitro* kültür 96. saat (4. gün) bulguları.

PARAMETRE	Sonuç
Toplam kültüre alınan oosit sayısı	308
Kültüre alınan oositlerin, Morula oluşturma sayısı	53
Kültüre alınan oositlerin, Morula oluşturma oranı (%)	17,21
Kültüre alınan oositlerin, Morula oluşturmama sayısı	255
Kültüre alınan oositlerin, Morula oluşturmama oranı (%)	82,79
Bölünen embriyoların, Morula olamayan embriyo sayısı	40
Bölünen embriyoların, Morula olamayan embriyo oranı (%)	43,01

Anadolu mandalarının embriyolarına ait ve farklı zamanlarda alınmış kültür periyodunun 96. saat görüntüleri şekil 4.12.'de bir arada verilmiştir.

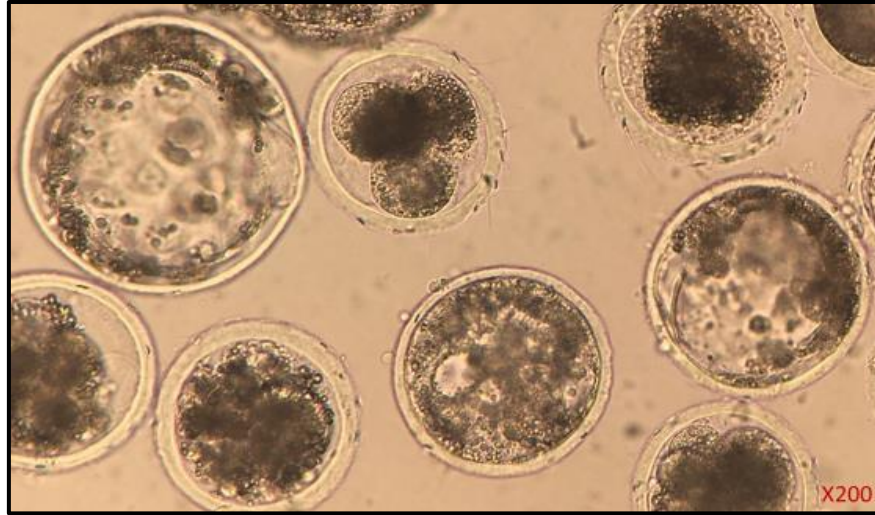


Şekil 4.12. *In vitro* kültür 96. saat (4. gün) morula, kompakt morula görüntüleri. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020).

Çizelge 4.6. Anadolu mandası *in vitro* kültür 7. gün bulguları.

PARAMETRE	Sonuç
Toplam kültüre alınan oosit sayısı	308
Toplam blastosist sayısı	29
Toplam blastosist oranı (%)	9,42
Blastosist olamayan zigot sayısı	64
Blastosist olamayan zigot oranı (%)	68,8
Dejenere ve Unfertilize Oosit (UFO) sayısı	285
Dejenere ve Unfertilize Oosit (UFO) oranı (%)	69,8

Anadolu mandası embriyoları CR1aa kültürüne alınışından itibaren 7. günde yapılan mikroskopik incelemelerde erken blastosist, blastosist, expanded blastosist sayısı 29 ve erken blastosist, blastosist, expanded blastosist oranı %9,42 oldu. Blastosist olamayan zigot sayısı 64 (%68,6), dejenere ve unfertilize ova sayısı ve oranı 285 (%69,8) tespit edildi (Çizelge 4.6.). Anadolu mandası embriyolarına ait ve farklı zamanlarda alınmış kültür periyodunun 7. gün görüntüleri şekil 4.13.'de verilmiştir.



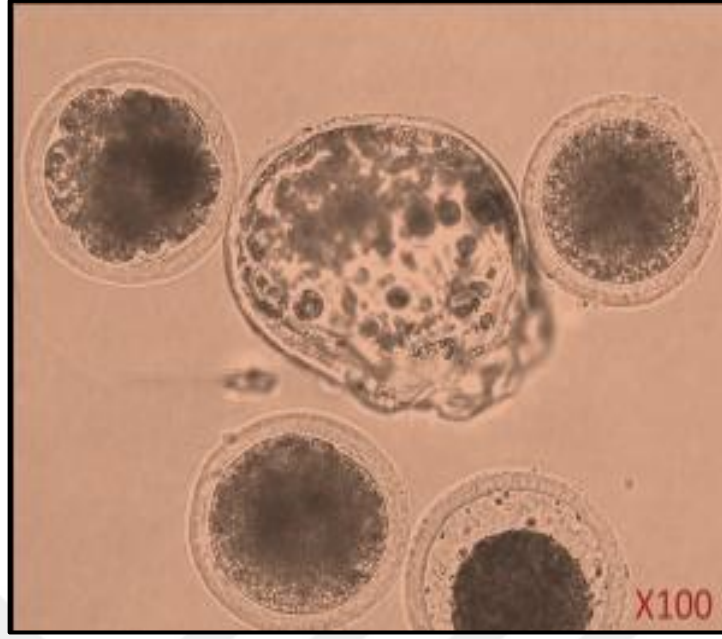
Şekil 4.13. Anadolu mandasında *in vitro* kültür 7. gün farklı kalitelerde blastosist görüntüleri. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X200, UHAEM, Ankara, 2020).

Anadolu mandası embriyoları CR1aa kültürüne alınışından itibaren 8.-10. günlerde yapılan mikroskopik incelemelerde hatching ve hatched blastosist sayısı 12 ve oranı ise %3,89 oldu. Bölünme gerçekleşen embriyo sayısı üzerinden hatching ve hatched blastosist oranı ise %12,9 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.7.).

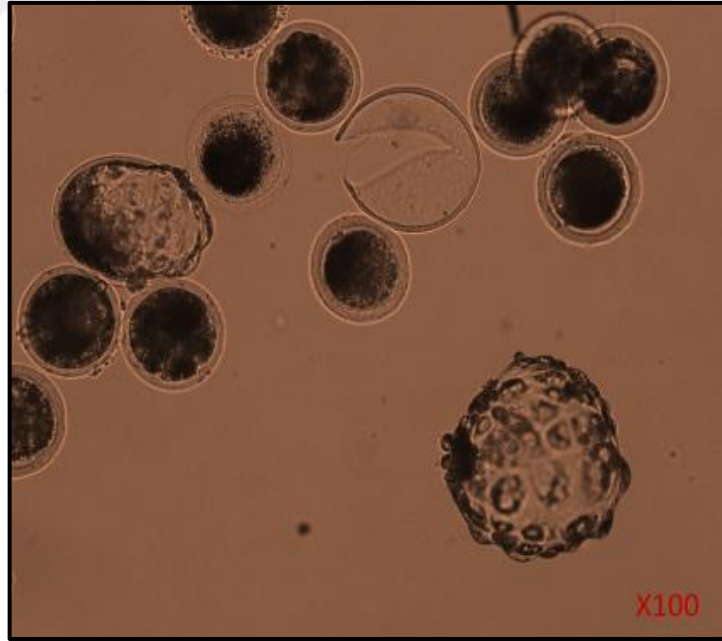
Çizelge 4.7. Anadolu mandası *in vitro* kültür 8.-10. gün hatched blastosist bulguları.

PARAMETRE	Sonuç
Toplam kültüre alınan oosit sayısı	308
Toplam oositlerde hatched blastosist sayısı	12
Toplam oositlerde hatched blastosist oranı (%)	3,89
Bölünme gerçekleşen olan oosit sayısı	93
Bölünen oositlerde hatched blastosist sayısı	12
Bölünen oositlerde hatched blastosist oranı (%)	12,9
Toplam elde edilen blastosist sayısı	29
Toplam blastosistten hatched blastosiste erişme sayısı	12
Toplam blastosistten hatched blastosiste erişme oranı (%)	41,37
Hatched blastosist olamayan embriyo sayısı ve oranı	81
Hatched blastosist olamayan embriyo sayısı ve oranı (%)	87,09

Anadolu mandalarının embriyolarına ait ve farklı zamanlarda alınmış kültür periyodunun 8.-10. gün görüntüleri şekil 4.14.'de, şekil 4.15.'de ve şekil 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.14. Anadolu mandasında *in vitro* kültür 8.-10. gün hatching blastosist görüntüsü. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X100, UHAEM, Ankara, 2020).



