

İn vitro üretilmiş sığır blastosistlerinin çapı ve hücre sayısı arasındaki korelasyon

Uğur ŞEN

Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kırşehir

Geliş Tarihi / Received: 17.12.2014, **Kabul Tarihi** / Accepted: 04.02.2015

Özet: İn vitro üretilmiş blastosistlerin hücre sayısı, blastosist kalitesi ve canlılığının önemli bir göstergesidir. Bu çalışma in vitro üretilmiş sığır blastosistlerinin çapı ve hücre sayısı arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Sığır ovaryumlarından elde edilen oositler, %10 FCS eklenmiş doku kültür medyumunda (TCM-199) 22 saat süreyle 38.5°C'de, %5 CO₂ ve yaklaşık %95 oranında nem içeren ortamda in vitro olgunlaştırıldıktan sonra, modifiye Tyrode'nin albumin laktat piruvat fertilizasyon medyumunda 22 saat süreyle benzer çevre koşullarında in vitro fertilize edilmişlerdir. Elde edilen muhtemel zigotlar SOFaa embriyo kültür medyumunda 38.5°C'de, %5 CO₂, %5 O₂ ve yaklaşık %95 oranında nem içeren ortamda 7 gün boyunca kültür edilmişlerdir. Embriyo kültürünün sonunda blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların (n=45) ortalama çapları 187.1 ± 5.4 ve iç hücre kitlesi hücre sayısı 33.2 ± 0.9, trophektoderm hücre sayısı 59.1 ± 2.2 ve toplam hücre sayısı 92.3 ± 2.1 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen blastosistlerin çapı ile iç hücre kitlesi hücre sayısı arasında bir ilişki saptanmazken, çapı ile trophektoderm ve toplam hücre sayısı arasında yüksek oranda bir ilişki saptanmıştır (P<0.01). Ayrıca trophektoderm hücre sayısı ile iç hücre kitlesi hücre sayısı arasında bir ilişki saptanmazken, toplam ve trophektoderm hücre sayısı (P<0.01) ve toplam ve iç hücre kitlesi hücre sayısı (P<0.05) arasında yüksek oranda bir ilişki saptanmıştır. Çalışmanın sonuçları in vitro üretilmiş blastosistlerin çapı ile hücre sayısının yüksek oranda ilişkili olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla blastosist çapının belirlenmesi blastosist kalitesinin değerlendirilmesinde bir araç olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimler: Sığır, İn vitro, Embriyo, Hücre sayısı, Blastosist çapı

Correlation between the cell number and diameter of in vitro produced bovine blastocysts

Abstract: Cell numbers of in vitro produced blastocysts is an importance indicator of quality and viability of blastocysts. This study was conducted to determine the correlation between the cell number and the diameter of in vitro produced bovine blastocysts. Oocytes obtained from bovine ovaries were matured in tissue culture medium (TCM-199) supplemented with 10% FCS for 22 hours in 95% humidified air with 5% CO₂ at 38.5°C and fertilized in modified Tyrode's albumin lactate pyruvate fertilization medium for 22 hours at similar environmental conditions. The putative zygotes were cultured in SOFaa for 7 days in 95% humidified atmosphere with, 5% CO₂ and 5% O₂ at 38.5°C. At the end of the culture period, average diameter and inner cell mass, trophectoderm and total cell number of blastocysts (n=45) were 187.1 ± 5.4 µm, 33.2 ± 0.9, 59.1 ± 2.2 and 92.3 ± 2.1, respectively. Although there was no significant correlation between diameter and inner cell mass cell numbers of blastocysts, a significant correlation have determined between diameter, trophectoderm and total cell number of blastocysts (P<0.01). Additionally there was no significant correlation between trophectoderm and inner cell mass cell numbers of blastocysts, but there was a significant correlation between total and trophectoderm cell numbers (P<0.01) and total and inner cell mass cell numbers (P<0.05) of blastocysts. The results of present study show that highly correlation between diameter and cell number of in vitro produced blastocysts. Therefore, determination of blastocysts diameter may be used as a tool for evaluation of blastosist quality.

