

İN VİTRO EMBRİYO ÜRETİMİ

İn vitro döllemenin tarihçesi

- Karl von Baer (1825): Modern embriyolojinin babası olarak da kabul edilir. Köpek ovaryumu ve ovositleri üzerine ilk ciddi çalışmaları yapmıştır.
- Walter Heape (1890): Tavşanlarda ilk embriyo aktarımı yapmıştır (gebelik sağlanamadı).
- Pincus ve Enzman (1934): In vitro koşullarda memeli ovositinin gelişebileceğini iddia ettiler.

- Polge (1949). Gliserol kullanarak hayvan sperminin dondurulabileceğini ortaya koydu.
- Bunge ve Sherman (1953): Dondurulmuş insan spermi ile ilk yapay dölleme.
- Chang (1959): Tavşanda ilk IVF sonrası yavru elde edilmesi
- Yanagimachi ve Chang (1963): Hamsterde in vitro koşullarda kapasitasyon sonrası IVF
- Whittingham (1972): Farede ilk embryo dondurma

- Farede ilk in vitro embriyo kültürü: 1968
- 25 Temmuz 1978: IVF sonrası doęan ilk bebek
- Keide ilk IVF sonrası canlı yavru: 1985
- Domuzda ve koyunda ilk IVF ile doęum: 1986
- Sığırda IVF sonrası ilk buzağı: 1982
- Atlarda ilk IVF sonrası tay doęumu: 1991

In vitro embriyo üretimi (IVEP)

Kapsamı:

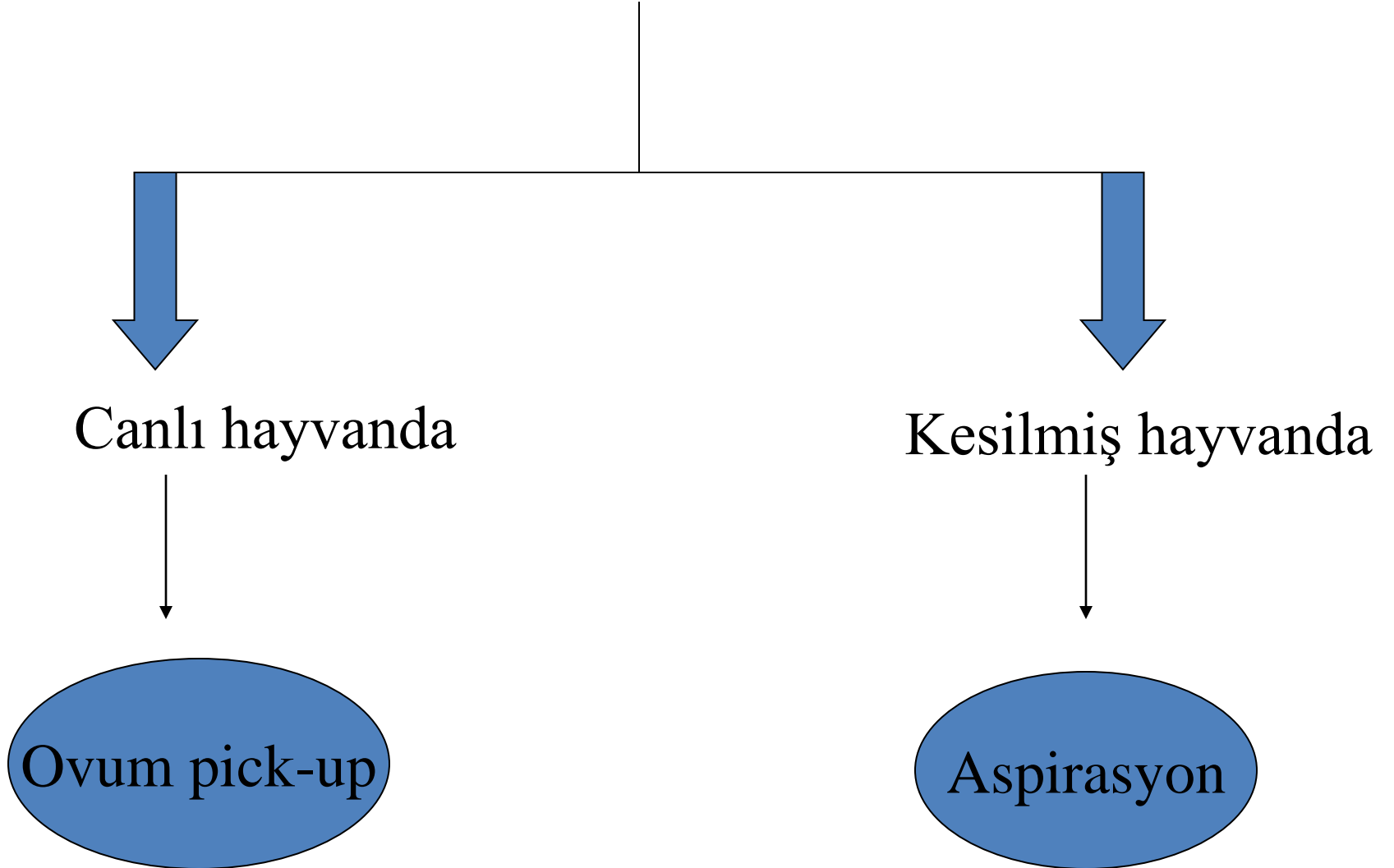
- ▶ Ovosit toplama
- ▶ In vitro maturation (IVM)
- ▶ In vitro fertilization (IVF)
- ▶ In vitro kültür (IVC)

