

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**TRANSGENİK EMBRİYO ÜRETİMİ İÇİN KOÇ
SPERMATOZOOMLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE
TRANSFEKTE EDİLMESİ**

GÜL BAKIRER ÖZTÜRK

**DANIŞMAN
PROF.DR.SERHAT PABUCCUOĞLU**

**DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA PROGRAMI**



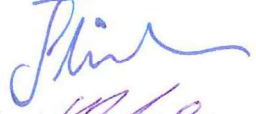


İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı Dölerme ve Sun'i Tohumlama Programında Araştırma Görevlisi Gül BAKIRER ÖZTÜRK tarafından hazırlanan Transgenik Embriyo Üretimi İçin Koç Spermatozoonlarının Farklı Yöntemlerle Transfekte Edilmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

23 / 09 / 2013

Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u> | <u>İmzası</u> |
|--|---|
| 1.Prof. Dr. Kemal AK İÜ Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı |  |
| 2.Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU İÜ Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı |  |
| 3.Prof. Dr. Sema BİRLER İÜ Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı |  |
| 4.Prof. Dr. H. Hakan BOZKURT İÜ Vet. Fak. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı |  |
| 5.Prof. Dr. Zekariya NUR Bursa Üni. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı |  |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün saffhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gül Bakırer Öztürk



İTHAF

Eşim Yetkin Öztürk'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tüm hayatım boyunca bana her türlü desteği vermiş olan annem Sacide ve babam Hidayet Bakırer başta olmak üzere,

Bilimle ilgilenmeme vesile olan ve bana bu yolda her zaman destek olan teyzem Prof.Dr.Yurdağül Canberk ve anneannem Hüsnüye Canberk'e, Çalışmalarım sırasında bana her tür teknik desteği sağlayan ağabeyim Cenk Bakırer'e, Hayvanları sevmemde en çok emeği geçen kişi olan dedem İsmail Bakırer'e , Doktoram süresince bana her konudaki desteklerinden ötürü annem Feyza Öztürk ve babam Yusuf Öztürk'e,

Sayın Enstitü Müdürüm Prof.Dr. Uğur Özbek'e, Anabilim Dalı Başkanım Yard.Doç.Dr. Mutlu Küçük'e, Yard.Doç.Dr. Aydın Çevik'e, bana bu 'harika' dönemde desteklerini hiç esirgemeyen Uzm.Vet.Hek. Fatma Tekeli ve Araş.Gör. Canan Uğur Yılmaz'a,

Doktoramı yapmış olduğum Anabilim Dalı Başkanım Sayın Kemal Ak'a ve en derin içtenliğimle bana her konuda çok katkısı olduğuna inandığım Sayın Prof.Dr. İ.Kamuran İleri'ye, Prof.Dr. Serhat Alkan'a, Prof.Dr. Alper Baran'a, Prof.Dr. Özen Banu Özdaş'a, Dr. Kamber Demir'e, Dönem arkadaşım Dr. İzem Sandal'a, Doktora Yazma Dönemi Arkadaşım Elif Öztürk'e, doktoram süresince bana her türlü destekte buldukları için Doktora Öğrencileri Ramazan Arıcı, Ayşe Can, Ezgi Ertürk, Elif Merve Çınar ve Hazar Karaçam'a, en yenimiz Selin Özdemirci'ye ise gelecekteki yardımları için şimdiden, tüm çalışmalarda emeği geçen Ercan Ketenci'ye, Doktoramın en zor zamanında pDNA'mı sentezleyerek yaptığı yardımını asla unutmayacağım Sayın Doç. Dr. Kadir Turan'a,

Bana her zaman destek olmuş Sevgili Hocam Prof.Dr. Saadet Pabuccuoğlu ve doktoramın en güzel zamanlarında bana denettiği polimerlerini hiç unutmayacağım Dr.Koray Gök'e,

Çalışmalarım sırasında şansını bana da bulaştırdığı için Sayın Hocam Prof.Dr. Mithat Evecen'e,

Birçok projede beraber çalışma şansını yakaladığım Sayın Doç.Dr.Ümüt Cirit'e,

Her zaman yanımda olan ve hayatımda her konuda örnek almış olduğum, bana akademisyenlik ile iyilik, dürüstlük ve çalışkanlığın bir arada bulunabileceğini ve bunun gerçek bilimsel başarıyı getireceğini öğreten çok değerli bilim insanı Sevgili Hocam Prof.Dr. Sema Birler'e ,

Ve son olarak lisans döneminden beri danışmanlığımı yapan, hayatımdaki en büyük şanslarımdan biri olan, açık görüşlülüğü, zekası ve sabrı ile bana her türlü zorluğun üstesinden gelebileceğimi gösteren, ekip çalışmasının önemini kavramamı sağlayan ve daha nice yıllar birlikte çalışmayı istediğim Sevgili Hocam, Doktora Babam Prof.Dr. Serhat Pabuccuoğlu'na çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 9191

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET.....	Xİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Transgenik Hayvan Üretiminin Kısa Tarihçesi.....	3
2.2. Transgenik Hayvan Üretiminin Amaçları.....	4
2.3. Memeli Hayvanların Kullanım Nedenleri.....	5
2.4. Genetiği Değiştirilmiş Canlılar Hakkındaki Güncel Etik Tartışmalar	7
2.5. Çalışma İçin Uygun DNA Seçimi	8
2.6. Üretilen Hayvanlarda Transfer Edilen Genin Tespit Yöntemleri	8
2.7. Transgenik Hayvan Üretim Teknikleri	9
2.7.1. Somatik Hücre Nükleer Transferi Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi ..	10
2.7.2. Embriyonik Kök Hücreler Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi.....	10
2.7.3. Pronükleer Mikroenjeksiyon Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi.....	11
2.7.4. Viral Vektörler Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi	11
2.7.5. Yeni Yöntemler ile Transgenik Hayvan Üretimi.....	12
2.7.6. Sperm Hücreleri Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi	13
2.7.6.1. Sperm DNA İnkübasyonu	15
2.7.6.2. Spermatozoanın Plazma Membranına Zarar Vererek SMGT.....	15
2.7.6.3. Soğuk Şoku Tekniği ile SMGT.....	15
2.7.6.4. Kimyasal Maddeler Kullanılarak SMGT	15
2.7.6.5. Elektroporasyon Yöntemi Kullanılarak SMGT	15

2.7.6.6. Taşıt Maddeler Kullanılarak SMGT	16
2.7.6.7. Lipofectamin Kullanılarak SMGT	16
2.7.6.8. Turbofect™ Kullanılarak SMGT	16
2.7.6.9. LDH Kullanılarak SMGT	16
2.7.6.10. Poli-β-aminoester kullanılarak SMGT	17
2.8. Sperm DNA Bağlanması ve Bağlanmayı Etkileyen Faktörler	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Kullanılan Stok Solüsyonlar:	20
3.1.1. Medyum 199 Stok (10 X)	20
3.1.2. Bikarbonat Stok Solüsyonu (B STOK):	20
3.1.3. Hapes Stok (H STOK):	20
3.1.4. Tuz Stoğu (S2 STOK):	21
3.1.5. Laktat Stoğu (L STOK):	21
3.1.6. Glikoz Stoğu (G STOK):	22
3.1.7. Kalsiyum Stoğu (D STOK):	22
3.1.8. Magnezyum Stoğu (M STOK):	22
3.1.9. Antibiyotik Stoğu (PS STOK):	23
3.1.10. Phenol Red Stoğu	23
3.2. Çalışmada Kullanılan Medyumlar ve Solüsyonlar:	24
3.2.1. Ovaryum Transport ve Yıkama Medyumu: Phosphate-buffered saline (PBS):	24
3.2.2. Oosit yıkama medyumu (OWM STOK): Hapes tamponlu medium (H-199+):	25
3.2.3. <i>In Vitro</i> Olgunlaşma Medyumu (OMM)	25
3.2.4. Oosit/Embriyo Yıkama Medyumu (HSOF), Manipulasyon Medyumu (* Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ içermeyen HSOF) ve Sperma Yıkama Medyumu (Percoll-SOF):	26
3.2.5. <i>In vitro</i> Fertilizasyon ve Embriyo Kültür Medyumları (BSOF, SOF):	28
3.2.6. Spermatozoa Sayımı İçin Kullanılan Hancock Solüsyonu:	30
3.2.7. Elektroporasyon İçin Kullanılan PBS:	31
3.3. Çalışmada Kullanılan Plasmid DNA'nın Eldesi	31
3.4. Gen Transferinde Kullanılacak Oositlerin Elde Edilmesi	31
3.5. MI Aşamasına Olgunlaşmış Oositlerin Gen Transferi İçin Hazırlanması:	32
3.6. Gen Transferi İçin Kullanılacak Olan Spermatozoanın Elde Edilmesi ve Ön Hazırlık Aşamaları:	32
3.7. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu İşlemi	33