Keywords: Bovine, In vitro, Embryo, Cell number, Diameter of blastocysts

Giriş

İn vitro üretilen sığır embriyolarının canlılığı embriyo yaşı, embriyonik gelişim aşaması ve embriyo kalitesi gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir [3]. Blastosist aşamasındaki embriyoların canlılığı yaygın bir şekilde kullanılan morfolojik gözlemler

ile değerlendirilmektedir [21]. Ancak bu morfolojik gözlemler embriyo canlılığının kesin bir göstergesi olmamakla birlikte in vitro üretilen blastosistlerin sahip oldukları hücre sayısı embriyo canlılığının geçerli bir göstergesidir [22]. Jiang ve ark., [15] in vitro üretilen sığır blastosistlerinin sahip oldukları hücre sayısının morfolojik derecelendirmeye göre

farlılık gösterebildiğini ve blastosist aşamasına geç ulaşan embriyolarında zayıf kaliteli olarak sınıflandırıldığını bildirmiştir.

Blastosist çapı blastosist kalitesinin değerlendirilmesinde tam bir gösterge olmasa da, Hazeleger ve ark. [12] *in vivo* veya *in vitro* üretilmiş geniş çaplı blastosistlerin transferinden daha küçük çaplı blastosistlerin transferlerine göre yüksek oranda gebelik ve çoğuz doğum elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Kidson ve ark. [18] *in vitro* üretilmiş blastosist aşamasındaki embriyoların beklenenden küçük çapa sahip olmalarının, hücre çoğalma etkinliğinde veya blastomer oluşumunda gerçekleşen salgı aktivitesinde gerçekleşmiş olan anormalliklerin bir göstergesi olabileceğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla blastosist aşamasındaki embriyoların çapı ile hücre sayısı arasındaki ilişkinin yüksek olması blastosist çapının embriyo kalitesinin belirlenmesinde bir araç olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Bu sebeple, mevcut çalışmada *in vitro* üretilmiş siğir blastosistlerinin çapı ile hücre sayısı arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Mezbahadan temin edilen siğir ovaryumları, 30-35°C deki 0.1 µg/ml gentamisin sülfat ilave edilen %0.9'luk serum fizyolojik içerisinde kesimden en fazla 3 saat sonra laboratuara ulaştırılmıştır. Ovaryumlar üzerindeki 2-8 mm çapındaki foliküller 10 ml'lik şırınganın içerisine 18 g'lik iğne kullanılarak toplanmıştır. Toplanan oositler %1 antibiyotik antimikotik solüsyon eklenmiş (Sigma, A5955; 10000 IU penisilin, 100 mg streptomisin ve 25 µg amfoterisin B/mL) hepes tamponlu doku kültür medyumunda (H-TCM-199; Sigma, M7528) 2 defa yıkandıktan sonra etrafında 3-4 sıra kumulus hücre kitlesi bulunan homojen sitoplazmaya sahip oositler *in vitro* olgunlaştırma için seçilmiştir. Seçilen oositler 2 defa olgunlaştırma medyumunda yıkandıktan sonra 4 kuyulu kültür kabına her bir kuyuda yaklaşık 30-40 adet oosit olacak şekilde üzeri mineral yağ ile kaplanmış olgunlaşma medyumuna (500 µl) aktarılmıştır. Daha sonra oositler 38.5 °C'de, %5 CO₂ ve yaklaşık %95 oranında nem içeren ortamda 22 saat *in vitro* olgunlaştırılmaya bırakılmıştır. Olgunlaştırma medyumuna bikarbonat tamponlu doku kültür medyumuna (TCM-199; Sigma, M4530) %10 fetal kalf serum, 27.5 µg/ml sodyum piruvat,