Neden İnvitro dölleme?

- Klasik in vivo embriyo üretiminde süperovulasyon amaçlı hormon uygulamalarına yanıt veremeyen hayvanlarda embriyo üretimi
- Gebe hayvanlardan ovosit toplayabilme
- İn vivo embriyo üretimine müsaade etmeyen bir sakatlık veya hastalık geçirmiş olan damızlıklardan ovosit üretimi

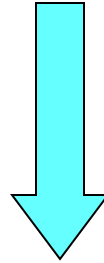
- Ani kesime gitmiş veya gidecek olan değerli damızlıklardan döl alabilme
- İn vivo embriyo üretimine oranla çok daha sıklıkla ovosit toplayabilmek ve dolayısıyla daha sıklıkla embriyo üretebilme imkanı

Ovosit toplama



Ovosit toplama

**Mezbahalardan ovaryum
toplanması**

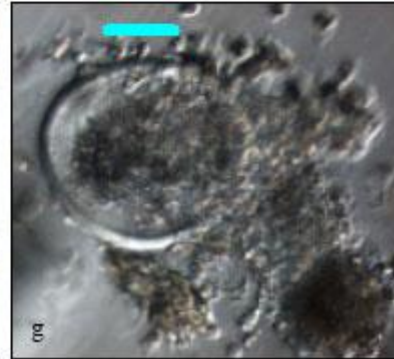
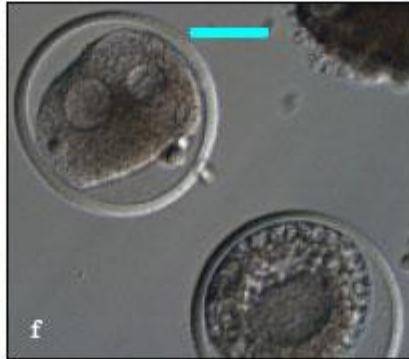
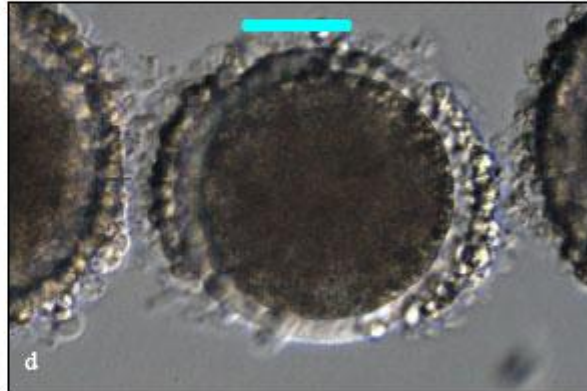
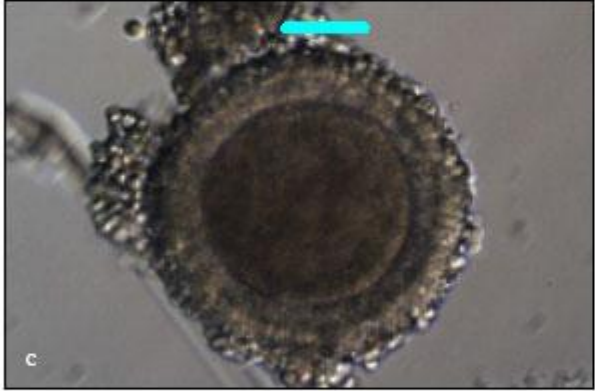
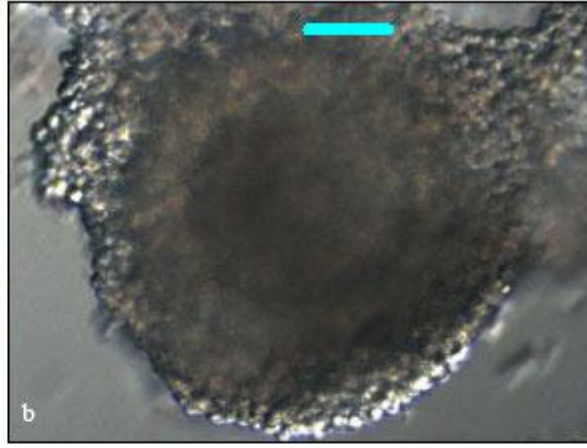
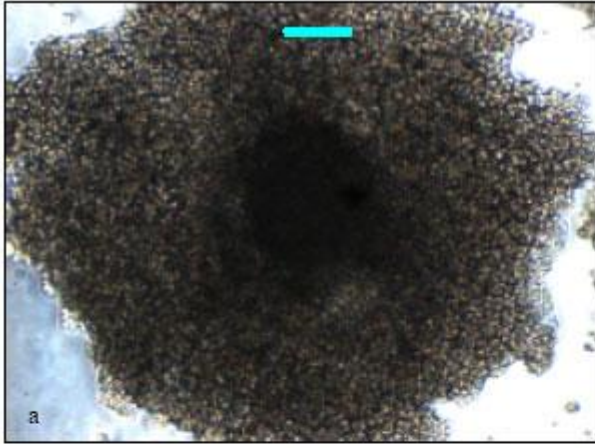


**Tuzlu su ve
antibiyotik içeren 32-
37°C ortamda nakil**

**Folikül aspirasyonunun (2-8 mm)
Aspirasyon ortamında
(TCM-199 + 10% FCS) yapılması**

Ovasitlerin kalite yönüyle sınıflandırılması

- A Sınıfı:** **Kompakt yapıda Kumulus-ovocit-kompleks (COCs) nin bütünlüklü bir yığın oluşturması, en az 4 ve daha fazla katmanla çevrili bir ovosit, homojen ve granüllü ovoplazma görülmesi**
- B Sınıfı:** **2-3 sıralı kumulus hücrelerinin çevrelediği bir ovosit, homojen ve granüler yapıda ovoplazma**
- C Sınıfı:** **Ovositi çevreleyen hücreler kısmen veya tamamen eksik, yanlara doğru açılmış ve dağılmış kümülüs hücreleri, homojen olmayan ve koyu renkte ovoplazma**



Ovositlerin kalite yönünden değerlendirilmesi: Üstten ilk ve ikinci ovosit A sınıfı kalitesinde ovositler olarak değerlendirilir. Ortada solda B sınıfı, sağdaki ise C sınıfında yer alan ovositlerdir. Altta solda B sınıfı sağdaki ovositler ise IVF için kullanılamayacak nitelikte C sınıfının altında olanlardır.