3.8. Spermatozoa Aracılığı ile Gen Transferi İçin Grupların Oluşturulması ve Spermatozoanın Hazırlanması	33
3.8.1. Kontrol Grubu.....	33
3.8.2. Soğutma Grubu	33
3.8.3. Elektroporasyon Grubu	34
3.8.4. Triton-X Grubu	34
3.8.5. Turbofect Grubu.....	34
3.8.6. Lipofectamin Grubu	35
3.8.7. LDH Grubu.....	36
3.8.7.1. Çalışmada kullanılan katmanlı çift hidroksitlerin eldesi.....	36
3.8.8. Poli-B-Poli aminoester Grubu	37
3.9. İntrasitoplazmik Gen Enjeksiyonu Sonrasında Oosit Aktivasyonu ve Embriyo Kültürü.....	37
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	64
ETİK KURUL KARARI	75
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Elektroporasyonla spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar	40
Tablo 4-2: Soğuk şoku ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar	42
Tablo 4-3: Lipofectamin ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar	43
Tablo 4-4: Turbofect ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar	45
Tablo 4-5: Triton X -100 ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar	47
Tablo 4-6: LDH ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar.....	47
Tablo 4-7: Aminoester ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar	48
Tablo 4-8: Kontrol grubu ile elde edilen sonuçlar	48
Tablo 4-9: En iyi transgenik embriyo oranını veren grupların karşılaştırılmaları	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3-1 Mineral yağ ile kapatılmış intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu petrisi.....	33
Şekil 4-1: Olgunlaşma öncesi primer koyun oositleri.....	39
Şekil 4-2: Olgunlaşma sonrası kumulus açılımı gösteren ve MII aşamaya gelmiş koyun oositleri (ok işareti: 1. Polar)	39
Şekil 4-3: Soğuk şoku grubu ile elde edilmiş embriyolar	41
Şekil 4-5: Lipofectamin grubunda görülen dejenerasyon ve fragmentasyonlar	44
Şekil 4-6: Turbofect Grubunda görülen dejenerasyon ve fragmentasyonlar.....	46
Şekil 4-7: Triton X-100 grubundan ele edilmiş embriyolar	49
Şekil 4-8: 2. Grupta elde edilen bir blastosist.....	52
Şekil 4-9: 2. Grupta elde edilen blastosistin eGFP ışına görüntüsü.....	52
Şekil 4-10: Morula aşamasına gelmiş embriyolar.....	53
Şekil 4-11: Morula aşamasındaki embriyoların eGFP ışınmaları.....	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

DNA: Deoksiribonükleik asit

GFP: Green fluorescent protein (yeşil floresan protein)

ICI: Intracytoplasmic injection (intrasitoplazmik enjeksiyon)

ICSI: Intracytoplasmic sperm injection (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu)

IVF: *In vitro* fertilization (*in vitro* fertilizasyon)

LDH: Layered double hidroxiles (çift katmanlı hidroksiller)

PNI: Pronuclear injection (pronükleer enjeksiyon)

RNA: Ribonükleik asit

SCNT: Somatic cell nuclear transfer (somatik hücre nükleer transferi)

SMGT: Sperm mediated gene transfer (sperm aracılığı ile gen transferi)

TALEN: Transcription activator-like effector nuclease (transkripsiyon aktivatörü benzeri nükleaz)

ZFN: Zinc finger nuclease (çinko finger nükleaz)

ÖZET

Öztürk Bakırer G. (2013). Transgenik Embriyo Üretimi için Koç Spermatozoonlarının Farklı Tekniklerle Transfekte Edilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Transgenik çiftlik hayvanlarının üretim amaçları kısaca genetik kodların yorumlanması, fizyolojik sistemlerin genetik kontrol çalışmaları, insan hastalık modellerinin oluşturulması, ksenotransplantasyon çalışmaları, hayvanlardan rekombinant proteinlerin eldesi, hayvan üretim özelliklerinin iyileştirilmesi, yeni hayvansal ürünlerin eldesi ve hastalıklara karşı dirençli hayvanların üretilmesi olarak sayılmaktadır.

Çalışmanın amacı, koyunlarda spermatozoa aracılığı ile transgenik hayvan üretimi için tercih edilen yöntemlerden en uygununu belirlemek ve bu yöntemle transgenik embriyo elde etmektir. Bu amaçla çalışmada elektroporasyon, soğutma, Triton X-100 ile membran hasarı, LipofectaminTM kullanımı ve bu yöntemlerin dışında koç spermatozoası ile transgenik hayvan üretiminde kullanımına literatür taramalarında rastlanılmamış olan bazı maddeler transfeksiyon amacıyla kullanılmış ve belirli bir ölçüde transfeksiyon sağlanmıştır. TurbofectTM, LDH ve Poli-β-aminoesterler gibi taşıyıcı maddeler ile yapılan ön denemelere göre bazı modifikasyonlar yapıp DNA yüklenmiş spermatozoa kullanılarak ICSI yöntemi ile oositlerin fertilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Embriyolardaki transgenik kontroller, marker gen olan GFP geni kullanılmasından dolayı floresan ataçmanlı invert mikroskopta yeşil ışığa gösterme durumlarına göre gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada elde edilen embriyoların transgeniklik ve transgenik etkinlik açısından gruplar arasında bulunan farklar incelendiğinde 2 numaralı elektroporasyon grubunun diğer gruplardan istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) derecede daha iyi, 8 numaralı soğutma grubundan ise istatistiksel açıdan önemli olamamasına ($p > 0,05$) rağmen bölünen embriyolar üzerinden yüzde orana bakıldığında daha yüksek bulunduğu, transgenik etkinlik açısından 8. grup hariç diğer gruplardan anlamlı bir fark ($p < 0,05$) ile çok daha üstün bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : SMGT, Koyun, GFP, ICSI, Transgenezis

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:9191

ABSTRACT

Öztürk Bakırer G. (2013). Transfecting the ram spermatozoa with different techniques for generating transgenic embryo. Istanbul University The Institute of Health Sciences, Department of Reproduction and Artificial Insemination. Doctorate Thesis. Istanbul

The purposes of generating transgenic farm animals are interpreting genetic codes, genetical control of physiological systems, forming human disease models, xenotransplantation, producing recombinant proteins from animals, bettering animal generating properties, getting new animal products and generating resistant animals to diseases.

The aim of the study is to determine the most suitable technique for generating transgenic animal with spermatozoa and acquiring transgenic embryos with this technique in sheeps. Transfection is attempted with electroporation, cooling, membrane defect with Triton X-100, lipofectamine usage, the substances that are not reported in literatures for generating transgenic animals with ram spermatozoa. A particular degree of transfection is managed when transport materials like Turbofect™, LDH ve Poli-β-aminoesters are used. According to preattempts some modification is made and using DNA loaded spermatozoa oocyte fertilization is carried out with ICSI technique. The controls of transgenic embryos are achieved according to the green luminescence status under fluorescent attached invert microscope because of using the GFP marker gene.

When the differences between the groups are examined with respect to being transgenic and transgenic efficiency of the embryos, electroporation group 2 is statistically quite better ($p < 0,05$) than other groups except of the cooling group 8, with the difference is not statistically important ($p > 0,05$), but the percent of the dividing embryos are more than the other groups.

Key words: SMGT, Sheep, GFP, ICSI, Transgenesis

This study is supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit.
Project No: 9191

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyoteknolojik gelişimlerin yaşandığı günümüzde hayvancılık alanında yaşanan büyük değişimler, gerek bilimsel gerekse hayvan yetiştiriciliği açısından birçok yeniliği kullanılabilir hale getirmektedir (1,2,3,4). Transgenik hayvanlar genomlarında başka tür canlıların genlerini taşıyan hayvanlardır ve ilaç üretimi, ksenotransplantasyon, hastalık modeli hayvanların elde edilmesi gibi amaçlarla üretilmektedir (2,5).

Transgenik hayvan üretiminde birçok farklı yöntem kullanılmaktadır (5). Somatik hücre transferi, pronükleer gen enjeksiyonu, spermatozoa aracılığı ile (SMGT), lentivirusler aracılığı ile , oositlere gen enjeksiyonu ile gibi bir çok yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerin her birinin negatif ya da pozitif özellikleri mevcut olmakla birlikte spermatozoa aracılığı ile transgenik hayvan üretimi gerek diğerlerine nazaran daha az ekipman gerektirmesi, gerek daha ulaşılabilir teknikler içermesi nedeniyle bu çalışmada kullanım tercihi olmuştur. SMGT yöntemi daha çok kimerik hayvanların oluşmasına neden olmakla beraber diğer yöntemlere göre bu yöntemin uygulama kolaylığı ve oositlerin daha az manipüle edilmesi gibi avantajları bulunduğundan tercih edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, koyunlarda spermatozoa aracılığı ile transgenik hayvan üretimi için tercih edilen yöntemlerden en uygununu belirlemek ve bu yöntemle transgenik embriyo elde etmektir.

Spermatozoa aracılığı ile gen transferi yöntemi bir çok teknikle yapılabilmektedir. Spermatozoa-DNA inkübasyonu, elektroporasyon, spermatozoa plazma membranına soğuk (fiziksel) ve ya Triton-X (kimyasal) gibi maddelerle hasar verilmesi, liposome gibi ajanlar aracılığı ile spermatozoaya ekzojen DNA tutturulması gibi birçok SMGT tekniği bulunmaktadır (6,7).