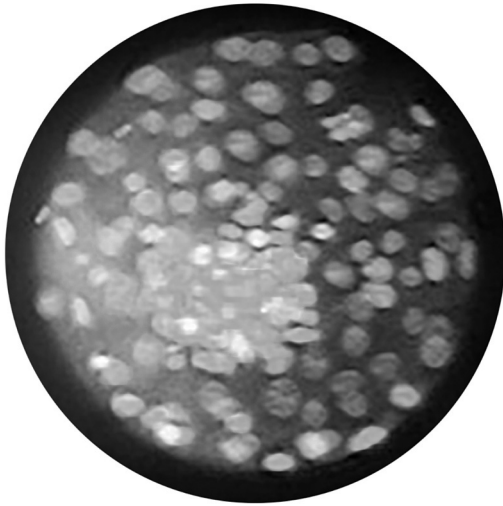
0.5 µg/ml FSH, 5.0 µg/ml LH ve 10.0 ng/ml epidermal büyüme faktörü ve %1 antibiyotik antimikotik solüsyon ilave edilmesiyle hazırlanmıştır [5].

Olgunlaştırma süresinin sonunda tam kumulus hücre genişlemesi sergilemiş oositler olgunlaşmış oositler olarak *in vitro* fertilizasyon için seçilmiş ve 2 defa H-TCM-199'da 2 defa da fertilizasyon medyumunda yıkanmışlardır. Yıkama işleminden sonra oositler üzeri mineral yağla kaplanmış 46 µl'lik fertilizasyon damlacıklarına damlacık başına 10-15 oosit düşecek şekilde aktarılmıştır. Her bir fertilizasyon damlasına perkol gradient yöntemi [23] ile ayrılıp konsantrasyonu belirlenmiş (2×10⁶ sperm hücresi/ml) olan dondurulup çözdürülmüş boğa spermasından 2 µl ve 2 µl penisilamin (20 mM) hipotaurin (10 mM) ve epinefrin (1 mM) karışımından eklenerek damlacık hacmi 50 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra oositler 38.5°C'de, %5 CO₂ ve yaklaşık %95 oranında nem içeren ortamda 22 saat *in vitro* fertilizasyona bırakılmıştır. *In vitro* fertilizasyon medyumuna Tyrode'nin albumin laktat piruvat fertilizasyon medyumuna 10 µg/mL Heparin (Sigma, H3149), 250 µg/ml ticari kafein (Kafedif; kafein 250 mg/ml), 22.5 µg/ml sodyum piruvat, 1µl/ml antibiyotik antimikotik solüsyon ve 8 mg/ml yağ asidi içermeyen siğir serum albumini (BSA-FAF, Sigma, A6003) eklenerek hazırlanmıştır [4].

In vitro fertilizasyondan sonra muhtemel zigotlar, etrafını çevreleyen kumulus hücrelerinden vorteks işlemi ile kumulus hücrelerinden tamamen ayrılmıştır. Daha sonra muhtemel zigotlar 2 defa H-TCM-199'da 2 defa da SOFaa embriyo kültür medyumunda yıkanmışlardır. SOFaa embriyo kültür medyumuna standart SOF embriyo kültür medyumuna [19] 8 mg/ml BSA-FAF, 10 µl/ml esansiyel olmayan amino asit solüsyonu (MEM 100X, Sigma, M7145) ve 20 µl/ml esansiyel amino asit solüsyonu (BME 50X, Sigma, B6766) ve %1 antibiyotik antimikotik solüsyon eklenmesiyle hazırlanmıştır [4]. Yıkama işleminden sonra zigotlar üzeri mineral yağla kaplanmış 50 µl'lik embriyo kültür damlacıklarına damlacık başına 10-15 zigot düşecek şekilde aktarılmıştır. Daha sonra zigotlar 38.5°C'de, %5 CO₂, %5 O₂ ve yaklaşık %95 oranında nem içeren ortamda 8 gün boyunca kültüre bırakılmışlardır. *In vitro* kültüre alınan embriyoların gelişimleri fertilizasyondan sonraki 3, 5 ve 7. günlerde stereo mikroskop kullanılarak 10× büyütmede gözlemlen-

miştir. Erken dönemde bölünen embriyoların hücre sayılarının doğru olarak tespit edilmesi için embriyoların pozisyonları değiştirilerek sayım gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca embriyoların bölünme, morula ve blastosist safhasına ulaşma oranları değerlendirilmiştir.