In vitro fertilizasyon

**In vitro koşulda
Olgunlaştırılmış ovosit**

**Dondurulmuş
semen**

Çözdürme

In vitro sperm muamelesi ve kapasitasyon

**Inkübasyon (18 saat boyunca
1-2 milyon/ml spermatozoa ile)**

IV kültür ortamında zigotların tutulması

Sperm muamelesi ve Kapasitasyon

- ✓ Kùltür ortamında bekletme
- ✓ spermatozoa motilitesinin iyileştirilmesi
- ✓ Akrozom reaksiyonunun başlatılması
- ✓ Başarılı bir in vitro döllemenin sağlanması

Kapasitasyon ortamı komponentleri

- ❖ Bovine serum albumin
- ❖ Heparin - glucoseaminoglycans
- ❖ Kafein – cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor

In vitro embriyo kültürü

İn vitro kültür ortamında zigotların bekletilmesi



**50-100 µl IVK ortamına 35 mm
Petri kutuları içinde 10-15 lik gruplar halinde yerleştirme**



**9 gün boyunca IVK ortamı ve CO₂ altında 38.5°C'de
inkübasyon (5% CO₂ gazı, 90-95% nem)**

In vitro dölleme ve olgunlaştırma ile ilgili önemli hususlar

- ▶ Su kalitesi
- ▶ Tampon çözelti kullanımı ve Osmolarity
- ▶ Kültür ortamı
- ▶ Matürasyon (olgunlaştırma) süresinin etkisi

Diğer hususlar..

- Antibiyotik & mineral yağ kullanımı
- Işıktan koruma
- Sıcaklık ve gaz
- Kültür ortamının saklanması