Farklı yöntemlerin SMGT'nin üzerine etkileri birçok farklı çalışma ile gösterilmiş olup, çalışmada bu yöntemlerin dışında daha önce yapılan literatür taramalarında koç spermatozoası ile transgenik hayvan üretiminde kullanımına rastlanılmamış olan bazı maddelerle transfeksiyon denenmiş ve belirli bir ölçüde transfeksiyon sağlanmıştır. Turbofect™, LDH ve Poli-β-aminoesterler gibi taşıyıcı maddelere DNA yüklemesi yapıp bu maddelerin kullanım şekillerinde bazı

modifikasyonlara gidilerek spermatozoayla biraraya getirilmiş ve yine daha önce yapılan ön denemelere göre bazı modifikasyonlar yapılıp DNA yüklenmiş spermatozoa kullanılarak ICSI yöntemi ile oositlerin fertilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Embriyolardaki transgenik kontroller, marker gen olan GFP geni kullanılmasından dolayı floresan ataçmanlı invert mikroskopta yeşil ışımaya gösterme durumlarına göre gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Transgenik organizmalar genomlarında kalıcı şekilde entegre olmuş yabancı bir DNA parçası taşıyan ve bu sayede istenilen rekombinant proteinlerin üretiminde güvenli ve ekonomik bir araç olabilen canlılardır. Bu yabancı DNA spesifik bir protein bölge, istenilen proteini kodlayan bir gen, izolatörler ile gen ekspresyonunu artırıcı diğer elemanları içermelidir. Transgen tarafından kodlanan bu protein istenilen genin diğer kontrol elemanlarıyla rekombine olması yüzünden rekombinant protein olarak bilinmektedir (1). Bu şekilde yapılan bir genetik değişiklik genomik entegrasyon için bilinen bir lokus, tanımlanmış bir yabancı DNA, transgen ekspresyonunun komşu kromozomal dizilerce etkilenmemesi, endojen genlerin mutasyona uğramaması ve istenmeyen gen dizilimlerinin olmaması gibi koşulları gerektirmektedir (5).

2.1. Transgenik Hayvan Üretiminin Kısa Tarihçesi

İlk transgenik hayvan 1976 yılında Jaenisch (transjenuel fare) tarafından fare blastosistlerinin murin leukemia retrovirüsüyle inkübe edilmesi sonucu proviruslerin germ hücresi öncüllerine entegre olarak mozaik hayvan oluşturması ile üretilmiştir. Bu çalışmayı takiben 1981 yılında Gordon ve arkadaşları fare zigotlarının erkek pronükleuslarına saflaştırılmış DNA mikroenjeksiyonu ile ilk transgenik fareyi üretmiştir (8,9). 1985 yılında Hammer ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada pronükleer mikroenjeksiyon yolu ile tavşan, koyun ve domuzlarda transgenik hayvan üretimi denenmiş, ancak çalışılan türlerden sadece tavşan ve domuzlarda uygulanan genin ekspresyonu sağlanmıştır (10), 1997 yılında somatik hücre nükleer transfer yöntemi ile Schnieke ve ark. tarafından transgenik koyun üretimi yapılmıştır (11). Spermatozoa tarafından dışarıdan verilen bir DNA parçasının oosite taşınabileceğine dair ilk çalışma 1971 yılında Brackett ve ark. tarafından sunulmuştur (Kaynak:12). Lavitrano ve ark. tarafından 1989 yılında fare spermatozoasının, fertilizasyon sırasında yumurta hücrelerine genleri transfer edebildiklerini bildirmiştir (Kaynak:9). Ülkemizde transgenik memeli hayvan üretimi konusundaki ilk çalışmalar fareler üzerinde yapılmış olup gerek diğer memeliler gerekse balıklar üzerinde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (13,14).

2.2. Transgenik Hayvan Üretiminin Amaçları

Genetik 'çiftçilik' olarak da nitelendirilen transgenik hayvan üretiminin temelde rekombinant peptit üretimini kapsayan farmakoloji ve hayvan yetiştiriciliği olmak üzere iki sektör üzerine hedeflenmiş amaçları bulunmaktadır. Örnek vermek gerekirse; genetik kodların yorumlanması, fizyolojik sistemlerin genetik kontrol çalışmaları, insan hastalık modellerinin oluşturulması, ksenotransplantasyon çalışmaları, hayvanlardan rekombinant proteinlerin eldesi gibi ilaç sektörüne hitap eden ve yün kalitesi, vücut gelişimi, süt bileşenleri gibi hayvan üretim özelliklerinin iyileştirilmesi, yeni hayvansal ürünlerin eldesi, hastalıklara karşı dirençli hayvanların üretilmesi gibi hayvan yetiştirme sektörüne hitap eden amaçlar sayılabilir (8,12,15). Bazı yayınlarda ise genetiği modifiye edilmiş hayvan uygulama alanları, insan için doku kaynağı yaratmak gibi özgün uygulamalar (ksenotransplantasyon), ilaç gelişiminin etkinliğini artırıcı yönde farmakodost hayvanlar ve diğer yöntemlerle üretilerek var olan farmosötik ürünlerle yarışan hayvanlar olarak ayrılmaktadır (8,16,17,18).

Günümüzde transgenik hayvanların kullanım alanları açısından bakıldığında yeşil ve kırmızı biyoteknolojik amaçlara ayrıldığı, bunların sırayla gıda olarak ve farmasötik olarak yapılan genetiği değiştirilmiş canlılar olduğu bildirilmektedir. Avrupa'da European Medicines Agency (EMA) tarafından 2006 yılında, Amerikan Food and Drug Administration (FDA) tarafından ise 2009 yılında onaylanan ATryn (keçi sütünden elde edilen insan Antitrombin III faktörü) piyasaya transgenik hayvan ürünü olarak girmiştir. Transgenik hayvan uygulamalarının çoğu farmasötik projeler olurken, dikkat çekici projelerin gıda amaçlı projeler olması; ancak bunların sayılarının fazla olmaması bu alanda hızlı gelişmeler olmadığını gösterirken, hızlı büyüyen somon (AquaSalmon) ile düşük azot üreten domuz (EnviroPig) onaylanma aşamalarını geçebilmektedir (19,20).

2.3. Memeli Hayvanların Kullanım Nedenleri

Transgenik hayvanların sütlerinden rekombinant proteinlerin elde edilmesine olan ticari ilginin yüksek olduğu ve bunun temelinde farmasötik proteinlerin hücre kültürü ve bakteri/maya kültürleri gibi diğer protein üretim metodlarında üretim maliyetlerinin yüksek olması ile insan donör materyallerinin kullanıldığı tekniklerin sağlık açısından risk taşımaları gibi faktörler yatmakta olduğu bildirilmiştir (1,15). Bakterilerden elde edilen proteinlerde, özellikle de kompleks yapıda olan proteinlerde glikozilasyon, fosforilasyon ve karboksilasyon gibi posttranslasyon olaylarının tam gerçekleştirilememesi ya da nonfonksiyonel olması, mayalardan elde edilen bu proteinlerin de yine glikozilasyonlarının yapılamayıp insan proteinlerinde olmayan şekerlerin eklenmesi ve son olarak bitkilerden elde edilen rekombinat proteinlerin terminal siasilik asit kısımlarını içermemesi, karbonhidrat bağlanma şekillerinin insanlara göre farklı olması ve ölümcül immun yanıt oluşturabilecek ksilozun eklenmesi, hücre kültürlerinden protein elde edilmesinin pahalı olması bu proteinlerin memeli hayvanlardan elde edilmesini gerektiren nedenler olarak sıralanabilmektedir (1,17). Üretilen proteinlerin tüketiminde memeli canlılar üzerinde herhangi bir zarar olmadığı, aksine yavru domuzları olumlu yönde etkilediğine dair bir çalışma bildirilmiştir (21).

Protein eldesi aracı olarak süt dışında kan, yumurta beyazı, üre, ipek bezleri gibi farklı sistemlerin kullanıldığı da görülmektedir. Bu açıdan bakıldığında tavşanların bu konudaki avantajları kolay yavru üretimi, göreceli yüksek süt verimi, prion hastalıklara karşı hipersensitivite olarak sıralanabilirken, domuzlar süt verimi açısından tavşana göre daha avantajlı, ruminantlar ise süt üretimi için en uygun tür olmakla beraber uzun üretime geçme süreleri ve prion hastalıklara karşı duyarlı olmaları bakımından dezavantajlı bulunmakla beraber, sütün protein değerlerinin yükseltilmesi ve süttten elde edilebilecek biyomateryaller ile insan hastalıklarının tedavisinde kullanılacak proteinlerin elde edilebilmesi ruminantları bu açıdan önemli kılmaktadır (1,3,17,22). Örneğin süttten 1 mg/mL ya da daha az protein üretilmesi ekonomik olarak kabul edilebilir, daha yüksek konsantrasyonlarda üretildiği takdirde proteinlerin tam olarak glikozile edilemediği bildirilmiştir (3). ATryn örneğinde olduğu gibi meme bezlerinin ekstra proteinleri tam olarak glikozile edememesinin kanıtı olarak elde edilen proteinin siasilik asit oranının düşük olduğu gösterilmiştir (3). Tek bir keçiden elde edilen insan

antitrombin III rekombinant proteininin miktarının yılda 90.000 insan kan örneğinden elde edilecek etkene eşdeğer olduğu ve bunun büyük hayvanların kullanımı için tercih sebebi olduğu bildirilmiştir (3,20). Serumdan saflaştırılarak elde edilebilecek poliklonal antikorların üretimi için kan sisteminin kullanılmasında örnek gösterilebilmektedir (16).

İnsan hastalık modeli çalışmaları için daha çok fare ve ratların kullanılmakta olduğu belirtilse de bu hayvanların bazı hastalıklar için model oluşturmada yetersiz kaldıkları bildirilmiştir (23). Bu açıdan büyük çiftlik hayvanlarının kullanımı özellikle de domuzların insan hastalık modelleri üzerinde başarılı örnekler oluşturmaları üzerinde durulan birçok çalışma bildirilmiştir (24, 25). Bunun dışında Zebra balıklarında yapılan çeşitli çalışmalar bu hayvanlarda hastalık modeli oluşturulabileceğini göstermektedir (26).