Şekil 4.15. Anadolu mandası *in vitro* kültür 8.-10. gün hatching ve hatched blastosist bir arada görüntü. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X100, UHAEM, Ankara, 2020).

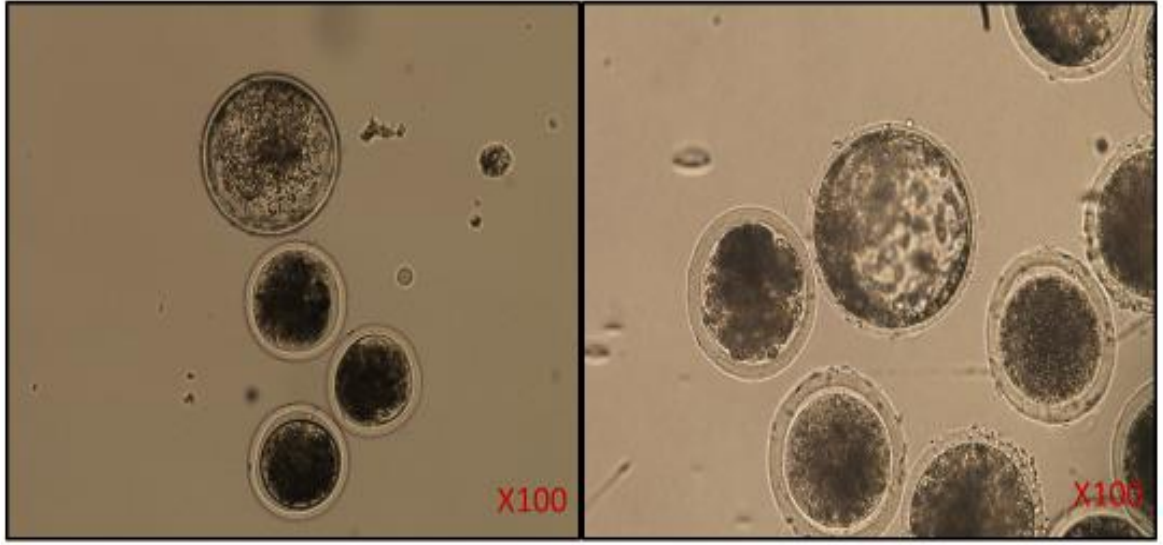
4.5. Anadolu Mandasında Embriyo Kalite Sınıflandırması

Anadolu mandası embriyoları CR1aa kültürüne alınışından itibaren 7. günde yapılan mikroskop kontrolünde 29 adet blastosistten 7 adedi (%24,13) 1. kalitede (mükemmel), 9 adedi (%31,03) 2. kalite (iyi), 8 adedi (%27,50) 3. kalite (vasat), 5 adedi (%17,24) 4. kalitede (Zayıf) olarak sınıflandırıldı. Elde edilen toplam embriyolar içerisinde transfer edilebilir kalitede (1. ve 2. kalite embriyo sayısı) embriyo sayısı 16 adet, oranı %55,17 olmuş, vasat ve zayıf kalitede 13 adet embriyo, bunların oranı ise %44,74 bulunmuştur (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. Anadolu mandasında *in vitro* kültür 7. gün embriyolarda kalite sınıflandırılması.

PARAMETRE	Sonuç
Toplam kültüre alınan oosit sayısı	308
Toplam elde edilen embriyo sayısı	29
Toplam transfer edilebilir embriyo sayısı	16
Toplam transfer edilebilir embriyo oranı (%)	55,17
1. Kalite (mükemmel kalite) embriyo sayısı	7
1. Kalite (mükemmel kalite) embriyo oranı (%)	24,13
2. Kalite (iyi kalite) embriyo sayısı	9
2. Kalite (iyi kalite) embriyo oranı (%)	31,03
3. Kalite (vasat kalite) embriyo sayısı	8
3. Kalite (vasat kalite) embriyo oranı (%)	27,50
4. Kalite (zayıf kalite) embriyo sayısı	5
4. Kalite (zayıf kalite) embriyo oranı (%)	17,24

Anadolu mandasında *in vitro* kültür 7. gününde farklı uygulamalardan alınmış mükemmel ve iyi kalitede blastosist görüntüleri şekil 4.16.'de verilmiştir.



Şekil 4.16. *In vitro* kültür 7. gün mükemmel ve iyi kalitede blastosist görüntüleri. (Mikromanipilatör, NIKON ECLIPSE TE300, X100, UHAEM, Ankara, 2020).

5. TARTIŞMA

Dünyada son yıllarda manda yetiştiriciliğinde, özellikle damızlık üretimi amacıyla ST, ET, OPU, IVF gibi yardımcı üreme teknikleri kullanılmaktadır (Warriach ve ark. 2015, Duran ve ark. 2017, Rubessa ve ark. 2019). Mandalarda ST, süperovülasyon ve ET teknolojileri birleştirilerek üstün verimli hayvanların üretiminin arttırılması, süt yönlü seleksiyon yapılması ve genetik gelişimi artırılmasına çalışılmaktadır (Cruz ve ark. 1991, Baruselli ve ark. 2020, Kumar ve ark. 2020). Yapılan bu çalışmada resmi kayıtlarda ve literatürde bulunmayan Anadolu mandasına ait *in vitro* emriyo üretimi potansiyeli araştırıldı. Bu nedenle tartışmanın büyük kısmı Anadolu mandasına ait IVF ve embriyo üretim verisi resmi olarak bulunmadığından dünyada yetiştiriciliği yapılan başka manda ırkları ile gerçekleştirildi.

Farklı oosit elde etme yöntemleri olmasına rağmen (OPU, LOPU) mezbaha kaynaklı oositlerin *in vitro* embriyo üretiminde yaygın bir uygulama alanı bulunmaktadır. Bunun nedeni ucuz ve bol miktarda oosit kaynağı olmasıdır. Oosit elde etme tekniği olarak folikül aspirasyonu, ovaryumların kesilmesi ve diseksiyonu, foliküllerin patlatılması (Das ve ark. 1996), uygulanmaları mevcut olsa da aspirasyon yöntemi en yaygın olarak kullanılır (Kumar ve Anand 2012). Bu çalışma mezbahadan alınmış ovaryumlarda, oosit elde etme yöntemi olarak da çok tercih edilen yöntem olan aspirasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada ovaryumlardan toplamda 395 adet oosit elde edildi. Hayvan başına ortalama 4,29 oosit aspire edildi. Ovaryum başına ortalama 2,15 adet oosit alındı. Toplam oositlerin 334 adedi A+B kalitede, 61 adedi C kalite ve dejenere durumda olduğu tespit edildi. Toplam A+B kalite oosit oranı %84,56, C ve Dejenere oosit oranı %15,44 olarak belirlendi. Ovaryum başına ortalama 1,81 adet A+B kalite oosit, 0,33 adet C kalite ve dejenere oosit elde edildi (Çizelge 4.1.). Totey ve ark.'nın (1992) Akdeniz mandalarında yaptıkları çalışmada ovaryum başına ortalama 0,45 oosit oranı, Madan ve ark.'nın (1994a) Akdeniz mandalarında yaptıkları çalışmada ovaryum başına ortalama 0,47 oosit oranı, Das ve ark. (1996) ile Nandi ve ark.'nın (2000b) Hindistan Murrah mandalarında yaptıkları çalışmada ovaryum başına ortalama 0,6 oosit oranı, Puri ve ark.'nın (2015) Hindistan'da mandalarda yaptıkları bir çalışmada ovaryum başına ortalama 1,15 kaliteli oosit oranı bildirilmiştir. Yapılan çalışmanın verileri bu çalışmaların verilerinden daha yüksek olmuştur. Samad ve ark.'nın (1998) Nili-Ravi mandalarında yaptıkları çalışmada ovaryum başına ortalama 1,76 kaliteli oosit oranı