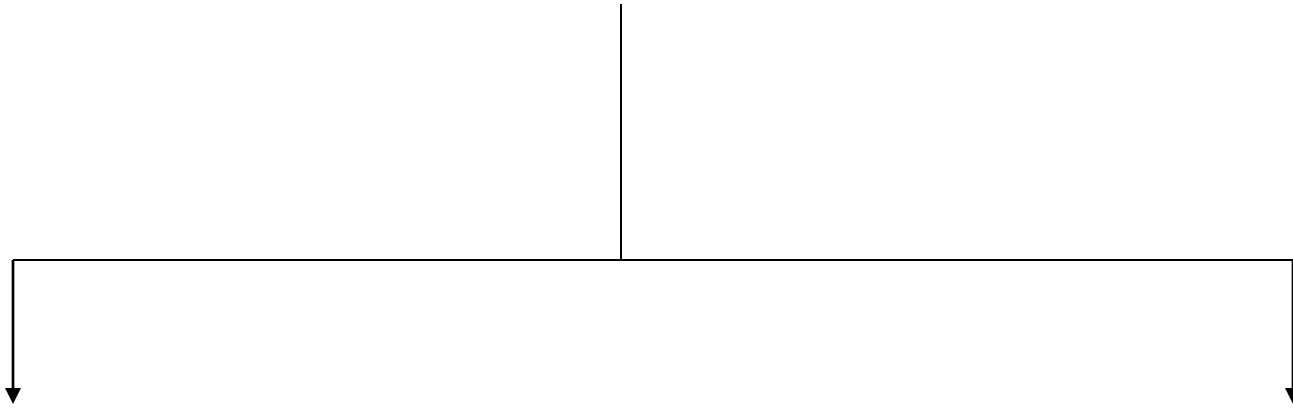
Kultur için kullanılan ek ürünler

◆ Protein

◆ Hormonlar ve büyüme faktörleri

◆ Kültür kabı

In vitro kultur sistemi

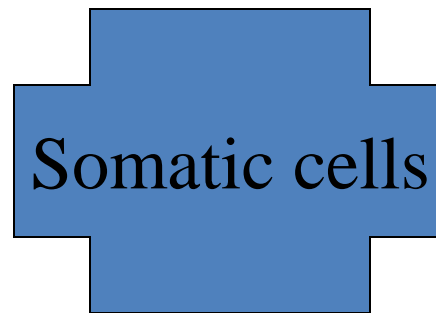


Somatik hücre barındıran
Kompleks ortam

Basit ortam

Kompleks ortamda kültür

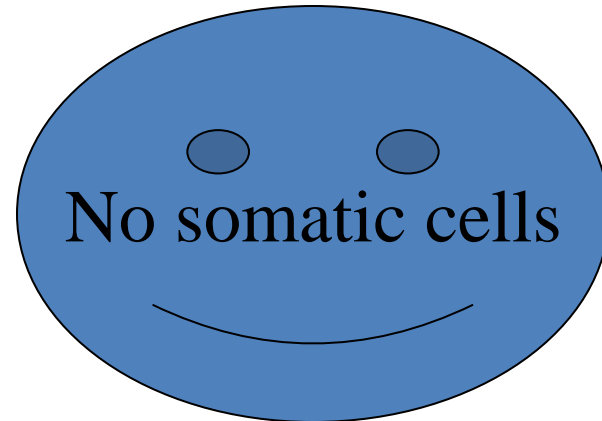
- TCM-199
- F-10
- MEM
- RPMI



- Oviductal epithelia cells