Organ transplantasyonu açısından bakıldığında günümüzde organ ihtiyacını karşılamak için kullanılan bağış, kadavradan organ alımı ve doku kültürlerinde üretim gibi seçeneklerin batı dünyasının organ ihtiyacını karşılamada yetersiz kalmakta olduğu, transgenik hayvan üretiminin bu açıdan önem kazandığı bildirilmiştir (16). Özellikle boyut bakımından ve anatomik olarak uygun olmaları nedeniyle domuzlardan organ transferinin gündeme gelmesine neden olmuştur (15, 16, 24). Organ transferinde karşılaşılan immunolojik engellerin aşılması, verici hayvandan alıcı insana çeşitli patojenlerin geçmesinin engellenmesi ve verilen organların anatomik ve fizyolojik olarak insana uyumlu olması gibi sorunların aşılması gerektiği bildirilmiştir (16, 17, 23, 27, 28, 29).

Tarımsal üretim açısından incelendiğinde hayvanların karkas yapıları, süt verimleri, yün üretimleri, çevreye dost olmaları ve hastalıklara dirençleri üzerinde değişiklikler yapılması gibi temel başlıklar altında toplanmıştır (4). Domuzlarda çevreye yaydıkları toplam fosfor çıkışı %75'e kadar azaltılmış (30, 31), kaslarında bulunan doymamış yağ oranları doymuşlara göre daha fazla olan domuzların (32) ve doku ve sütünden omega 3 yağ asitlerini yüksek miktarda içeren inek üretimi (33) bu konuda yapılmış çalışmalara örnek teşkil etmektedir. Tarımsal amaçlı transgenik hayvan üretimi çeşitli çalışmacılar tarafından Moleküler ya da Farmasötik Çiftçilik olarak adlandırılmaktadır (8, 17).

Evcil hayvanlarda yapılan transgenik üretim çalışmaları daha çok balıklarda yeşil ya da kırmızı floresan proteininin ekspresyonu amaçlanarak başlanmış olup

özellikle evcil kedi ve köpeklerde hipoallerjenik yapıma yönelik çalışmalar amaçlanarak sürmektedir (6, 15).

Transgenik fare üretimi gen fonksiyonlarının incelenmesi için yoğun olarak kullanılan bir aracı haline gelmesine rağmen özellikle bazı insan patojenlerinin farelerde iyi modellenememesi gibi nedenler transgenik evcil çiftlik hayvanlarının üretiminin gündeme gelmesine sebep olmuştur (1, 5). Bu sebeple öncelikle farelerde yapılan çalışmalar (34) daha sonra domuz, koyun gibi çiftlik hayvanlarında uygulanmaya başlanmıştır (30). Domuz ve koyun gibi çiftlik hayvanlarının fizyolojik, biyolojik ve patolojik özellikleri, yaşam süreleri ve genom organizasyonlarının farelere oranla insana daha fazla benzemekte olduğu bildirilmiştir (5, 27). Sığırlar, domuzlar ve koyunlarda hastalık modeli üretimi açısından çeşitli transgenik hayvan üretimi çalışmaları yapılmıştır (35, 36, 37, 38).

2.4. Genetiği Değiştirilmiş Canlılar Hakkındaki Güncel Etik Tartışmalar

Transgenik hayvan üretimi ve üretilme amaçlarına uygun olarak kullanımı ülkeden ülkeye farklılık gösteren kurumlarca denetlenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA bu görevi üstlenirken, Avrupa Birliği'nde EMEA üstlenmiştir. Ayrıca özellikle transgenik fare ve ratlarda çalışma yapan kuruluşların Transgenic Society gibi topluluklar kurması hem bilgi paylaşımı hem de standardizasyon açısından önem taşımaktadır. Transgenik canlıları sadece hayvanlar olarak değil bitkilerden tek hücreli canlılara kadar geniş bir yelpazede değerlendirmek gerekir. Özellikle transgenik bitkilerde yaşanmış ve yaşanabilir riskler her ne kadar hayvanlar için geçerli olmasa da dikkat çekilen bazı noktalar göz ardı edilmemelidir. Transgenik bitkilere göre hayvanlarla transgenik çalışmalar yapmak için uzun üreme süreleri, karmaşık biyolojilerinin olması dezavantaj olarak öne çıkarken, özellikle et sektöründe hastalıklara dirençli hayvanlara talep artması bu konudaki çalışmalara destek sağlamaktadır. Ancak, toplumda genetiği değiştirilmiş hayvanlara sıcak bakılmaması sektörün bu konudaki yönelimini etkilemektedir (18). Çevreye yayılım bakımından transgenik hayvanlar bitkiler kadar ciddi bir tehdit oluşturmamalarına rağmen hayvan refahı ve hayvan hakları savunucuları açısından bakılınca daha az kabul edilebilir haldedirler (18).

2.5. Çalışma İçin Uygun DNA Seçimi

Transgenik canlıların üretiminde hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın ekzojen verilecek DNA'nın yapısı büyük önem taşımaktadır. Yabancı DNA içeriğinde spesifik bir promotor bölge, istenilen proteini kodlayan bir gen, izolatörler ve gen ekspresyonunu artırıcı elemanlar olması gerektiği, özellikle promotor bölgenin gelişim döneminde takip edilebilirliğinin, dokulardaki dağılımının ve gerekiyorsa uyarılabilir bir promotor seçilmesinin önemli olduğu bildirilmiştir (1,8).

Kullanılan ekzojen DNA'nın lineer ve plazmid formları bulunabilmektedir. Bu yapılardan hangisinin gen transferinde kullanılacağına karar verilmesi gerekmektedir. Kimi çalışmalar lineer formun çok daha etkili olduğunu idda etse de plazmid formun da en az o kadar etkili olduğunu belirtmektedir (39). Yine sığırlarda yapılan bir çalışmada plazmid ve lineer olarak kullanılan ekzojen DNA'larda sırayla %52 ve %44 oranlarında transgenik blastosist elde edilmiş olup gruplar arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmadığı bildirilmiştir (40).

Yapılan bir çalışmada SMGT yöntemi ile beraber kullanılan bakteriyal rekombinasyon enzimleri ile de %40 transgenik fare üretimi gerçekleştirildiği bildirilmiştir (41).

2.6. Üretilen Hayvanlarda Transfer Edilen Genin Tespit Yöntemleri

Marker gen olarak adlandırılan Lac/Z, Luciferaz ve Floresan proteinler bulunmaktadır. Bunların arasından floresan proteinler oldukça hassas olmaları, görünmeleri için özel boyama teknikleri gerektirmemeleri, canlı dokuda görülebilmeleri ve FACS tekniği ile hücre izolasyonuna imkan tanımaları nedeniyle tercih edilmektedirler. Bahsedilen floresan proteinler EGFP (Green Flourescent Protein), EYFP (Yellow Flourescent Protein), ECFP (Cyan Flourescent Protein)'dir.

Oluşturulan yavrunun DNA'sında genotyping yöntemi ile transgenik genin saptanması ise türe özgü ya da transgene özgü problemlerin, marker genlerin ya da endojen ile transgenik geni ayırmakta kullanılan özel restriksiyon bölgelerinin kullanımı ile olurken, PCR ve Southern Blot analizleri en sık kullanılan yöntemlerdir.

Ekspresyonu sağlanan ürünün saptanmasında ise özel transgenik mRNA'nın ekspresyonuna, ya da transgenin kısaltılmış mRNA kodlamasına göre bunun tespitinin

yapılmasına, transgenik proteinin saptanmasında ise proteinin ekspresyonuna, eksprese edilmiş epitopun saptanması veya monoklonal antikorlar kullanılarak protein epitopunun tespiti yöntemleri kullanılmaktadır.

Farklı tekniklerle üretilen transgenik hayvanlarda verilen transgenin saptanmasında özellikle Green Flourescent Protein geni eklenmesiyle gerek embriyolarda gerekse ekspresyonun gerçekleştiği dokudan alınan örnekler incelendiğinde 485 nm dalgaboyundaki filtreli floresan ışık kaynağı altında parlamaları ile tespit edilmektedir (42).

2.7. Transgenik Hayvan Üretim Teknikleri

Transgenik hayvan üretim yöntemleri çeşitli şekillerde gruplandırılabilir; ancak temelde yabancı DNA'nın alıcı genomuna yerleşmesi yönünden bakıldığında aktif ve pasif transgenezis olarak ikiye ayrılmaktadır (5). Pasif DNA entegrasyon yolağında ev sahibi canlının DNA'sında fiziksel ya da kimyasal bir etken yüzünden çift sarmalda kırıklar meydana geldiği ve entegrasyonu istenen yabancı DNA'nın hücresel tamir mekanizmaları tarafından konkatemerik dizilimler olarak DNA'ya entegre olduğu bildirilmiştir. Pronükleer mikro enjeksiyon (PNI), ICSI aracılığı ile transgenezis ve somatik hücre nükleer transferi (SCNT) ile transgenik hayvan üretimi için somatik hücrelerin transfeksiyonlarında kullanılan transfeksiyon yöntemlerinin bazılarında DNA'nın konakçı DNA'ya bağlanma şekli bu yolağa örnek olarak verilebilmektedir (4).

Transpozonlar, Çinko Finger Nükleazlar (ZFN), retro ve lentivirüs yöntemlerinin kullanıldığı aktif entegrasyon yolağında ise sağlam bir DNA üzerine kullanılan ekzojen bir protein bağlanıp, ektopik enzimlerce katalizlenen entegrasyon ile DNA parçasının ev sahibi genoma bağlandığı ve bu sayede transfer edilen genin monomerik bir kopyasının oluşturulduğu bildirilmiştir, aktif transgenezis aynı zamanda transgenin ev sahibi genoma enzimlerce tanıtıldığını ifade etmektedir (5,43).