Embriyo kültürünün sonunda elde edilen blastosistlerin çapları Kuran ve ark. [19]'in bildirdiği şekilde (zona pellusida dahil) 200× büyütmede oküler mikrometre eklenmiş floresan mikroskop (Nikon, ECLIPSE, TS100) altında ölçülmüştür. Çapları belirlenen blastosistlerin iç hücre kitlesi ve trophektoderm hücre sayıları ise Van Soom ve ark. [24]'in bildirdiği şekilde diferansiyel boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Boyama sonrasında blastosistler 400× büyütmede UV filtre eklenmiş floresan mikroskop altında fotoğraflanmış ve iç hücre kitlesi ve trophektoderm hücre sayıları ImageJ 1.19Z görüntü analiz programı kullanılarak belirlenmiştir. Boyanan blastosistlerin orta bölgesinde yer alan iç hücre kitlesi hücreleri mavi renkte trophektoderm hücreleri ise kırmızı renkte görünmektedir (Şekil 1). Blastosistlerin toplam hücre sayısı iç hücre kitlesi ve trophektoderm hücrelerinin toplanmasıyla elde edilmiştir.



Şekil 1. Diferansiyel boyanmış blastosist. Mavi renkte olan hücreler iç hücre kitlesi hücreleri ve kırmızı renkte olan hücreler trophektoderm hücreleridir.

Elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistikleri ve korelasyon analizleri SPSS 19.0 istatistik paket programında yapılmış olup blastosistlerin iç hücre kitlesi, trophektoderm, toplam hücre sayısı ve çapı arasındaki ilişki %95 güven aralığında Pearson korelasyon analizi ile belirlenmiştir.

Bulgular

Çalışmada kullanılmak üzere mezbananeye kesim için getirilen 29 baş sığırdan elde edilen toplam 58 adet ovaryum laboratuvara getirilmiştir. Bunlardan 9 tanesi foliküler ve lüteal kistli yapılar içerdiğinden veya oosit elde etmek için uygun foliküler yapıya sahip olmadığından deneme dışı bırakılmış olup, çalışmada toplam 49 adet siğir ovaryumu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan ovaryumlardan toplam 196 adet oosit elde edilmiş olup ovaryum başına ortalama 4 adet oosit düşmektedir. Çalışmada *in vitro* olgunlaştırmaya alınan oositlerden %93.4 (183 oosit)'ü tam kumulus genişlemesi sergilemiş olup bu oositler olgunlaşmış olarak kabul edilip *in vitro* fertilizasyona alınmışlardır.

In vitro fertilizasyon sonrasında embriyo kültürüne alınan muhtemel zigotların embriyonik gelişim aşamalarının oranları Tablo 1'de sunulmuştur. Embriyo kültürünün 3. gününde yapılan kontrollerde muhtemel zigotların %70.5'inin bölünmüş olduğu tespit edilmiştir. Kültürün 5. gününde yapılan kontrollerde zigotların %30.6'sının morula aşamasına ulaştığı tespit edilmiştir. Embriyo kültürünün 7. gününde yapılan kontrollerde ise zigotların %24.6'sının blastosist aşamasına ulaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca embriyo kültürüne alınan zigotlardan blastosist aşamasına ulaşanların yarıklanma gösterenlere oranı ise %34.9 olarak tespit edilmiştir.

Embriyo kültürü sonunda blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların ortalama çapı, iç hücre kitlesi, trophektoderm ve toplam hücre sayıları Tablo 2'de sunulmuştur. Embriyo kültürü sonunda blastosist aşamasına ulaşmış toplam 45 embriyonun ortalama çapı $187.1 \pm 5.4 \mu\text{m}$, ortalama iç hücre kitlesi hücre sayısı 33.2 ± 0.8 , ortalama trophektoderm hücre sayısı 59.1 ± 2.2 ve ortalama toplam hücre sayısı 92.3 ± 2.1 olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. Embriyo kültürüne alınan muhtemel zigotların embriyonik gelişim aşamalarının oranları.