- Granulosa cell
- VERO (Afrika Yeşil maymunu böbrek epiteli)
- BRL
- STO
- 3T3

Basit kültür ortamı

- mCRaa1
- mCRaa2
- mSOFaa
- KSOMaa
- G1/G2



Embriyo kalitesini iyileştirme için kriterler

✓ **Mükemmel** : Sferik, Simetrik ve üniform hücre boyutu

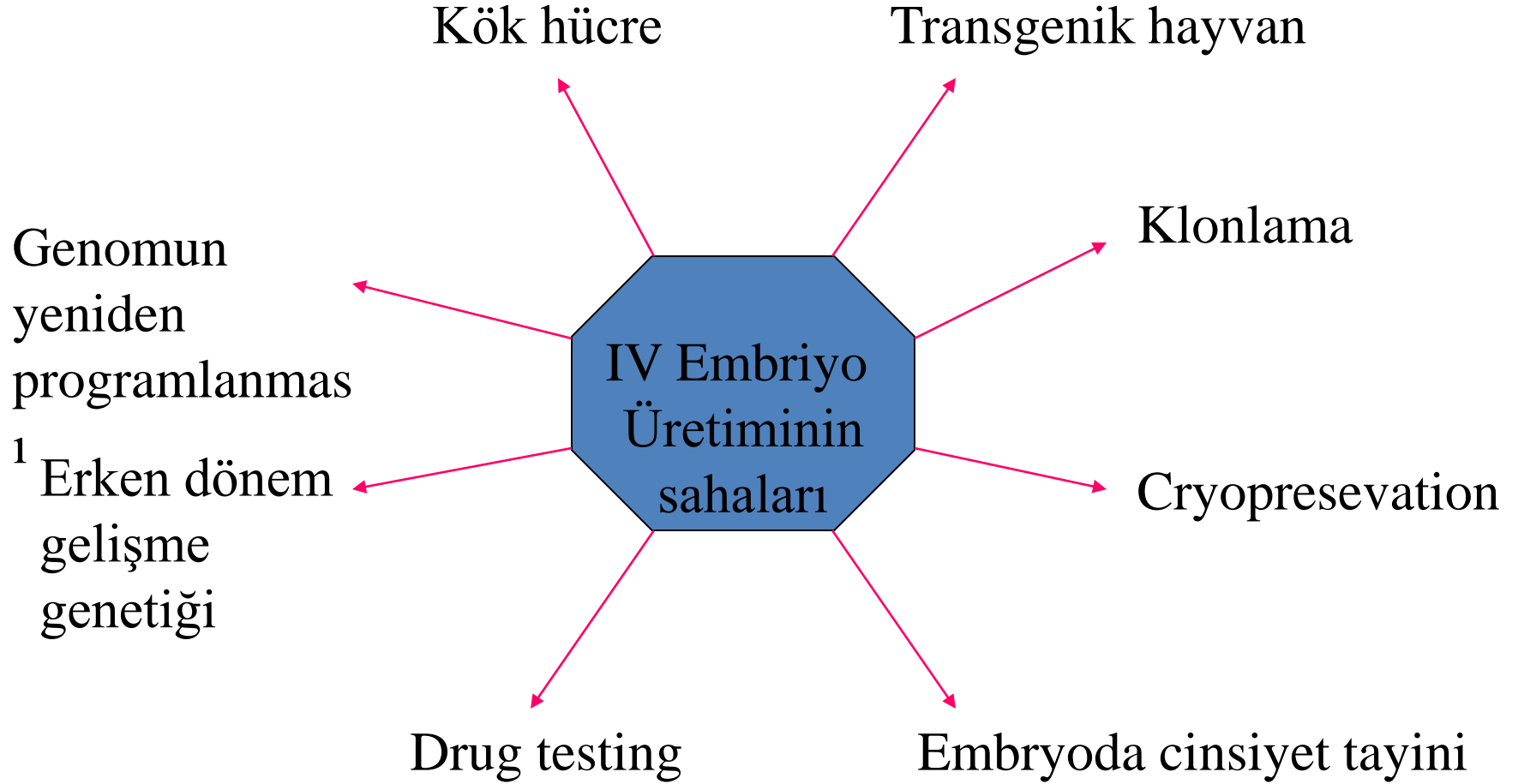
iyi : Az sayıda dışarı saçılmış ve düzgün olmayan formda blastomer hücresi