Somatik Hücre Nükleer Transfer, Zigotlara Pronükleer Mikro Enjeksiyon yapılması, Spermatozoa Aracılığı ile (Suni dölleme, İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu, *İn Vitro* Fertilizasyon), Viral Vektörler ve Ribonükleik Asitlerin kullanımı gibi birçok transgenik hayvan üretim metodu bulunmaktadır (3,4,8). Günümüzde moleküler tekniklerin gelişmesi ile beraber artık bu yöntemler kabaca Rastgele ve Hedefli DNA Entegrasyonları olarak ikiye ayrılmaktadır. DNA mikroenjeksiyonu,

Elektroporasyon kullanımı, Transpozonlar, Viral vektörler, erkek gamet hücreleri ve pluripotent hücrelerin kullanıldığı yöntemler ilk grubu oluştururken, gen knock out, meganükleazlar, hipoksantin-guanozin fosforilbazil transferaz lokusunun içine knock-in yapılması gibi yöntemlerin ise ikinci grubu oluşturdukları bildirilmiştir (2).

2.7.1. Somatik Hücre Nükleer Transferi Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi

Bu yöntem transfekte edilmiş ve istenilen geni DNA'sında entegre olmuş şekilde taşıyan verici somatik hücrelerin, tüm nükleer materyali alınmış oositlere aktarılıp, çeşitli oosit aktivasyon protokolleri kullanılarak oluşturulan embriyoların taşıyıcı annelere nakli sonucunda transgenik yavru elde edilmesi olarak tanımlanabilir.

Bu yöntemin olumsuz yönlerinin, koyun ve sığırlarda embriyo transferi sonucu elde edilen düşük gebelik oranları, yavru atımı yüzdesinin yüksek olması ve doğum sonrası ölüm oranlarının yüksek olması gibi nedenlere bağlandığı bildirilmişken türlere bağlı bazı farklılıklar olduğunu gösteren çalışmalar da bildirilmiştir (1,10,11,44). Ayrıca kullanılacak verici hücre ve embriyolara in vitro ortamda gerçekleştirilen muamelenin de bazı türlerde bu yöntemle canlı yavru elde etme üzerine etkisi olduğu bildirilmiştir (1). Bu yöntemin en büyük avantajı transgenik hayvan üretilmeden önce kullanılacak verici hücrenin önceden seçilebilmesidir. Verilecek olan ekzojen DNA'ya uygun bir antibiyotik direnç geninin eklenmesi ve hücrelerin bu antibiyotikli besi medyumuna maruz bırakılması ile hücre kültürü aşamasında dirençli hücreler rahatça seçilebilmektedir (15). Böylece istenilen genin genomda kesin olarak bulunduğu emin olarak embriyo üretimi yapılmaktadır (1). Bu yöntem özellikle Pronükleer Mikroenjeksiyon yöntemi ile kıyaslandığında büyük bir avantaj sağlamaktadır. Ancak yöntemin pahalı ekipmanlar ve uzman teknik kadro gerektirmesi ve bazı türlerde başarı şansının düşüklüğü yöntemin dezavantajları olarak bildirilmiştir (45).

2.7.2. Embriyonik Kök Hücreler Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi

Somatik hücreler aracılığı ile transgenezis yönteminde olduğu gibi, embriyonik kök hücreler transfekte edilerek, blastosist ya da morula aşamasındaki embriyolara bu hücrelerin transferi ile elde edilen embriyolar aracılığı ile de transgenik hayvan elde edilebilmektedir. Elde edilen yavru istenilen geni kesin olarak taşımaktadır; ancak bu

yöntemde yüksek oranda kimeriklik görülmektedir. Özellikle farelerde son yıllarda yoğun olarak kullanılan bu yöntemin diğer türlerde fareler kadar yaygın olmadığı bildirilmiştir (2).

2.7.3. Pronükleer Mikroenjeksiyon Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi

Erkek ve dişi gamet hücrelerinin döllenme yolu ile birleştikten sonra oluşan zigot içerisinde hem dişi hem de erkek pronükleusları oluşmakta daha sonra bunların birleşmesi singami olarak adlandırılmaktadır. Oluşan pronükleuslara yabancı DNA enjeksiyonu ile transgenik hayvan üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin avantajları olduğu gibi dezavantajları da çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Avantajları arasında eklenmek istenen genin birçok kopyasının verilebilmesi, bu kopyanın entegre olduğu durumlarda doğan canlı hayvanın tüm hücrelerinde genin bir kopyasını taşımasının beklenmesi sayılmaktayken çoğu durumda entegrasyonun daha geç evrelerde gerçekleşmesi mozaikliğin görülmesi ile sonuçlanmaktadır (1,3,9). Pronükleer mikroenjeksiyonun uygulanması pahalı ekipmanlar ve deneyimli personel gerektirmektedir (45). Gerek in vivo gerekse in vitro embriyo üretimi sırasında oluşan pronükleuslar, hayvan türüne özgü embriyo yapısına bağlı olarak kolayca tespit edilerek manipule edilebilmekte ya da edilememektedir. Örneğin farelerde pronükleuslar rahatça görülebiliyorken ruminant ve domuzlarda embriyonun yoğun granüler opak yapısı yüzünden pronükleuslara manipulasyonda sıkıntılar yaşanmakta ve bu sıkıntılar embriyoların uygun şekilde santrifüj edilmeleri ile çözülmeye çalışılmaktadır (17,46). Yine ruminantlarda gebelik sürelerinin uzunluğu ve diğer memelilere göre yabancı DNA'nın entegrasyonunun daha seyrek görülmesi bu yöntemin dezavantajlarından sayılmaktadır (2). Pronükleer mikroenjeksiyona benzer olarak intrasitoplazmik gen enjeksiyonu (ICI) da çalışmalarda kullanılmış bir yöntemdir (40).

2.7.4. Viral Vektörler Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi

Viral vektörler olarak retrovirüsler, adenovirüsler ve lentivirüsler kullanılmaktadır. Retrovirüslerin sadece bölünmekte olan hücreleri enfekte ettikleri, adenovirüslerin ise hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebildikleri bildirilmiştir (45). Lentivirüsler kendi DNA'larını hücre siklusunun herhangi bir evresinde çekirdeğe geçirebilme, farklı türlerde uygulanabilir olma ve yüksek oranda transgenik hayvan üretilmesi avantajlarına sahip olmakla beraber, 7-9 Kb boyutunda

olan düşük ekzojen DNA taşıma kapasiteleri, düzenleyici bölgeleri uzun viral terminal tekrarlar bölümünde bulunduğundan daha sonra transgen ekspresyonunun hücreye özgüllüğünü düşürebilecek sonucu olan istenilen gene bağlı promotorlarla etkileşime girebilecek olmaları, mozaisizm oranının yüksekliği ve yüksek oranda embriyo ölümü gibi özelliklerinden ötürü dezavantajlı bulunmaktadır (2,5,15,17). Bu olumsuzlukları gidermek için oositlerin lentiviral etkenlerle direkt enfeksiyonu gibi yöntemler denendiği ve elde edilen başarılı sonuçlara rağmen viruslerin hücre bölünmesini durdurabileceği ve mutagenezise sebep olabileceği gibi durumların gerçekleşeceği bildirilmiştir (42). Çiftlik hayvanlarında ve deney hayvanlarında bu yöntemle transgenik hayvan eldesi çalışmaları mevcuttur (5,42,47,48).

2.7.5. Yeni Yöntemler ile Transgenik Hayvan Üretimi

Son yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesiyle beraber gen transferinde kullanılan teknikler giderek hedeflenmiş metodlara yönelmiştir. Bunun için daha önce de bahsedilmiş olan Transpozonlar ve Çinko Finger Nükleazlar (ZFN) gibi aktif transgenik üretim yolları kullanılmaktadır. Transpozonlar mısır bitkisinde keşfedildikten sonra geliştirilen çeşitli tipleri (Piggy Bac, Sleeping Beauty, Tol2) ile omurgalı ve omurgasız canlılarda gen transferinde aktif olarak kullanılmaktadırlar (49,50). Transpozonların çalışma mekanizmasının donör bölgeden transpozonun çıkartılıp hedef bölgeye entegrasyonun gerçekleşmesi olduğu bildirilmiş ve bu sayede kromozomal entegrasyonun etkinliğinin artırılıp monomerik entegrasyonun tetiklendiği bildirilmiştir (5).

Dizaynli nükleazlar ile 'gen knock in' (aktifleştirilmesi) yapılması özellikle rodentlerde çalışılan bir yöntemdir. Bu grubu TALEN'ler ve meganükleazlar oluşturmaktadır. Bunlar genomda önceden saptanan bir diziyi tanıyıp bunu çift sarmal kırılmalarına tanıtarak yapmaktadırlar. Kemirgenlerde embriyonik kök hücre soylarının bulunması nedeniyle dizaynli nükleazlar daha sık kullanılmakta ve büyük hayvanlarda homolog rekombinasyonlu somatik hücre transferi yöntemi 'Knock out/in' hayvan üretimi için tek yöntem halini almaktadır (5).