bildirilmiş ve bu çalışmanın verileri bu literatüre yakın bulunmuştur. Yapılan çalışmanın ovaryum aspirasyon verileri Boni ve ark. (1999) İtalyan mandalarında bildirdikleri ovaryum başına 3,0 oosit ortalaması, Ruhil ve Purohit (2016) Murrah mandalarında bildirdikleri ovaryum başına 3,66 oosit ortalaması, Mistry ve Dhami'nin (2009) Surti mandalarında bildirdikleri ovaryum başına 3,12 oosit ortalamasından düşük olmuştur. Bu yüksek ortalamanın çalışmanın yapıldığı manda ırkından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca genel olarak mandalarda kaliteli oosit oranı ovaryum başına 1,5 olarak bildirilmiştir (Nandi ve ark. 2002, Kumar ve Anand 2012). Yapılan çalışmada bulunan kaliteli oosit oranı 0,3 kadar ortalamanın üzerinde olmuştur. Yapılan bu çalışmada düşük oosit verilerinin mandalarda sayı olarak az primordial folikül rezervinden [Surti mandalarında yaklaşık 12.000 (Danell 1987) Nilli-Ravi mandasında yaklaşık 19.000 (Samad ve Nasser 1979)], mandalarda östrus siklusu esnasında düşük sayıda antral foliküller olmasından (Ty ve ark. 1989, Kumar ve ark. 1997), foliküler atresia insidansının yüksek olması, mezbahaya gönderilen mandaların yaşlanmış ve verimsiz olması (Ocampo ve ark. 1997, Kumar ve Anand 2012) gibi sebeplerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir.

In vitro maturasyon çalışmalarında kullanılan başarı kriterleri oldukça fazladır. (Birler ve ark. 1997, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015). *In vitro* maturasyonun başarısını belirleme amacıyla kumulus ekspansiyonu; kumulus oosit komplekslerin stereo mikroskopla oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin genişlemesi bakımından değerlendirilebilir. Germinal vezikülün kırılması ve I. polar (kutup) cisimciğin atılması, kumulus hücrelerinin genişlemesi ile yakından ilişkili görülmüş ve kumulus hücrelerinde genişleme olan oositler maturasyonu gerçekleşmiş olarak kabul edilir (Suzuki ve ark. 1996, Birler ve ark. 1997, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015). Bu çalışmada, maturasyona alınan 334 adet oositte 329 adedinin mature olduğu tespit edildi. Böylece maturasyon oranı %98,50 olarak tespit edildi. Maturasyon sürecine alınan oositlerden 5 adedinin dejenere olduğu gözlemlendi. Maturasyon bulgusu gözlenmeyen oositlerin oranı %1,49 olarak gerçekleşmiş oldu (Çizelge 4.2.). Gasparrini (2006) tarafından yılında yapılan bir çalışmada mandalarda maturasyon oranı %92,8, Gupta ve ark. (2001) %90, Puri ve ark. (2015) %88, Todey ve ark. (1992) %81,7, Nandi ve ark. (2002) %85, Madan ve ark. (1994) %76,8 ve diğer (Abdoon ve ark. 2001, Gupta ve ark. 2002, Raghu ve ark. 2002b) %78,1 olarak bildirilmiş. Yapılan çalışmanın *in vitro* maturasyon oranı bu çalışmalardan yüksek olmuştur. Bu çalışmanın *in vitro* maturasyon oranının yüksek olmasının kullanılan medyumlara, maturasyon sürelerine ve

maturasyon değerlendirme kriterlerindeki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülmüştür. Maturasyon kriteri olarak I. polar cisimciğin görülmesi için kumulus ekspansiyonu olan oositler, pipetasyon işlemi ile kumulus hücrelerinden tamamen ayrılır. Daha sonra bu oositler stereo mikroskop altında incelenerek I. polar cisimciğin varlığı açısından incelenir. I. polar cisimciğini perivitellin boşluğa atan oositler matur olarak değerlendirilir (Acar 2008, Karaşahin 2012, Kaymaz 2015), fakat bu yöntem kullanılması durumunda kumulus hücreleri soyulduğu için IVF başarısı düşmektedir ve bu nedenle *in vitro* embriyo üretiminin diğer aşamalarının başarı şansı düşecektir. I. polar cisim tespiti *in vitro* maturasyon üzerine yapılan araştırmalarda kullanılan bir yöntemdir (Gasparrini ve ark. 2006, Hufana-Duran 2008, Manik ve ark. 2019, Kumar ve ark. 2020). Bu çalışma sadece maturasyon belirleme amacı ile yapılmadığı ve kumulus ekspansiyonu gözlemlenerek maturasyon belirlendiği için bu oranın yüksek olduğu düşünülmektedir.

In vitro fertilizasyon aşaması embriyo üretim sürecinin çok önemli bir aşamasıdır (Galli ve ark. 2001). Bu yapılan çalışmada, mature olan 334 adet oosit fertilizasyon sürecine alındı. Yaklaşık olarak 16-18 saatlik bir fertilizasyon periyodunun ardından bazı oositlerde II. polar cismin varlığı tespit edildi. *In vitro* fertilizasyona 334 adet oositte 5 (%1,49) adedi fertilizasyon gerçekleşmediği, 21 (%6,28) adedinin dejenerasyona uğradığı görüldü. Fertilizasyon süresi bitiminden sonra 308 (%92,2) adet oositin fertilize olduğu kabul edildi (Çizelge 4.3.). Birçok araştırmacı yaptıkları çalışmalarda ilk 24 saatte bölünme oranın fertilizasyon oranı olarak sayılabileceğini bildirmiştir (Brackett ve ark. 1981, Shioya 1993, Acar 2008, Karaşahin 2012, Kumar ve ark. 2020). Mandalarda yapılan çalışmalarda genel olarak oositlerinin fertilizasyon oranı sığırlara göre (%70) (Sales ve ark. 2015) düşük (%45-50) (Suresh ve ark. 2009) olarak bildirilmiştir. Oositlerin *in vitro* maturasyonu ve fertilizasyonunun ardından oluşan tek hücreli zigotun morula-blastosist aşamasına kadar kaldıkları medyum ortamına *in vitro* kültür denilmektedir (Gordon 2003). Yapılan çalışmada fertilizasyondan sonra pipetasyon ve kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması için yapılan ve bütünlüğü bozulmayan oositlerin tamamı kültüre alınmıştır. Kültüre alınan ve zigot olarak kabul edilen 308 adet embriyo 24. saatte stereo mikroskopla yapılan kontrolde, iki ya da daha çok sayıda bölünme gerçekleştiren 93 adet oositte fertilizasyon gerçekleştiği kabul edildi. Anadolu mandalarında CR1aa kültür ortamında ilk 24. saat bölünme oranı %30,19 oldu. Bölünme gerçekleşmeyen oosit sayısı 215, oranı ise %69,81 olarak gerçekleşti (Çizelge 4.4.). Bu oranlar Sales ve ark.'nın (2015) %45-50; Madan ve ark.'nın (1994) %40;

Chauhan ve ark.'nın (1997) %51-56; Sá Filho ve ark.'nın (2009) %41,7; Di Francesco ve ark.'nın (2012) %52,7; Gasparrini ve ark.'nın (2014) %53,5; Konrad ve ark.'nın (2017) bildirdikleri %64 oranlarından düşük, Totey ve ark.'nın (1992) %29,8, Suzuki ve ark.'nın (1992) %27; Hufana-Duran'ın (2008) %28,9; ve Nandi ve ark. (1998) bildirdikleri %27 oranlarına yakın olmuştur. Çalışmamızın bölünme oranı Hammam ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada bildirdikleri %18 oranından yüksek olmuştur. Bazı çalışmalarda yüksek bölünme oranları elde edilmesinde kullanılan oosit kaynağı olarak farklı yöntemlerin kullanılması ve fertilizasyonların farklı yöntemlerle yapılması olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma ile aynı oosit kaynağı kullanılan ve aynı yöntemler kullanılarak elde edilen fertilizasyon oranları birbirine yakın olmuştur.