Elde edilen oosit (n)	Kültüre aktarılan muhtemel zigot (n)	Bölünme oranı (%)	Morula oranı (%)	Blastosist oranı (%)	Blastosist/bölünme oranı
196	183	129/183 (70.5)	56/183 (30.6)	45/183 (24.6)	45/129 (34.9)

Tablo 2. Embriyo kültürü sonunda blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların ortalama çapı, iç hücre kitlesi, trophektoderm ve toplam hücre sayıları.

Blastosist sayısı	Blastosist çapı µm	İHK	TRP	THS
45	187.1±5.4	33.2±0,8	59.1±2.2	92.3±2.1

İHK = iç hücre kitlesi hücre sayısı, TRP = trophektoderm hücre sayısı, THS = toplam hücre sayısı.

Embriyo kültür sonunda blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların çapı, iç hücre kitlesi hücre sayısı, trophektoderm hücre sayısı ve toplam hücre sayıları arasındaki Pearson korelasyon katsayıları Tablo 3’de sunulmuştur. Elde edilen blastosistlerin çapı ile iç hücre kitlesi hücre sayısı arasında bir ilişki saptanmazken ($r = 0.497$; $P > 0.05$), çap ile trophektoderm ($r = 0.785$; $P < 0.01$) ve toplam hücre sayısı arasında yüksek oranda bir ilişki saptanmıştır ($r = 0.821$; $P < 0.01$). Ayrıca trophektoderm hücre sayısı ile iç hücre kitlesi hücre sayısı arasında bir ilişki saptanmazken ($r = 0.238$; $P > 0.05$), toplam ve trophektoderm hücre sayısı ($r = 0.918$; $P < 0.01$) ve toplam ve iç hücre kitlesi hücre sayısı ($r = 0.701$; $P < 0.05$) arasında yüksek oranda bir ilişki saptanmıştır.

Tablo 3. Embriyo kültür sonunda blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların çapı, iç hücre kitlesi hücre sayısı, trophektoderm hücre sayısı ve toplam hücre sayıları arasındaki Pearson korelasyon katsayıları (%95 güven aralığında).

	THS	İHK	TRP
Çap	0.821**	0.497	0.785**
TRP	0.918**	0.238	
İHK	0.701*		

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Çap = blastosist çapı, İHK = iç hücre kitlesi hücre sayısı, TRP = trophektoderm hücre sayısı, THS = toplam hücre sayısı.

Tartışma ve Sonuç

Sığırlarda *in vitro* embriyo üretimindeki başarı oranını laboratuvar şartlarına, kültür şartlarına, kullanılan kültür medyumları ile çeşitli katkı maddeleri ve

bileşimlerine bağlı olarak değişmekle birlikte *in vitro* oosit olgunlaşma oranındaki başarı %60 ile %90 arasında değişiklik gösterebilmektedir [1]. Dahası *in vitro* fertilizasyona alınan *in vitro* olgunlaştırılmış oositlerin %20 ile %50’si Morula-Blastosist aşamasına ulaşabilmektedir [1,10]. Mevcut çalışmada elde edilen *in vitro* olgunlaşma oranı ve *in vitro* fertilizasyon sonrasındaki embriyonik gelişim aşamalarının oranları genel olarak literatürde belirtilen değerler ile uyum göstermekte olup blastosist aşamasına ulaşmış embriyo oranı yaklaşık %25 olarak gerçekleşmiştir.

Bó ve Mapletoft [2] *in vitro* üretilmiş blastosist safhasındaki siğir embriyolarının ortalama 150 ile 190 µm (zona pellusidanın 12-15 µm’lik kalınlığı dahil) arasında değişen genişliklerde çapa sahip olabileceğini bildirmiştir. Mevcut çalışmada da embriyo kültürünün 7. gününde blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların çapı (yaklaşık 187 µm) bu çalışmadakine benzerlik göstermektedir.