Transgenik hayvan üretiminde karşılaşılan temel problem olan transfer edilen genin ekspresyonunun zayıf olması ya da olmaması genin entegrasyonunun rastgele gerçekleşmesine bağlanmakta ve özellikle genin girdiği diziyi çevreleyen komşu

bölgelerin ekspresyonu etkilediği bildirilmekte ve bu da kromozomal pozisyon etkisi olarak adlandırılmaktadır. Bu sorunun çözümünde homolog rekombinasyonlu embriyonik kök hücreler ya da doğru bir ekspresyon için gereken tüm elemanları içeren yapay kromozom vektörleri (YAC, BAC, PAC) kullanılmaktadır (51,52).

Bu yöntemlerin dışında transgenik canlıların üretiminde kullanılan embriyonik kök hücrelerin ya da somatik hücrelerin transfeksiyonunda kullanılan bazı transfeksiyon ajanları da doğrudan ya da dolaylı olarak transgenik hayvan üretiminde kullanılmaktadır. Bunlar Lipofectamin 2000[®], Turbofect[®], çift katmanlı hidrokssiller ve poliaminoesterler gibi taşıt maddeler olup çeşitli çalışmalarda gen transferi amaçlı kullanılmıştır (53,54,55). Poliaminoesterlerin gen transferinde tercih edilmelerinin nedenleri arasında fizyolojik ortamlarda amin gruplarına protonlanabilmeleri, çeşitli monomerler ile hazırlanabilmeleri, *in vivo* uygulamalarda önemsenebilir bir sitotoksosite göstermemeleri sayılmaktadır (56). Bu tarz taşıt maddelerin *in vitro* ortamda embriyolara gen transferinde denendiği çeşitli çalışmalar mevcut olup (57,58,59,60,61,62) bu maddelerin genel olarak hücre kültürlerinde transfeksiyon için tasarlandıkları unutulmamalıdır. Katmanlı çift hidrokssitler (LDH) ise katalizör ve seramik öncülleri olarak aniyonik kirletici maddeler için tutucu olarak kullanılsa da son yıllarda bu maddelerin terapötik ve biyoaktif molekül ve genlerin nanoboyutlu potansiyel taşıyıcıları olarak dikkat çektikleri bildirilmiştir (63).

Bunların haricinde memelilerde germ hücreleri kullanılarak yapılan gen transferinin SMGT dışında testis aracılığı ile, dişilerde ise ovaryumlara direkt gen enjeksiyonu yolu ile üretilen gamet hücrelerin transfekte edilmelerinin de denendiği bildirilmiştir (24,45,64).

2.7.6. Sperm Hücreleri Aracılığı ile Transgenik Hayvan Üretimi

Spermatozoa aracılığı ile transgenesis yöntemi (SMGT) döllenmede spermatozoayı kullanan türlerde gen transferinin döllenme aşamasında gerçekleştirilmesi açısından bakıldığında kolay, etkili ve diğer yöntemlere göre daha basit ve düşük maliyetli bir yöntem olduğu bildirilmiştir (6,65,66). Yapılan çalışmalardaki çeşitli değişkenler (tür, yöntem, DNA miktarı ve çeşidi gibi) farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olmuştur (24,67).

Transgenik hayvan üretiminde, doğal olarak şekillenen fertilizasyon işlemi içerisinde zaten yeniden düzenlenecek olan genoma verilecek genin daha rahat entegre olmasının ve alıcı genomuna büyük DNA fragmentlerinin verilebilmesinin SMGT yönteminin en önemli avantajları olduğu bildirilmiştir (7,12,17,68).

SMGT yönteminde verilecek olan ekzojen DNA miktarının spermatozoa üzerine olduğu kadar embriyolar üzerine de toksik etki yapmaması ve türlere göre bu miktarların ayarlanması gerektiği, göz önüne alınması gereken noktalar olarak belirtilmiştir (65). Yüksek miktarda ekzojen DNA'nın spermatozoon nükleazlarında fragmentasyona neden olacağı, düşük miktarların ise bu nükleazları aktive edemeyeceği bildirilmiştir (69).

SMGT etkinliğinin oluşması için spermatozoanın istenilen ekzojen DNA'yı taşımalarının yanı sıra oositi fertilize edebilecek halde kalmalarının önem taşıdığı bildirilmiştir (12). SMGT yönteminin bu anlamda etkinleştirilmesi ve transgenik hayvan oranlarının artırılması için çeşitli ek yöntemler kullanılmaktadır, bunların başında ICSI ile SMGT gelmektedir. Çeşitli yöntemlerle 'transfekte' edilen spermatozoadan embriyo eldesi için motilitenin olmadığı durumlarda ICSI yöntemi ciddi önem taşımaktadır (12,24). SMGT yönteminde türe özgü bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bu yöntemin daha çok fare ve domuzda çalışıldığı ve bu türlerde diğer türlere göre daha iyi sonuç alındığı, farelerde akrozomun küçük olmasının ICSI yapıldığında akrozomu bütün spermatozoa verildiğinde embriyo gelişimi üzerine olumsuz etki yapmadığı, bunun tersi olarak hamster gibi büyük akrozoma sahip türlerde ise bu durumun oositin ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (3,17). ICSI yönteminin kullanıldığı bazı çalışmalarda sadece spermatozoon başları oosit içine verildiğinde de başarı elde edildiği bildirilmiştir (70). SMGT yönteminde karşılaşılan problemlerin üstesinden gelmek adına bazı yöntem geliştirme çalışmalarına ihtiyaç duyulmuştur. Spermatozoanın plazma membranlarına gerek soğuk şoku gerekse çeşitli kimyasallar kullanılarak zarar verilmesi ve ekzojen DNA'nın postakrozomal bölgedeki bağlanma bölgelerine daha rahat ulaşmasının sağlanması ya da yine aynı olayın spermatozoanın elektroporasyonu ile sağlanmaya çalışılması ya da çeşitli taşıt maddelerin spermatozoaya tutundurularak fertilizasyon esnasında genoma taşınması, bu amaçla virüslerin, transpozonların ya da REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration)'lerin kullanımı örnek verilebilmektedir (6,7,17,21,24,45,61,71,72,73).

2.7.6.1. Sperm DNA İnkübasyonu

Ekzojen DNA ile spermatozoanın uygun medyumlar içerisinde uzun ya da kısa süreli inkübasyonları Bracett ve ark. tarafından denenen ilk yöntem olup bu yöntemle elde edilen transgenik hayvan üretimi başarısının düşük oranda olması yöntemde yeni arayışlara ve gelişmelere ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur (45,72,74).

2.7.6.2. Spermatozoanın Plazma Membranına Zarar Vererek SMGT

Plazma membranı spermatozoaya ekzojen DNA tutunmasındaki en önemli engellerin başında geldiğinden, spermatozoonun fertilizasyon yeteneğine zarar vermeden plazma membranına hasar verip ekzojen DNA ile inkübasyona bırakılması transgenik hayvan üretiminde etkin yöntemlerin başında gelmektedir (24). Bu amaçla spermatozoanın soğuk şokuna maruz bırakılmaları (belirli bir derecenin altına soğutma, dondurup çözündürme gibi) ve çeşitli kimyasal maddeler kullanılarak membran hasarının sağlanması gibi yöntemler kullanılmaktadır.

2.7.6.3. Soğuk Şoku Tekniği ile SMGT

Bu yöntem farelerden çok büyük çiftlik hayvanlarının spermatozoasının plazma membranlarına hasar verebilmek için kullanılmakta olup gerek spermatozoa belirli bir dereceye kadar soğutulup gerekse dondurulup çözündürülerek gerçekleştirilmektedir (23,24,46). Düşük sıcaklıkta spermatozoaya DNA bağlanmasının daha yüksek oranda olduğu çalışmalar belirtilmiştir (60).

2.7.6.4. Kimyasal Maddeler Kullanılarak SMGT

Spermatozoanın plazma membranlarına kimyasal maddeler kullanılarak zarar verilmesi gerek invitro fertilizasyon için gerekse transgenik çalışmalarda kullanılmaktadır (75). Bu amaçla Lizolesitin ve Triton X-100 gibi kimyasal maddelerin kullanılmakta olduğu bildirilmiştir (17,76).

2.7.6.5. Elektroporasyon Yöntemi Kullanılarak SMGT

Elektroporasyon yöntemi yoğun olarak hücre kültürlerinin transfeksiyonunda kullanılmakta olup son yıllarda spermatozoa transfeksiyonu için denenen bir yöntemdir (77,78,79,80). Araştırmacılar tarafından 1990 yılından beri yapılan çeşitli çalışmalarda başta balık spermatozoasında olmak üzere SMGT etkinliğini artırmak

üzere çeşitli türlerde spermatozoanın elektroporasyonu ile ekzojen DNA eklenmesi çalışmaları yapılmış ve büyük hayvanlarda kullanıldığında %5-10 arasında spermatozoaya ekzojen DNA bağlanmasında artış olduğu bildirilmiştir (9,24,81).

2.7.6.6. Taşıt Maddeler Kullanılarak SMGT

Bu yöntemde spermatozoa ile DNA taşıyan çeşitli taşıt maddeler inkübe edilip IVF ya da ICSI yöntemi ile fertilizasyon sağlanıp istenilen transgenik canlı oluşturulması hedeflenmektedir..

2.7.6.7. Lipofectamin Kullanılarak SMGT

Lipozomların uzun yıllardır *in vivo* ilaç taşıyıcı olarak kullanılan küçük moleküller oldukları ve hücrelere proteinler ve plazmidleri taşıyabilecekleri, bunların katyonik lipitlerden oluştuğu ve negatif yüklü nükleik asitlerle kompleks oluşturup onları hücrenin çekirdeğine taşıdıkları bildirilmiştir (45).