✓ **Orta** : Dışarı saçılmış blastomerler, az sayıda dejenere hücrenin varlığı

✓ **Kötü** : Çok sayıda dışarı saçılmış blastomer ve dejenere hücre

Embriyo gelişiminin değerlendirilmesi

- ✓ 2-16 hücreli safha
- ✓ Morula : 32 den fazla hücreli safha
- ✓ Kompakt morula : Blastomerlerin kompakt görünümü
- ✓ Erken blastocyst : Blastosol boşluğunun yeni oluştuğu safha
Blastocyst : Bariz görülen blastosol & hücre farklılaşmasının başlaması
- ✓ Genişlemiş blastocyst : Embriyo genişlemiş zona incelmış
- ✓ Açılmış blastocyst : Embriyonun kısmen veya tamamen zona pellüsidadan çıkması



Dünya’da IVF yoluyla embriyo üretimi

	Toplam			Uyarımlı			Uyarımsız		
Ülke	uygula ma	Oosit sayısı	Embri yo say.	uygula ma	Oosit sayısı	Embri yo say.	uygula ma	Oosit sayısı	Embri yo say.
Finlan diya	148	1084	235	0	0	0	148	1084	235
Fransa	256	2441	778	212	2203	716	44	238	62
Alman ya	1631	13663	2244	-	-	-	-	-	-
İtalya	730	9258	1481	-	-	-	730	9258	1481
Hollan da	5818	45395	8727	-	-	-	730	9258	1481
İspany a	55	668	103	54	614	83	1	54	20
Rusya	446	1808	195	0	0	0	446	1808	195
Avrup	9092	74397	13780	274	2897	816	4543	12442	4237

Mezbaha kökenli ovaryumlardan oosit üretimi

Ülke	Verici sayısı	Toplanan oosit sayısı	Transfer edilebilir embriyo
Almanya	24	889	165
İtalya	10	428	108
Litvanya	3	9	0
Hollanda	28	1146	161
Toplam	65	2472	434