Bu çalışmada Anadolu mandası embriyoların kültür ortamında 96.saatte (4. günde) yapılan mikroskopik incelemesinde, morula, kompakt morula sayıları 53 ve kültüre alınan oosit sayısına oranı ise %17,21 olarak tespit edildi (Çizelge 4.5.). Bu oran Konrad ve ark.'nın (2017) %17; Sá Filho ve ark.'nın (2009) %19; Ferraz ve ark.'nın (2015) %19,5; Totey ve ark.'nın (1992) %22, Palta ve Chauhan'ın (1998) bildirdikleri %17 oranlarına yakın olmuştur. Bazı çalışmalarda düşük bulunmuş oranların farklı kültür medyumları ve farklı maddelerin denenmesi amacıyla yapılan çalışmalardaki veriler olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmada, Anadolu mandası embriyoların kültüre alınışından itibaren 7. günde yapılan mikroskopik incelemelerde erken blastosist, blastosist, expanded blastosist sayısı 29 ve erken blastosist, blastosist, expanded blastosist oranı %9,42 oldu (Çizelge 4.6.). Bu oran Madan ve ark.'nın (1994) %8,1, Madan ve ark.'nın (1996) %6,7'lik blastosist oranından yüksek; Palta ve Chauhan'ın (1998) %9, Shang ve ark.'nın (2007) %9,57, Gasparrini ve ark.'nın (2014) %11,5, Hufana-Duran'ın (2008) %10,5'lik blastosist oranına yakın; Di Francesco ve ark.'nın (2012) %12,73, Chauhan ve ark. (1997), Chauhan ve ark. (1998a), Nandi ve ark. (1998), Nandi ve ark. (2001), Raghu ve ark. (2002c) bildirdikleri %15-30, Elamarank ve ark. (2012) bildirdikleri %16,1, Gasparrini ve ark. (2000) bildirdikleri %14,9 blastosist oranlarından düşük olmuştur. Yapılan bu çalışmanın verileri ile farkların ayrı manda ırklarında ve farklı kültür medyumları kullanılarak yapılmış çalışma verileridir. Genellikle çalışmamıza yakın oranların Anadolu mandasına genetik olarak yakın (Akdeniz mandası) olan ırklarda yapılan çalışmalar olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada Anadolu mandası embriyolarının kültüre alınışından itibaren 8.-10. günlerde yapılan mikroskopik incelemelerde hatching ve hatched blastosist sayısı 12 ve

oranı ise %3,89 oldu (Çizelge 4.7.). Bu çalışmanın verileri, Madan ve ark. (1994) bildirdikleri toplam oosit sayısından hatched blastosiste erişme oranı %0,57'den yüksek olmuştur. Yapılan çalışmanın bu verisi Palta ve Chauhan (1998) bildirdikleri %4, Hufana-Duran (2008) yaptığı çalışmada toplam oosit sayısı üzerinden %3,3 hatched blastosist oranı ile çok yakın olmuştur. Bu çalışmada toplam yarıklanmış oositlerde hatched blastosiste erişme oranı %12,9 olarak bulunmuştur. Bu oran Hufana-Duran (2008) tarafından bildirilen kültürde ilk bölünme meydana getirmiş embriyo sayısının hatched blastosiste erişme oranı olan %6'dan yüksek olmuştur. Bu çalışmada toplam blastosistten hatched blastosiste erişme oranı %41,37 olarak gerçekleşti. Bu oran Verma ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada toplam blastosistlerin hatched blastosiste erişme oranından (%14,63) çok yüksek olmuştur. Bu farkın oluşmasında çeşitli faktörlerin (IVC medyumları, mandaların ırkı, yaşı, mevsim, iklim, coğrafi bölge vs.) etkili olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada, Anadolu mandası embriyolarının CR1aa kültüründe 308 adet ferilizasyon gerçekleşmiş zigotların 7. Günde yapılan kalite değerlendirmesine göre 29 (%9,42) adet blastosist aşamasına erişmiş, bunların 7 adedi (%24,13) 1. kalitede (mükemmel), 9 adedi (%31,03) 2. kalite (İyi), 8 adedi (%27,50) 3. kalite (vasat), 5 adedi (%17,24) 4. kalitede (zayıf) olarak sınıflandırıldı. Dondurulabilir kalitede embriyo sayısı 16 adet (%55,17) olmuştur. Vasat kalitede olan 8 adet blastosist ancak taze transfere uygun kalitede olduğu görülmüştür (Çizelge 4.8.). Nandi ve ark. (2001) yaptıkları bir çalışmada elde edilen manda blastosistlerin %44'nün mükemmel ve iyi kalitede olduğunu, %34'ünün vasat kalitede olduğunu ve %14'nün dejenere olduğunu bildirmişlerdir. Gasparrini ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada mükemmel ve iyi (1. ve 2. kalite) kalitede embriyo oranını %11,3 olarak bulmuş bu oran yapılan çalışmadan düşük olmuştur. Embriyo kalitesi üzerine etkili olduğu bilinen birçok faktör vardır. Bu faktörler arasında kesilen hayvanların yaşı, kesime gtirildiği mevsim, ovaryumların laboratuvara getirilme süresi, oosit elde etme yöntemi, oosit kalitesi, kullanılan medyumları, kimyasallar, IVM /IVF/ IVC yöntemi bulunmaktadır.

6. SONUÇ

Bu çalışma ile Anadolu mandalarında elde edilen toplam oosit sayısı, kalite oosit oranı, dejenere oosit oranı, maturasyona alınan oosit oranı, fertilizasyona alınan oosit oranı, kültüre alınan oosit oranı, 24.- 48. saat bölünme oranı, 96. saat (4. gün) morula, kompakt morula oranı, 7. gün erken blastosist, blastosist, expanded blastosist oranı, 8.-10. gün hatched blastosist oranı, şeklinde belirtilen oositlerden embriyo oluşumuna kadar gelişim parametreleri ve embriyo kaliteleri standart IVF protokolleri kullanılarak belirlenmeye çalışıldı. Anadolu Mandasının *in vitro* embriyo üretim potansiyelini ortaya konulmasıyla, gelecekte yapılacak çalışmalara bir alt yapı oluşturulmaya çalışıldı. Yapılan çalışmada Anadolu Mandasının mezbaha materyalinden elde edilen ve yok olacak oositlerin embriyo üretim aşamalarındaki çeşitli parametreleri değerlendirilerek embriyo üretim potansiyeli belirlenmeye çalışıldı. Çalışma sonrasında elde edilen bulgular, Anadolu Mandasında *in vitro* embriyo gelişim parametreleri hakkında fikir vererek, araştırmacıların gelecekte bu alanda yapacakları çalışmaları planlanma aşamalarında daha tutarlı ve sonuç odaklı, daha verimli yol almalarına olanak sağlanacağı düşünülmektedir.

Genel kanı olarak Anadolu mandası IVF verileri, IETS dünya ortalaması verileri bakımından sığır IVP değerlerinin yaklaşık olarak yarısı, literatür verileri ile diğer manda ırklarından göreceli olarak yüksek olmuştur. Anadolu mandası IVP çalışmalarında, Intrazitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) çalışmaları, farklı aspirasyon teknikleri, farklı maturasyon medyumları, farklı kültür medyumları ve farklı fertilizasyon protokollerinin denemesinin gerektiği ortaya çıkmıştır.