Lipofectamin™2000 ökaryot hücrelerine nükleik asit taşıyarak transfeksiyon sağlayan lipid bazlı ticari bir formülasyondur. Suspansiyon ve yerleşik hücre hatlarında transfeksiyon gerçekleştirebilmektedir. Spermatozoon plazma membranına hasar veren yöntemler yerine DNA yüklenmiş lipozomlarla inkübasyon yöntemi son yıllarda SMGT ile beraber kullanılmaya başlanmıştır (82,83).

2.7.6.8. Turbofect™ Kullanılarak SMGT

TurboFect™ katyonik polimerin suda çözünmüş steril bir solusyonudur. Bu madde primer hücreler ile zor transfekte olan hücrelerin transfeksiyonunda kullanılmaktadır. TurboFect™'in SMGT için kullanıldığı çalışmaya yapılan literatür taramalarında rastlanılmamıştır.

2.7.6.9. LDH Kullanılarak SMGT

Layered Double Hidroxiles (LDH) olarak isimlendirilen kimyasal maddeler çeşitli maddelerden sentezlenebilen, polimer bazlı nanokompozitlerin hazırlanmasında kullanılan çift katlı lipit yapılı maddeler oldukları ve kullanıldıklarında sentez yöntemlerinin, boyutlarının ve çalıştıkları pH değerlerinin iyi belirlenmesi gerektiği bildirilmiştir (84). Çift katmanlarının arasına DNA moleküllerinin alınmasıyla beraber transfeksiyon amaçlı olarak hücreye girdiğinde taşıdığı DNA molekülünü bırakması

amaçlanmaktadır (85). Yapılan literatür taramalarında, hücre kültürlerinde gen transferi amaçlı gen taşıt maddesi/transfeksiyon ajanı olarak LDH kullanımına rastlanmıştır (85) ancak, transgenik koyun embriyosu üretimi amaçlı her hangi bir uygulama veya SMGT tekniği kullanılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

2.7.6.10. Poli- β -aminoester kullanılarak SMGT

Spermatozoanın ekzojen DNA taşıyıcısı hale getirilmelerinde nanopolimerlerin kullanılması yakın zamanda bu anlamda yapılan viral olmayan transfeksiyon yöntemleri açısından dikkat çekici hale gelmiştir (59,86). Bu tarz çalışmalar farklı taşıyıcı sistemlerin etkinliğini belirlemektedir. Poli- β -amino esterler gen transferinde daha önceden kullanılan polietilenimlerin toksisite ve düşük etkinliklerine alternatif olarak geliştirilmiş maddelerdir. Bu maddelerin DNA ya da RNA ile kompleks oluşturup hücre içine girdiklerinde DNA ya da RNA'yı hücre içinde bozunmalara karşı koruyup nükleer materyale taşıyıp daha sonra kalan taşıyıcı kısmının bozularak hücreye zararsız hale geldikleri bildirilmiştir (57,58).

2.8. Sperm DNA Bağlanması ve Bağlanmayı Etkileyen Faktörler

Memelilerde yapılmış SMGT çalışmalarından farklı sonuçlar elde edilmesi, farklı yöntemlerin kullanılması, spermadan seminal plazmanın ayrılması ve farklı DNA tiplerinin (plazmid-liner) kullanılması gibi nedenlere bağlanmaktadır (87,88). Domuzlarda ekzojen DNA'nın postakrozomal bölgeye bağlandığı bildirilmiştir (12).

Boğa spermatozoasında yüksek bir ekzojen DNA bağlama eğilimi olduğu, heparinle indüklenmiş kapasitasyonun bu işlemi artırdığı ve yüksek miktarda ekzojen DNA'nın spermatozoanın canlılığına zarar verdiği bildirilmiştir (74).

Tavşanlarda yapılmış bir çalışmada, kapasite olmuş spermatozoanın kontrol ve kapasite olmamış spermatozoaya göre DNaz-I ile muamele edildikten sonra bile çok daha yüksek oranda ekzojen DNA bağladığı bildirilmiştir (89).

Spermatozoaya yabancı DNA bağlanmasının rastgele bir işlem olmadığı birçok yayında belirtilmiştir (6,7,65,87,90,91). Birçok türde DNA'nın spermatozoonun postakrozomal bölgesindeki 30-35 kDa boyutundaki bir proteine bağlandığı, bu bağlanmanın DNA'nın negatif yükünden kaynaklandığı ve buraya sadece DNA moleküllerinin değil izoelektrik noktası 7'nin altında olan heparin, sığır serum albumini,

dekstran sülfat gibi maddelerin yarışmalı olarak bağlanabilecekleri belirtilerek bu ekzojen DNA moleküllerinin bağlanması ve içselleştirilmesinde CH4 ve 2. sınıf MHC moleküllerinin rolü olduğu bildirilmiştir (6,45,66,87). EDTA'nın fare spermatozoasında ekzojen DNA bağlanmasını engellediği bildirilmiştir (92). DNA bağlanması işleminin son kısımlarında DNA moleküllerinin spermatozoonun nükleer kılıfının altına ulaşarak spermatozoona kromozomal olarak entegre olup rekombine olduğu, ancak bu entegrasyonun sonuçta oluşan transgenik hayvan oranına göre düşük oranda olmasının yabancı DNA'nın çoğu zaman kromozom dışı kaldığını gösterdiği bildirilmiştir (7,45). Çalışmalarda spermatogenez sırasında 2.sınıf MHC ekspresyonunun spermatozoaya yabancı DNA bağlanabilmesi için, CD4 moleküllerinin ise bağlanan DNA moleküllerinin içselleştirilmesi üzerine rol oynadıkları ortaya çıkartılmıştır (87,92).

Memeli spermatozoasında DNA'nın 30-50 Kb boyutlarında düğümlenmiş bölümler halinde olduğu ve bunların bazal bölgelerinden proteinöz yapıdaki nükleer matrikse tutundukları bildirilmiştir. Farelerde bu bölgelere ekzojen DNA'nın sıkıca bağlandığını iddia eden çalışmalar mevcuttur (93).

Ekzojen olarak verilen DNA'nın spermatozoonla birleştikten sonra alıcı genomundaki nükleazlarca yıkılma, spermatozoon nükleusuna ekzojen entegrasyon, oluşan canlıda epizomal kalıcılık, oosit ile genetik entegrasyon ve ekzojen genin homolog genomik bölgeye geçerek Homolog Rekombinasyon (HR) oluşması şeklinde beş farklı tarzda sonuçlanabileceği bildirilmiştir (65).

Xenopus leavis spermatozoasına yabancı DNA'nın 20 dakika içinde bağlandığı gösterilmiştir (87). Memeli spermatozoasının ekzojen DNA'yı bağlayıp içselleştirdiği (ilk 10 dakikada % 45, 2 saatte % 65'ini) bildirilmiştir (94).

Fare spermatozoasında aktif bir ters transkriptaz (RT) bulunması ekzojen RNA moleküllerinin spermatozoada bu yöntemle cDNA'ya çevrilip IVF sırasında embriyolara aktarımının gerçekleştiğini göstermiştir (7,45). Buradaki RT aktivitesi endojen olup iki temel eleman tarafından (LINE-1 ve endojen retrovirüsler) kodlanmakta olduğu bildirilmiştir (7).

Motil spermatozoanın immotil spermatozoaya göre ekzojen DNA'yı daha iyi aldığına ve yüksek oranda ekzojen DNA ile inkübe edildiğinde spermatozoanın motilitesini düşürdüğüne ve kauda epididimisten toplanmış olgun spermatozoanın

olgunlaşmamış olanlara göre DNA bağlama yeteneğine sahip olduklarına dair çalışmalar bildirilmiştir (89,92,95). Buna ek olarak ejaküle olmuş spermatozoanın yüksek DNA miktarı varlığında DNA taşımada başarılı olduğu (500 ng/10⁶ spermatozoa) bildirilmiştir (66).

Spermanın seminal plazmasında bulunan bazı maddelerin DNA bağlanmasını engellediği düşünülmektedir (7,92). Seminal plazmadan izole edilen İnhibitör Faktör 1 (IF-1)'in varlığında daha önce bahsedilen DNA'nın spermatozoon üzerinde bağlandığı bölgenin DNA bağlama yeteneğini kaybettiği bildirilmiştir. IF-1'in sağlam spermatozoonun postakrozomal kısmında yer aldığı bildirilmiştir (7,9,87,90). Bunun aksine seminal plazmanın ayrılmasının negatif etkilerinin olabileceği de bildirilmiştir (96).

Özellikle embriyo kültür ortamlarında kullanılan sığır serum albumini gerek spermatozoonun baş bölgesinde bulunan bölgeye gerekse spermatozoaya DNA bağlanmasında kullanılan taşıyıcı maddelere DNA bağlanmasında yarışçı hale gelmesinden ötürü özellikle spermatozoon-eksojen DNA inkubasyonu sırasında ortamdan uzaklaştırılması gerektiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (87,89)

Farelerde yapılan bir çalışmada spermatozoon DNA'sında oosite transfer edilecek genin entegrasyonunu kolaylaştırıcı şekilde tek bant kırılmalarının olduğu, spermatozoonun baş kısmıyla birlikte verilen eksojen DNA'nın entegrasyonunun ICSI sonrası ilk S fazına kadar geciktiği belirlenmiş olup bu durumun açıklaması olarak, spermatozoaya bağlı bazı faktörlerin erken embriyoda eksojen DNA'yı bağlaması ve entegrasyonu geciktirmesi, bu durumun olmadığı zaman ise eksojen DNA'nın entegre olamadan degrade olduğu bildirilmiştir (88).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Stok Solüsyonlar:

3.1.1. Medyum 199 Stok (10 X)

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
Medyum 199 Toz *	95 mg	Gibco 31100-27
NaHCO ₃	22 mg	Sigma S-5761
Embriyo test edilmiş su ile tamamlanır	10 mL	Sigma W-1503

* L-Glutamin ve Earle Tuzları içeren tip

pH = 7,2 – 7,4 Osmotik basınç = 275 – 285 mOsm/ kg ayarlanmıştır.