Yapılan bazı çalışmalar *in vitro* üretilmiş blastosist safhasındaki siğir embriyolarının 80 ile 120 arasında hücreye sahip olduklarını göstermiştir [10,21]. Ayrıca *in vitro* şartlarda blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların iç hücre kitlesi hücre sayısının toplam hücre sayısının yaklaşık %37’sini oluşturduğu bildirilmiştir [11,24]. Mevcut çalışmada blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların iç hücre kitlesi hücre sayısı toplam hücre sayısının ortalama %35’ini oluşturmakta olup bu değer literatürle uyum göstermektedir.

Fötüsün nihai yapılarının oluştuğu, embriyoblast olarak da bilinen iç hücre kitlesi memeli hayvanların çoğunda erken embriyogenesis aşamasında blastosistin iç kısmında oluşan hücre yığındır [6]. İç hücre kitlesi zamanla embriyonun gövdesini oluşturmakta ve embriyonun uterus endometriumuna bağlanmasından önce gelişimini tamamlamaktadır [24]. İç hücre kitlesi blastosist boşluğu olarak bilinen blastoselin tabanında katmanlaşmış veya kompaktlaşmış durumda ve trophektoderm dokusu (trofoblast hücreleri) ile çevrilmiş olarak bulunmak-

tadır [24]. Yapılan çalışmalar embriyoda “tight-junctions” adı verilen embriyo içi hücre sıkışması (kompaktlaşma) sonucu oluşan yapının trophektoderm ve iç hücre kitlesi hücre popülasyonlarının farklılaşması için mutlak surette gerekli olduğunu göstermiştir [20,24].

İç hücre kitlesi fetüs organlarının ve yapılarının meydana gelmesi için gerekli germ tabakalarının oluşacağı tek kaynaktır [6]. Embriyoda germ tabakalarının oluşmasından hemen sonra embriyonun dış zarları köken aldığı trophektoderm dokusundan gelişmeye başlamaktadır [11]. Trophektoderm dokusu embriyonun uterus endometriumuna bağlanmasını ve plasantasyonun gerçekleşmesini sağlamakla görevli olup, plasentanın amniyon, allantois ve koriyon zarlarının köken aldığı embriyonik yapıdır [11].

In vitro çevre şartları embriyonun blastosist aşamasına ulaşıncaya kadarki hücre gelişimini ve farklılaşmasını etkileyebilmektedir. Yapılan çalışmalar *in vitro* şartlarda üretilmiş siğir blastosistlerinin *in vivo* üretilmişlere göre daha düşük oranda iç hücre kitlesi hücrelerine sahip olduğunu bildirmişlerdir [7,14]. Giritharan ve ark. [9] *in vitro* şartlarda üretilmiş fare embriyolarının *in vivo* üretilenlere göre daha az sayıda trophektoderm ve iç hücre kitlesi hücre sayısına sahip olduğunu ve *in vitro* kültür şartlarının blastosist safhasına ulaşmış embriyoların iç hücre kitlesi ve trophektoderm hücrelerindeki transkriptom seviyesini etkilediği bildirilmiştir. Embriyo kalitesini belirleyen en önemli faktörlerden birisi iç hücre kitlesinin sahip olduğu hücre sayısıdır. Ganeshan ve ark. [8] iç hücre kitlesi hücre hattı gelişiminin, embriyo kültür şartlarının oluşturduğu strese karşı, trophektoderm hücre hattından çok daha fazla hassas olduğunu bildirmiştir. Ayrıca *in vitro* şartların embriyonun transferinden sonra uterus endometriumuna tutunması ve canlı fetüs oluşturabilmesi kapasitesi üzerine çok büyük etkileri olduğunu da bildirmişlerdir. Bütün bu durumlar *in vitro* şartların embriyoların hücresele farklılaşması ve embriyo kalitesi üzerine etkili olabileceğini göstermektedir.