Bu çalışma ile önümüzdeki süreçte çeşitli amaçlarla (ticari, genetik kaynak koruma, ıslah) Anadolu mandası üzerine yapılacak *in vitro* fertilizasyon ve embriyo üretim çalışmalarına ışık tutulmaya çalışıldı. Ayrıca çalışmanın Anadolu mandası hakkında bilgi alt yapısının geliştirmesi ve literatüre katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Acar DB.** Sığır Oositlerinde İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI), ICSI Sonrası Oositlerin Aktivasyonu ve Gelişim Aşamalarının Değerlendirilmesi, AÜ Veteriner Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Doğum ve Jinekoloji AD, Doktora Tezi, **2008**, Ankara.
2. **Abdoon ASS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T.** Influence of oocyte quality, culture media and gonadotrophins on cleavage rate and development of *in vitro* fertilized buffalo embryos. *Anim Reprod Sci*, **2001**, s.65: 215-223.
3. **Aköz M, Arik D, Kul M. Çelik B.** Buffalo breeding: Buffalo breeding in Turkey from past to today, *International Journal of Scientific and Technological Research*, **2017**, s.3(2), 9-14.
4. **Aksoy M, Tekeli T.** Mandalarda Üreme Özellikleri (Derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **1993**, s.33(1-2): 85-94.
5. **Akyol N.** Sığırlarda *in vitro* oosit maturasyonu (derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **2006**, s.46: 59-69.
6. **Akyol N.** Sığırlarda *In Vivo* ve *In Vitro* Fertilizasyon (DERLEME). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **2005**, 45(2): 53-61.
7. **Atabay EC, Maylem ERS, Salazar RL.** Enhancing prostaglandin-based estrus synchronization protocol for artificial insemination in water buffaloes. *Buffalo Bulletin*, **2020**, 39(1): 53-60.
8. **Atasever S, Erdem H.** Manda yetiştiriciliği ve Türkiye'deki geleceği. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, **2008**, s. 23(1):59-64.
9. **Awasthi MK, Khare A, Kavani FS, Siddiquee GM, Panchal MT, Shah RR.** Is one-wave follicular growth during the estrous cycle a usual phenomenon in water buffaloes (*Bubalus bubali*). *Anim Reprod Sci*, **2006**, s. 92: 241-253.
10. **Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier NY.** Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, **2000**, s.21(1): 1-7.
11. **Baruselli PS, De Carvalho JGS, Elliff FM, Da Silva JCB, Chello D ve ark.** Embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, **2020**, s.150: 221-228.
12. **Baruselli PS, Muciolo RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP ve ark.** Ovarian follicular Dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus Bubalis*), *Theriogenology*, **1997**, s. 47: 1531–1547.
13. **Bavister BD.** Early history of *in vitro* fertilization. Review, *Reproduction*, **2002**, 124, 181–196
14. **Bellve AR, Mcdonald MF.** Directional flow of fallopian tube secretion in the ewe at onset of the breeding season, *Journal of Reproduction and Fertility*, **1970**, s. 22: 147-149.
15. **Birler S.** Sığır oositlerinde morfolojik görünümün *in vitro* olgunlaştırma ve fertilizasyon üzerine etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1997**, 23: 345-352.

16. **Bodhipaksha P, Kamonpatana M, Chantaraprateep P, Kunavongkrit A, Luvira Y.** Research project for swamp buffalo improvement and extension. Rajadapisesek Sompoj Fund, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. **1978**, s.1-107. (in Thai).
17. **Bo GA, Mapletoft RJ.** Evaluation and classification of bovine embryos." *Animal Reproduction (AR)*. **2018**, 10.3: 344-348.
18. **Boni R.** In vivo collection of oocytes and embryos in bovine and buffalo species. *Buffalo J*, **1994**, s.2: 161-171.
19. **Boni R, Roviello S, Gasparrini B, Langella M, Zicarelli L.** *In vitro* production of buffalo embryos in chemically defined medium. *Buffalo J*, **1999**, s.15: 115-120.
20. **Boni R, S Roviello, V Barbieri, L Zicarelli.** *In vitro* embryo production in buffalo species. Atti XL VIII Convegno Nazionale SISVET, **1994**, s.1: 307-312.
21. **Borghese A.** Development and perspective of buffalo and buffalo market in Europe and Near East. In Proc. 9th World Buffalo Congress, Buenos Aires, **2010**, s. 25-28.
22. **Bracket BG, Oliphant G.** Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod*, **1975**, s.12: 260-274.
23. **Brckett BG, Seidel GE, Seidel SM.** Application of *In vitro* Fertilization. Academic pres Inc.**1981**. New York, USA.
24. **Brckett BG, Zuelka KA.** Analysis of factor involved in the *in vitro* production of bovine embryos. Apstract, *Theriogenology*, **1993**, 39: 43-64.
25. **Bunch TJ, Wang S, Holyoak GR, Buch TD.** Bovine embryo development *in vitro* after exposure to fluorescent light. *Journal of Animal Science*, **1999**, s.77: 98.
26. **Carvalhais I, Faheem M, Habibi A, Geraldo A, Agricola M ve ark.** Effects of bovine oocyte quality on kinetics of nuclear maturation and embryonic development after *in vitro* fertilization. *Reproduction, Fertility and Development*, **2009**, s.22: 322-323, (Abstract).
27. **Carvalho NAT, Soares JG, Da Silva VF, D'Angelo M, Gallupo AG ve ark.** *In vitro* oocyte transport through the oviduct of buffalo and crossbred beef cows, *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*, **2012**, s. 49(4): 277-284.
28. **Carvalho NAT, Vannuci FS, D'Angelo M, Gallupo AG, Melo GM ve ark.** Oocytes transport across the oviduct of murreh and nelore cows. *Italian Journal of Animal Science*, **2007**, s. 6: 649-651.
29. **Chauhan MS, Palta P, Das SK, Katiyar PK, Madan ML.** Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, **1997**, 48, 461-9
30. **Chauhan MS, Singla SK, Palta P, Manik RS, Tomer OS.** Development of *in vitro* produced buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in relation to time. *Asian Aust J Anim Sci*, **1998a**, s.11: 398-403.
31. **Chauhan MS, Singla SK, Palta P, Manik RS, Tomer OS.** IGF-II stimulation of *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and subsequent development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes *in vitro*. *Vet Rec*, **1998b**, s.142: 727-728.
32. **Chantalakhana C, Falvey L.** Small holder Dairying in the Tropics. ILRI (International Livestock Research Institute), **1999**, Nairobi, Kenya.
33. **Chantarakhana C, Usanakornkul S, Kamnerdpeeth V, Na Phuket SR, Veerasit P ve ark.** Age of first calving and calving interval of Thai swamp buffaloes. The Nat Buffalo Res Dev Proj, *Ann Rep*. **1981**, Bangkok, Thailand, s.50-55.

34. **Chuangsoongneon U, Kamonpatana M.** Oocyte maturation, *in vitro* fertilization and culture system for developing preimplantation swamp buffalo embryos using frozen-thawed semen. *Buffalo J*, **1991**, s.17: 189-198.
35. **Colli L, Milanesi M, Vajana E, Iamartino D, Bomba L ve ark.** New insights on water buffalo genomic diversity and post-domestication migration routes from medium density SNP chip data. *Frontiers in Genetics*, **2018**, s.9:53.
36. **Çevik M, Sağırkaya H, Taş A, Akkoç T, Bağış H ve ark.** 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*, **2009**, 8: 1185-1189
37. **Das GK, Jain GC, Solanki VS, Tripathi VN.** Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. *Theriogenology*, **1996**, s.46: 1403–1411.
38. **De Loos F, Van Maurik C, Kruip AM.** Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res*, **1989**, 24: 197-204.
39. **Drost M.** Advanced reproductive technology in the water buffalo. *Theriogenology*, **2007**, s.68: 450–453.
40. **Drost M, Wright Jr JM, Cripe WS, Richter AR.** Embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*), *Theriogenology*, **1983**, s.20: 579-584.
41. **Di Francesco S, Novoa MV, Vecchio D, Neglia G, Boccia L ve ark.** Ovum pick-up and *in vitro* embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. *Theriogenology*, **2012**, 77,148-154.
42. **Duran DH, Duran PLH, Duran PG, Cruz LC.** Production of river buffalo (*Bubalus bubalis*) calves by embryo *in vitro* production-vitrification and transfer techniques in the Philippines. *Buffalo Bulletin*, **2017**, s. 36(4): 607-614.
43. **Elamaram G, Singh KP, Singh MK, Singla SK, Chauhan MS ve ark.** Oxygen Concentration and Cysteamine Supplementation During *In vitro* Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos Affect mRNA Expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. *Reproduction in Domestic Animals*, **2012**, 47(6), 1027-1036.
44. **Ermetin O.** Husbandry and sustainability of Water Buffaloes in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, **2017**, s.5(12): 1673-1682.
45. **Ferraz ML, Sá Filho MF, Batista EOS, Watanabe YF, Watanabe MR ve ark.** Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and *in vitro* embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pick-up. *Animal Reproduction Science*, **2015**, 154, 1-7.
46. **Fischer H, Bodhipaksha P.** Reproduction in swamp buffalo. In: Buffalo Production, Chapter 7. Tulloh NM and Holmes JHG (eds). Elsevier, New York, **1992**, s.153-181.
47. **Food and Agricultural Organization of the United Nations.** (FAO). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>, **2020**, Erişim Tarihi: 02.09.2020.
48. **Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H, Ono H.** Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, **1990**, s.34 (3): 579-591.
49. **Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R ve ark.** Embryo production by ovum-pick up from live donors. *Theriogenology*, **2001**, s.55: 1341-1357.
50. **Galli C, Duchi R, Crotti G, Lazzari G.** Embryo production by ovum pick up *in vitro* embryo technology. *Theriogenology*, **1998**, s.49: 400 [Abstract].
51. **Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F ve ark.** Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*, **2006**, s.65: 275-287.

52. **Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L.** Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, **2000**, 54(9), 1537-1542.
53. **Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Di Vecchio D, Albero G ve ark.** Influence of oocyte donor on *in vitro* embryo production in buffalo. *Animal Reproduction Science*, **2014**, 144, 95-101.
54. **Gasparrini B.** *In vitro* embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology*, **2002**, s.57: 237-256.
55. **Gasparrini B, Tyagi S.** In vivo embryo production in buffalo: current situation and future perspectives, *Italian Journal of Animal Science*, **2007**, s.6(sup2): 74-91.
56. **Givens MD, Marley SD.** Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology*, **2008**, s.69: 129-136.
57. **Gordon I.** Laboratory production of cattle embryos. Biotechnology in Agriculture Series No. 27. Typeset by AMA DataSet Ltd. Cromwell Pres, UK, *Trowbridge*, **2003**, s.176-182.
58. **Goto K, Iwai Y, Takuma Y, Nakanishi Y.** Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *Journal Animal Science*, **1992**, s.70: 1449-1453.
59. **Gupta PSP, Nandi S, Ravindranatha BM, Sarma PV.** Effect of commercially available PMSG on maturation, fertilization and embryo development of buffalo oocytes *in vitro*, *Reprod Fertil Dev*, **2001**, s.13: 355–360.
60. **Gupta PSP, Nandi S, Ravindranatha BM, Sarma PV.** *In vitro* maturation of buffalo oocytes with epidermal growth factor and fibroblast growth factor. *Indian J Anim Sci*, **2002**, s.72: 20-23.
61. **Hafez ESE.** Folliculogenesis, egg maturation and ovulation (in) Reproduction in farm animals. Ed. E.S.E. Hafez. s.68-94, 7. Edition. Linpincott Williams & Wilkins, **2000**, Philadelphia.
62. **Hammam AM, Whisnant CS, Elias A, Zaabel SM, Hegab AO ve ark.** Effect of media, sera and hormones on *in vitro* maturation and fertilization of water buffalos (*Bubalus bubalis*). *J. Anim. Vet. Adv.*, **2010**, 9:27-31.
63. **Hufana-Duran D, Pedro PB, Venturina HV, Duran PG, Cruz LC.** Full-term development of *in vitro* produced-vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis* Linn) embryos, *Philippine Journal of Science*, **2005**, s.134(2): 89-94.
64. **Hufana-Duran D.** Studies for the Improvement of *in vitro* culture systems of oocytes and embryos in water buffalo, (Doctoral dissertation, PhD Dissertation), University of Tsukuba, Tsukuba, Japan, **2008**.
65. **Hufana-Duran D, Duran PG.** Advanced Reproductive Technologies in Water Buffalo, **2015**, *Bubaline Theriogenology by Purohit GN*, Dijital kitap, <https://www.ivis.org/library/bubaline-theriogenology>, Erişim tarihi:08.12.2020.
66. **International Embryo Technology Society (IETS)**, <https://www.iets.org/Meetings/Previous-Meetings/2020-IETS-Annual-Meeting>, **2021**, Erişim Tarihi:29.01.2021.
67. **International Embryo Technology Society (IETS)**, By Joao Viana, Chair – IETS Data Retrieval Committee (henrique.viana@embrapa.br) In: Embryo Technology Newsletter, v. 36, n.4, **2019**, Erişim Tarihi:23.07.2021.
68. **Imai K.** *In Vitro* Fertilization (IVF), Embryo transfer technology for domestic animal, Japan International Cooperation Agency National Livestock Breeding Center, **2005**, Fukushima, Japan.

69. **Imai K, Matoba S, Dochı O, Shimohira I.** Different factors affect developmental competence and cryotolerance in *in vitro* produced bovine embryo. *Journal of veterinary medical science*, **2002**, s.64.(10): 887-891.
70. **İstanbul Damızlık Manda Yetiştiricileri Birliği (İDMYB),** Web Sitesi, <http://www.istanbulmanda.org/wp-content/uploads/2015/12/8.jpg>, **2015**, Erişim Tarihi: 01.05.2021.
71. **Jindal R, Gill SPS, Setia MS, Rattan PJS.** Estrus synchronization in buffaloes using lutalyse. *Buffalo Bulletin*, **1980**, s7: 61-67.
72. **Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N.** Manuel of bovine embryo transfer. National Livestock Breeding Center, MAFF, JICA, Fukushima, Japan, **1995**.
73. **Karaşahin T.** Oleik ve Linoleik Asidin İn Vitro Sığır Embriyo Gelişimi ve Kalitesine Etkileri (Doktora Tezi), Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, **2012**.
74. **Karaşahin T.** Türkiye İçin Sığırlarda Embriyo Transferi Gerekli mi? *Journal of Advances in Vet Bio Science and Techniques JAVST*, **2017**, s. 2(2), 30-33.
75. **Kaymaz M.** Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji, Yardımcı Üreme Teknikleri. 2. Baskı, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, **2015**, s.660-684.
76. **Konrad J, Clérico G, Garrido MJ, Taminelli G, Yuponi M ve ark.** Ovum pick-up interval in buffalo (*Bubalus bubalis*) managed under wetland conditions in Argentina: Effect on follicular population, oocyte recovery, and *in vitro* embryo development. *Animal Reproduction Science*, **2017**, 183, 39-45
77. **Kumar A, Solanki VS, Jindal SK, Tripathi VN, Jain GC.** Oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *Anim Reprod Sci*, **1997**, s.47: 189-195.
78. **Kumar D, Anand T.** *In vitro* embryo production in buffalo: Basic concepts. *Journal of Buffalo Science*, **2012**, s.1(1): 50.
79. **Kumar S, Ohashi O, Vale W, Melo L, Freitas V.** State-of-the-art and Emerging Technologies for *In Vitro* Embryo Production in Buffaloes. *Journal of Advanced Veterinary Research*, **2020**, s.10(3): 186-192.
80. **Lemuel MA, Fely V, Lerma CO, Marlon BO.** Evaluation of bioassay using *in vitro* matured water buffalo oocytes in predicting bull sperm fertility. *Journal of Agricultural Technology*, **2015**, s.11(8): 2531-2538.
81. **Machaty Z, Peippo J, Peter A.** Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology review, *Theriogenology*, **2012**, s.78: 937-950.
82. **Madan ML, Chauhan MS, Singla SK, Manik RS.** Pregnancies established from water buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts derived from *in vitro* matured *in vitro* fertilized oocytes and co-cultured with cumulus and oviductal cells, *Theriogenology*, **1994**, s.42: 591-600.
83. **Madan ML, Das SK, Palta.** Application of reproductive technology to buffaloes. *Animal Reproduction Science*, **1996**, 42, no. (1-4): s299-306.
84. **Madan ML, Singla SK, Jailkhavi S, Ambrose JD.** *In vitro* fertilization in buffalo and birth of first ever IVF buffalo calf. Post Cong Proc III rd, World Buffalo Cong, Bulgaria, **1991**, s.7: 11-17.
85. **Manik RS, Palta P, Singla SK, Sharma V.** Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review, *Reprod Fertil Dev*, **2002**, s.14: 315-325.
86. **Mapletoft RJ.** History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*, **2013**, s.(v.10), n.3: 168-173.