Van Soom ve ark. [24] *in vitro* üretilmiş blastosist safhasındaki embriyoların iç hücre kitlesinde az sayıda hücre bulunmasının transferden sonra embriyonun gebelik oluşturması için gerekli embriyonik gelişimi sağlayamayacağını, dolayısıyla bu

embriyolardan elde edilecek gebelik oranının düşük olabileceğini bildirmiştir. Ganeshan ve ark. [8] ise fetüsün oluşacağı iç hücre kitlesi hücre hattı gelişiminin, embriyo kültür şartlarının oluşturduğu strese karşı, plasentanın oluşacağı trophektoderm hücre hattından çok daha fazla hassas olduğunu ve *in vitro* şartların embriyonun transferinden sonra uterus endometriumuna tutunması ve canlı fetüs oluşturabilmesi kapasitesi üzerine de çok büyük etkileri olduğunu da bildirmişlerdir. Bütün bu durumlar embriyonun sahip olduğu iç hücre kitlesi hücre sayısının ileriki embriyonik veya fetal gelişim için ne derecede önemli olduğunu bir göstergesidir. Fakat günümüzde embriyonun sahip olduğu iç hücre kitlesi hücre sayısı diferansiyel boyama tekniği ile belirlenmekte ve boyama işleminden sonra embriyo ölmektedir. Dolayısıyla blastosist aşamasına ulaşmış embriyoları öldürmeden iç hücre kitlesi hücre sayısını dolayısıyla kalitesi belirleyecek alternatif ve ölümle sonuçlanmayan metotlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Ju ve ark. [16] embriyo çapı ile blastomer (hücre) büyüklüğü ve sayısı arasında pozitif bir ilişki olduğunu ve blastosist aşamasındaki embriyoların hücre sayısı arttıkça çaplarının da arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, Mori ve ark. [21] *in vitro* üretilmiş siğir blastosistlerinin hücre sayısı, gelişim aşaması ve çapı arasında yüksek oranda bir ilişkinin olduğunu ve blastositin geliştikçe çapının ve hücre sayısının artacağını bildirmişler. Blastosist çapı blastosist kalitesinin değerlendirilmesinde tam bir gösterge olmasa da, Hazeleger ve ark. [12] *in vivo* veya *in vitro* üretilmiş geniş çaplı blastosistlerin transferinden daha küçük çaplı blastosistlere göre yüksek oranda gebelik ve çoğuz doğum elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Kidson ve ark. [18] *in vitro* üretilmiş blastosist aşamasındaki embriyoların beklenenden küçük çapa sahip olmalarının, hücre çoğalma etkinliğinde veya blastomer oluşumunda gerçekleşen salgı aktivitesinde gerçekleşmiş olan anormalliklerin bir göstergesi olabileceğini bildirmişlerdir. Jung ve Fischer [17] ve Kidson ve ark. [18] blastosistler geliştikçe çapı ve metabolizma hızının artabileceğini bildirmişlerdir.

Mevcut çalışmada embriyo kültür sonunda blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların çapı ile iç hücre kitlesi hücre sayısı arasında bir ilişki saptanmazken, çap ile trophektoderm ve toplam hücre

sayısı arasında yüksek oranda bir ilişki saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına benzer olarak, Hoelker ve ark. [13] *in vitro* üretilmiş sığır blastosistlerinin çapı ile toplam hücre sayısı ve trophektoderm hücre sayısı arasında önemli bir ilişkinin olduğunu bildirmiştir. Yine aynı çalışmada blastosist çapı arttıkça toplam hücre sayısı ve trophektoderm hücre sayılarının da arttığı ve blastosistlerin gelişim aşamaları (orta, genişlemiş ve hatch yada yarıklanmış) ile hücre çapı arasında yüksek oranda bir ilişkinin var olduğunu bildirilmiştir.