87. **Mapletoft RJ, Hasler JF.** Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, **2005**, s24: 393-403.
88. **Marin DFD, Souza EBD, Brito VCD, Nascimento CV, Ramos AS ve ark.** *In vitro* embryo production in buffaloes: from the laboratory to the farm. *Animal Reproduction*, **2019**, s.16(2):260-266.
89. **Mason IL.** Species, types and breeds. In: "The Water Buffalo" *FAO Animal Production and Health Series*, **1974**, s.1-47, Rome, Italy.
90. **Matsushita S, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y.** Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Animal Reproduction Science*, **2004**, s.84(3-4): 293-301.
91. **Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, **2002**, s.57(1): 327-344.
92. **Mistry CN, Dhami AJ.** Studies on follicular size and oocytes recovery rate from buffalo ovaries by slicing method. *Indian J. Field Vet.*, **2009**, 5:23-26.
93. **Moioli B, Borghese A.** Buffalo breeds and management systems. In: Buffalo Production and Research, FAO Report, A. Borghese (Ed.), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, **2008**.
94. **Moioli B.** Breeding and selection of dairy buffaloes. Edited: BORGHESE A., *Buffalo Production and Research*, FAO, Rome, Italy, **2005**.
95. **Na-Chiengmai A.** Development of swamp buffalo breeding improvement for sustainable use in Thailand. Workshop on EC-China water buffalo development project. 5-8 April, **2002**, Kunming, PRC. p. 7.
96. **Nagai T.** The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, **2001**, s.55: 1291-1301.
97. **Nagao Y, Saeki K, Hoshi M, Kainuma H.** 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*, **1994**, s.41: 681-687.
98. **Nanda AS, Nakao T.** Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus, *Animal Science Journal*, **2003**, s.74(6): 443-455.
99. **Nandi S, Chauhan MS, Palta P.** Influence of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured and fertilized *in vitro*, *Theriogenology*, **1998**, s.50: 1251-1262.
100. **Nandi S, Gupta PSP, Ravindranatha BM, Sarma PV.** Influence of different levels of steer serum on production of fertilizable buffalo oocytes *in vitro*, *The Veterinary Record*, **2001**, s.149(4):124-125.
101. **Nandi S, Raghu HM, Ravindranatha BM, Chauhan MS.** Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos *in vitro*: premises and promises, *Reprod Domest Anim*, **2002**, s.37: 65-74.
102. **Narula A, Taneja M, Totey SM.** Morphological development, cell member and allocation of cells to trophoctoderm and inner cell mass of *in vitro* fertilized and parthenogenetically developed buffalo embryos: the effect of IGF-I. *Mol Reprod Dev*, **1996**, s.44: 343-351.
103. **Neglia G, Marino M, Di Palo R, Wilding M, Caracciolo di Brienza V ve ark.** A comparison of *in vitro* maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) bovine oocytes using confocal microscopy. *Theriogenology*, **2001**, s.55: 488 [Abstract].
104. **Ocampo MB, Ocampo LC, Lorenzo ND, De Vera RV, Aquino FP ve ark.** Pregnancies resulting from swamp buffalo oocytes matured and fertilized *in vitro*. In

- 1996 Regional R and D [Research and Development] Symposia, (Philippines), **1997**, 27 Jun-12 Sep 1996. PCARRD.
- 105. Özbeyaz C.** Sığır Yetiştiriciliği Ders Notları, (Yayınlanmamış), Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, **2015**.
 - 106. Palta P, Chauhan MS.** Laboratory production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, **1998**, s.10: 379-392.
 - 107. Pandey A, Gupta SC, Singh N, Rana JS, Gupta N.** Efficiency of SCNT buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in different culture medium and analysis of mRNA expression of insulin-like growth factors during embryogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, **2010**, s.45: 786-795.
 - 108. Paula-Lopes FF, Hansen PJ.** Heat shock induced apoptosis to preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of Reproduction*, **2002**, s.66: 1169-1177.
 - 109. Pawshe CH, Appa Rao KPCA, Totey SM.** Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotrophins on *in vitro* maturation and embryonic development, cell proliferation and biosynthetic activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. *Mol Reprod Dev*, **1998**, s.49: 277-289.
 - 110. Perera BMAO.** Reproductive cycles of buffalo. *Animal reproduction science*, **2011**, s.124(3-4): 194-199.
 - 111. Presicce GA, Gasparrini B, Salzano A, Neglia G, Campanile G ve ark.** Reproductive technologies in the buffalo (*Bubalus bubalis*). Academic Press. *In Reproductive Technologies in Animals*, **2020**, s. 81-98.
 - 112. Presicce GA, Parmeggiana A, Senatore EM, Stecco R, Barile VL ve ark.** Hormonal dynamics and follicular turnover in prepuberal Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, **2003**, s.60: 485-493.
 - 113. Presicce GA, Senatore EM, Bela A, De Santis G, Barile VL ve ark.** Ovarian follicular Dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol, *Theriogenology*, **2004**, s.61: 1343–1355.
 - 114. Puri G, Chaudhary SS, Singh VK, Sharma AK.** Effects of fetal bovine serum and estrus buffalo serum on maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes *in vitro*. *Veterinary World*, **2015**, 8(2), 143.
 - 115. Purohit GN, Thanvi P, Pushp M, Gaur M, Shekher C ve ark.** Estrus synchronization in buffaloes: Prospects, approaches and limitations. *The Pharma Innovation Journal*, **2019**, s. 8(2): 54-62.
 - 116. Raghu HM, Nandi S, Reddy SM.** Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, **2002a**, s.14: 55-61.
 - 117. Raghu HM, Nandi S, Reddy SM.** Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage *in vitro* in serum-free, semidefined media. *Vet Rec*, **2002b**, s.151: 260-265.
 - 118. Raghu HM, Nandi S, Reddy SM.** Development of buffalo oocyte to the blastocyst stage *in vitro* in serumfree, semi-defined media: effect of insulin-transferrin-selenium and epidermal growth factor. *Vet Rec*, in press, **2002c**.
 - 119. Rahumathulla PBS, Sankarasubramanian R, Gajendran K, Ebenezer Raja E.** Influence of sire and season on conception rate in buffaloes. *Indian Vet. J*, **1987**, s.64, 485 -487. 38.