Sonuç olarak mevcut çalışmamızda embriyo kalitesinin temel göstergelerinden biri olan iç hücre kitlesi hücre sayısının blastosist çapı ile bir ilişkisi saptanmasa da toplam hücre sayısı ile ve trophektoderm hücre sayısının blastosist çapı ile olan ilişkisi blastosist çapının kalite belirlemede bir kriter olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Kaynaklar

1. Akyol N, Kızıl SH, Kardeşin T (2007): *In vitro* sığır embriyo-su üretim ve transferi Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 47: 1-8.
2. Bó GA, Mapletoft RJ (2013): Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*, 10: 344-348.
3. Carvalho RV, Del Campo MR, Palasz AT, Plante Y, Mapletoft RJ (1996): Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. *Theriogenology*, 45: 489-498.
4. Çevik M, Koçyiğit A, Şen U, Kuran M (2014): Can commercial human embryo culture media be used in bovine embryo culture? *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20: 149-153.
5. Çevik M, Şen U, Koçyiğit A, Soydan E, Kuran M (2011): Effects of serum, gonadotropins, epidermal growth factor and estradiol 17-beta on cumulus expansion and nuclear maturation of bovine oocytes. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17: 1009-1014.
6. Dobbs KB, Khan FA, Sakatani M, Moss JI, Ozawa M, Ealy AD, Hansen PJ (2013): Regulation of pluripotency of inner cell mass and growth and differentiation of trophectoderm of the bovine embryo by colony stimulating factor 2. *Biology of Reproduction*, 89: 1-10.
7. Du F, Looney CR, Yang X (1996): Evaluation of bovine embryos produced *in vitro* vs. *in vivo* by differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells. *Theriogenology*, 45: 211.
8. Ganeshan L, Li A, O'Neill C (2010): Transformation-related protein 53 expression in the early mouse embryo compromises preimplantation embryonic development by preventing the formation of a proliferating inner cell mass. *Biol. Reprod.*, 83: 958-964.
9. Giritharan G, Delle Piane L, Donjacour A, Esteban FJ, Horcajadas JA, Maltepe E, Rinaudo P (2012): *In vitro* culture of mouse embryos reduces differential gene expression between inner cell mass and trophectoderm. *Reproduction Science*, 19: 243-252.
10. Gordon I (2003): *Laboratory production of cattle embryos*, 2nd edition, CABI Publishing, Wallingford.
11. Hardy K (1997): Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction*, 3: 919-925.
12. Hazeleger W, Bouwman EG, Noordhuizen JP, Kemp B (2000): Effect of superovulation induction on embryonic development on day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, 53: 1063-1070.
13. Hoelker M, Schmoll F, Schneider H, Rings F, Gilles M, Tesfaye D, Jennen D, Tholen E, Griese J, Schellander K (2006): Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. *Reproduction, Fertility and Development*, 18: 551-557.
14. Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T (1990): Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90: 279-284.
15. Jiang HS, Wang WL, Lu KH, Gordon I, Polge C (1992): Examination of cell numbers of blastocysts derived from IVM, IVF and IVC of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 37: 229.
16. Ju JC, Yang JS, Liu CT, Chen CH, Tseng JK, Chou PC, Cheng SP (2003): Differential influences in sizes and cell cycle stage of donor blastomeres on the development of cloned rabbit embryos. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16: 15-22.
17. Jung T, Fischer B (1988): Correlation between diameter and DNA or protein synthetic activity in rabbit blastocysts. *Biology of Reproduction*, 39: 1111-1116.
18. Kidson A, Rubio-Pomar FJ, Van Kneysel A, Van Tol HT, Hazeleger W, Ducro-Steeverink DW, Colenbrander B, Dieleman SJ, Bevers MM (2004): Quality of porcine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of GH. *Reproduction*, 127: 165-177.
19. Kuran M, Robinson JJ, Staines ME, McEvoy TG (2001): Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. *Theriogenology*, 55: 593-606.
20. Kuran M, Robinson JJ, Brown DS, McEvoy TG (2002): Development, amino acid utilization and cell allocation in Bovine Embryos after *in vitro* production in contrasting culture systems. *Reproduction*, 124: 155-165.
21. Mori M, Otoi T, Suzuki T (2002): Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 37: 181-184.
22. Papaioannou VE, Ebert KM (1988): The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development*, 102: 793-803.
23. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL (1986): Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25: 591-600.
24. Van Soom A, Boerjan M, Ysebaert MT, de Kruif A (1996): Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Molecular Reproduction and Development*, 45: 171-182.