120. **Ramesha KP, Balakrisnan M, Murthy LK, Balakrisnan CR.** Additive effect of pentoxifylline and heparin on buffalo sperm motility and fertilization of oocytes matured in culture. *Buffalo J*, **2000**, s.16: 63-71.
121. **Ravindranatha BM, Nandi S, Raghu HM, Reddy SM.** *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes: effects of storage of ovaries, IVM temperatures, storage of processed sperm and fertilization media. *Reprod Domest Anim*, **2003**, s38: 21-26.
122. **Rosenkrans CF, Zeng GQ, Schoff PK, First NL.** Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of reproduction*, **1993**, s.49(3): 459-462.
123. **Rosenkrans Jr CF.** A simple medium for *in vitro* development of bovine embryos. *J. Animal Sci*, **1990**, s.1: 479 (abstr).
124. **Rubessa M, Boccia L, Di Francesco S.** *In Vitro* Embryo Production in Buffalo Species (*Bubalus bubalis*). In *Comparative Embryo Culture*, **2019**, (pp. 179-190). Humana, New York, NY.
125. **Ruhil SRS, Purohit GN.** *In Vitro* Fertilization Of Buffalo Oocytes Matured *In Vitro* In Three Different Media. *The Indian Journal of Animal Reproduction*, **2016**, 36(2).
126. **Sá Filho MF, Carvalho NAT, Gimenes LU, Torres-Júnior JR, Nasser LFT ve ark.** Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population on *in vitro* buffalo embryo production. *Animal Reproduction Science*, **2009**, 113, 51-59.
127. **Sağırkaya H.** Sığırlarda embriyo transfer uygulaması ve Türkiye açısından önemi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2009**, s.28(2): 11-19.
128. **Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintão CCR, Gama MAS ve ark.** Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci*, **2015**, 98(5):3086-3099.
129. **Samad HA, Khan IG, Rehmanb NU, Ahmed N.** The recovery, *in vitro* maturation and fertilization of Nilli-Rav buffalo follicular oocytes, *Asian Aust J Anim Sci*, **1998**, s. 11: 491–497.
130. **Schernthaner W, Schmoll F, Brem G, Schellander K.** Storing bovine ovaries for 24 h between 15 and 21°C does not influence *in vitro* production of blastocysts. *Theriogenology*, **1997**, s.47: 297 [Abstract].
131. **Shang JH, Huang YJ, Zhang XF, Huang FX, Qin J.** Effect of β -mercaptoethanol and buffalo follicular fluid on fertilization and subsequent embryonic development of water buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes derived from *in vitro* maturation. *Italian Journal of Animal Science*, **2007**, 6(sup2), 751-754.
132. **Shioya Y.** Calf production by *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *JARQ*, **1993**, s.26: 287-293
133. **Smith L, Olivera-Angel M, Groome NP, Bhatia B, Price CA.** Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle. *J Reprod Fertil*, **1996**, s.106: 193-199.
134. **Singh N, Dhaliwal GS, Malik VS, Dadarwal D, Honparkhe M ve ark.** Comparison of follicular dynamics, superovulatory response, and embryo recovery between estradiol based and conventional superstimulation protocol in buffaloes (*Bubalus bubalis*), *Veterinary World*, **2015**, s.8(8): 983-988.
135. **Songsasen N, Apimeteetumrong M.** Effects of beta-mercaptoethanol on formation of pronuclei and developmental competence of swamp buffalo oocytes. *Anim Reprod Sci*, **2002**, s.71: 193-202.

136. **Soliman WTM, Mahmoud KGM, El-Khawagah ARM, Kandiel MMM, Abouel-Roos MEA ve ark.** Impact of *in vitro* fertilization by fresh and frozen semen on developmental competence and cryotolerance of buffalo embryos. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **2018**, s.19(3): 178-181.
137. **Soysal MI, Gürçan EK, Tuna YT.** An investigation on the water buffalo breeding in Danamandira village of Silivri District of Istanbul Province of Turkey. *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **2005**, s.2.1: 73-78.
138. **Soysal Mİ.** Manda ve Ürünleri Üretimi. Ders Notları, Tekirdağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Tekirdağ, Türkiye, **2009**.
139. **Sugie T.** Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *Journal of Reproduction and Fertility*, **1965**, s.10, 197-201.
140. **Suresh KP, Nandi S, Mondal S.** Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: a meta-analysis. *Theriogenology*, **2009**, 72(7):978-985.
141. **Suzuki T, Boediono A, Takagi M, Saha S, Sumatri C.** Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. *Cryobiology*, **1996**, s.33: 515-524.
142. **Suzuki T, Singla SK, Sujata J, Madan ML.** *In vitro* fertilization of water buffalo follicular oocytes and their ability to cleave *in vitro*. *Theriogenology*, **1992**, 38, 1187-94.
143. **Stringfellow DA, Givens, MD.** Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4th ed. Champaign, IL: IETS, **2010**.
144. **Şahin A, Ulutaş Z, Yıldırım A.** Türkiye ve Dünya’da Manda Yetiştiriciliği. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, **2013**, s.8: 65-70.
145. **Şahin M, Küçükkebabçı M.** Dünyada ve Türkiye’de Mandacılık, TC Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Kocatepe Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, **1999**, Afyon.
146. **Şekerden Ö.** Büyükbaş Hayvan Yetiştirme, Manda Yetiştiriciliği Kitabı. Temizyürek Ofset Matbaacılık, Hatay, Türkiye, **2001**.
147. **Thompson JG.** *In vitro* culture and metabolism of cattle and sheep embryos- a decade of achievement. *Anim Reprod Sci*, **2000**, s.60: 263-275.
148. **Totey SM, Daliri M, Appa Rao KBC, Pawshe CH, Taneja M ve ark.** Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell numbers and sex ratios in buffalo embryos generated *in vitro*. *Theriogenology*, **1996**, s.45: 521-533.
149. **Totey SM, Pawshe CH, Singh GP.** Effects of bull and heparin and sperm concentration on *in vitro* fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, **1993a**, s.39: 887-898.
150. **Totey SM, CH Pawshe, GP Singh.** *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus bubalis*): effects of media, hormones and sera. *Theriogenology* **1993b**, s.39: 1153-1171.
151. **Totey SM, Singh G, Taneja M, Pawshe CH ve ark.** *In vitro* maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Reprod Fertil*, **1992**, s.5: 597-607.
152. **Türkiye İstatistik Kurumu, (TÜİK).** <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id= 33874>. **2020**, Erişim Tarihi:01.09.2020).
153. **Uğurlu M.** Dünyada ve Türkiye’de Manda Yetiştiriciliği, Manda Irkları ve Verim Özellikleri. *J Anim Nutr&Nutr Dis-Special Topics*, **2017**, s.3(2):77-83.
154. **Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü (UHAEM),** <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/lalahanhmae/Menu/39/Anadolu-Mandasi,Ankara,Turkiye>, **2020**, Erişim Tarihi: 13.09.2020.

155. **Verma V, Gautam SK, Singh B, Manik RS, Palta P ve ark.** Isolation and characterization of embryonic stem cell-like cells from *in vitro*-produced buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **2007**, 74(4), 520-529.
156. **Yadav PS, Khanna S, Hooda OK, Sethi RK.** Effect of oviductal cell co-culture on cleavage and development of buffalo IVF embryos. *Asian Aust J Anim Sci*, **2000**, s.13: 894- 896.
157. **Yavuz T.** Manda ve Manda Sütü. <https://vetrehberi.com/manda-ve-manda-sutu/>. **2020**. Erişim Tarihi 13.09.2020.
158. **Yılmaz A, Kara MA.** Dünyada ve Türkiye’de Manda Yetiştiriciliğinin Durumu ve Geleceği. *Turk J Agric Res*, **2019**, s.6(3): 356-363.
159. **Zhang M, Lua KH, Seidel GE.** Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*, **2003**, s.60: 1657-1663.
160. **Zhang Y, Colli L, Barker JSF.** Asian water buffalo: domestication, history and genetics. *Animal Genetics*, **2020**, s.51(2):177-191.
161. **Warriach HM, McGill DM, Bush RD, Wynn PC, Chohan KR.** A review of recent developments in buffalo reproduction-a review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, **2015**, s.28(3): 451-455.
162. **William RB, Shapiro SS.** Quality control in bovine the *in vitro* laboratuary. *Theriogenology*, **1990**, s.33: 23-31.

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Ali YILMAZ ilk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep'in İslahiye ilçesinde tamamladı. Önlisans eğitimini 1999 yılında Uludağ Üniversitesi, Karacabey Meslek Yüksek Okulu, Hayvan Yetiştiriciliği ve Sağlığı Bölümü'nden mezun oldu. Lisans eğitimi için 2002 yılında başladığı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nden 2007 yılında tamamladı. Ardından 2008 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Mikrobiyoloji (Vet) Anabilim Dalı'nda başladığı Tezli Yüksek Lisans eğitimini 2011 yılında tamamladı. Doktora eğitimine 2016 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum Jinekoloji ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda başladı. 2009-2013 yılları arasında Kars Tarım ve Orman İl Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak görev yaptı. 2013 yılından bu yana Ankara, Lalahan'da Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde Araştırmacı Veteriner Hekim olarak görev yapmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.