0,22 µm'lik filtre ile filtre edilerek 4°C'de saklanmıştır. Kullanım süresi 2 aydır.

Çalışmada günlük kullanılacak miktarlarda hazırlanmıştır.

3.1.2. Bikarbonat Stok Solüsyonu (B STOK):

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
NaHCO ₃	1,05 g	Sigma S-5761
Embriyo test edilmiş su ile tamamlanır	50 mL	Sigma W-1503

Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtrelerle filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.

Kullanım süresi 2 haftadır.

3.1.3. Hepes Stok (H STOK):

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
Na Hepes	1,627 g	Sigma H-3784
Hepes (free acid)	1,5 g	Sigma H-6147

Embriyo test edilmiş su ile tamamlanır.	50 mL	Sigma W-1503
---	-------	--------------

Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtrelerle filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.

Kullanım süresi 2 aydır.

3.1.4. Tuz Stoğu (S2 STOK):

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
NaCl	3,147 g	Sigma S-5886
KCl	0,267 g	Sigma P-5405
NaH ₂ PO ₄	0,027 g	Sigma S-5136
Embriyo test edilmiş su ile tamamlanır.	50 mL	Sigma W-1503

Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtrelerle filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.

Kullanım süresi 3 aydır.

3.1.5. Laktat Stoğu (L STOK):

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
Na Lactate	2,35 mL	Sigma L-1375
Embriyo test edilmiş su ile tamamlanır.	50 mL	Sigma W-1503

Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtrelerle filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.

Kullanım süresi 2 aydır.

3.1.6. Glikoz Stoğu (G STOK):

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
Glikoz	540 mg	Sigma G-6152
Embriyo test edilmiş su ile tamamlanır.	50 mL	Sigma W-1503

Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtrelerle filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.
Kullanım süresi 2 aydır.

3.1.7. Kalsiyum Stoğu (D STOK):

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
CaCl ₂ .2H ₂ O	630 mg	Sigma C-7902
Embriyo test edilmiş su ile tamamlanır.	25 mL	Sigma W-1503

Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtrelerle filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.
Kullanım süresi 3 aydır.

3.1.8. Magnezyum Stoğu (M STOK):

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
MgCl ₂ .6H ₂ O	250 mg	Sigma M-2393
Embriyo test edilmiş su ile tamamlanır.	25 mL	Sigma W-1503

Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtrelerle filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır.
Kullanım süresi 3 aydır.

3.1.9. Antibiyotik Stoğu (PS STOK):

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
Penisilin	187,5 mg (297.000 IU)	Sigma P-7794
Streptomisin	125 mg	Sigma S-1277
Embriyo test edilmiş su ile tamamlanır.	25 mL	Sigma W-1503

Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtrelerle filtre edilmiş ve 500 µl'lik eppendorf tüplere konularak - 20 °C'de saklanmıştır.

3.1.10. Phenol Red Stoğu

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
Phenol Red	50 mg	Sigma P-5530
Embriyo test edilmiş Su eklenir.	2.5 mL	Sigma W-1503

Filtre edilmeden 10, 20, 30 µl hacimlerde porsiyonlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.

Kullanım süresi 3 aydır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Medyumlar ve Solüsyonlar:

3.2.1. Ovaryum Transport ve Yıkama Medyumu: Phosphate-buffered saline (PBS):

20x PBS STOK

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
NaCl	160 gr	Sigma S-5886
KCl	4 gr	Sigma P-5405
KH ₂ PO ₄	4 gr	Sigma K-5655
Na ₂ HPO ₄	43,2 gr	Sigma S-5011
Ultra pure su ile tamamlanır.	1 litre	

Tamamlandıktan sonra 0,22 µm'lik büyük filtre ile filtre edilmiş ve laminar flow altında 50 ml porsiyonlanmış ve 50 ml porsiyonlar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

PSN STOK (Penisilin Straptomisin-Neomisin Stoğu Sadece PBS stok için kullanılmıştır)

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
PENİSİLİN (1500 IU/mg)	6 g	Sigma P- 7794
STREPTOMİSİN	5 g	Sigma S-1277
NEOMİSİN	5 g	Sigma N-6386
Ultra pure su ile tamamlanır.	40 mL	

Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiş ve 1 mL hacimlerde porsiyonlayıp, -20 °C 'de saklanmıştır.

1X PBS (YIKAMA PBS) HAZIRLANMASI

Steril kabin içinde 950 ml otoklavlanmış distile suya 50 mL 20X PBS stok eklenir. İçinden 2 mL çıkarılarak yerine PSN stoktan 2 mL eklenmiştir. Osmotik basınç yaklaşık 280 mOsm/kg, pH'sı da yaklaşık 7,2 – 7,4 arasında ayarlanmıştır. Antibiyotiği katılmış olan PBS şişeleri +4°C sıcaklıktaki buzdolabında 3 ay süreyle saklanarak kullanılmıştır. Kullanmadan önce, 1 x PBS ısısı 37 °C'ye çıkarılarak kullanılmıştır.

3.2.2. Oosit yıkama medyumu (OWM STOK): Hapes tamponlu medyum (H-199+):

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Molarite	Firma-Katalog No
Toz TCM-199	2,475 g		GİBCO 31100-27
H Stok	21 mL	10,5 mM Na Hapes; 10,5 mM Hapes	Stokta belirtilmiştir.
B Stok	4 mL	4 mM	Stokta belirtilmiştir.
Kanamisin	19 mg	75 µg/mL	Sigma K-1377
Heparin	2,5 mg	10 µg/mL	Sigma H-3149
Ultra pure su ile tamamlanır.	250 ml		

Medium 0,22 µm'lik filtre ile filtre edilir ve +4 °C'de 3 ay saklanır.

OWM'nin kullanılacağı gün; Yıkama medyumu içine 3 mg /mL BSA Frak. V (Sigma A-3311) + %1 PS Stok eklenmiştir. Kimyasallar eklendikten sonra pH: 7,2 - 7,4'e, osmotik basınç: 283+/- 10 mOsm/kg'a ayarlanmıştır. 0,22 µm'lik filtre ile filtre edilerek +4°C buz dolabında kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

Elde edilen oositlerin yıkanması veya atmosfer koşullarında uzun süre bekleyecekleri durumlarda kullanılmak üzere aynı formülasyon ile embriyo test edilmiş su kullanılarak OWM hazırlanmıştır.

3.2.3. *In Vitro* Olgunlaşma Medyumu (OMM)

Medyum her uygulamada günlük taze olarak hazırlanmıştır, uygulamadan, yani oositler içine koyulmadan en az 4-6 saat önce hazırlanıp petriler %5 CO₂ koşullarındaki etüvde inkübe edilmiştir.

TCM-199 STOK

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
Embriyo Test Edilmiş Su	10 mL	Sigma W-1503
TCM- 199	95 mg	Gibco 31100-270
NaHCO ₃	22 mg	Sigma S-5761

OLGUNLAŞMA MEDYUMU

Stok/Madde	Katılacak Miktar	Katalog No
TCM-199 STOK	9 mL	Stokta belirtilmiştir.
FCS	1 mL	F9665
FSH	5 µg	F2293
LH	100 µg	L5269
Sodyum piruvat	1 mg	Sigma P-3662

0,22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Final solüsyon 7,2-7,4 pH ve 283±10 mOsm/kg'dır.

3.2.4. Oosit/Embriyo Yıkama Medyumu (HSOF), Manipulasyon Medyumu (* Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ içermeyen HSOF) ve Sperma Yıkama Medyumu (Percoll-SOF):

Medyumun bileşimi Tablo 3.2'de sunulduğu gibi SOF temelli bir medyumdur. Medyumun hazırlanışı şu şekildedir.

HSOF

Stok	Miktar	Firma-katalog No
S2 stock	10 mL	Stokta belirtilmiştir.
H stock	8,4 mL	Stokta belirtilmiştir.
B stock	1,6 mL	Stokta belirtilmiştir.
C stock	1 mL	Stokta belirtilmiştir.
M stock	1 mL	Stokta belirtilmiştir.

L stock	1 mL	Stokta belirtilmiştir.
G stock	4 mL	Stokta belirtilmiştir.
PS stock	1 mL	Stokta belirtilmiştir.
Phenol Red Stok	50 µL	Stokta belirtilmiştir.
Na pyruvate	3,6 mg	Sigma P-3662
Glutamine Stok	500 µL 200 mM	Sigma G-6392
BSA (fraction V)	300 mg	Sigma A-3311
Kanamycin	7,6 mg	Sigma K-1377
Embriyoda test edilmiş su ile tamamlanacaktır.	100 mL	Sigma W-1503

pH'sı 7.2-7.4, osmotik basıncı 283 ± 10 mOsm/kg'a ayarlandıktan sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Osmolarite düşük çıkarsa S2 stok eklenerek ayarlama yapılmıştır.

*Proteinsiz HSOF: HSOF'un BSA frak. V katılmamış halidir.

* Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ - free HSOF: HSOF'a D ve M stok katılmamış halidir.

Percoll-SOF

Stok	Miktar	Firma-katalog No
S2 stock	5.0 mL	Stokta belirtilmiştir.
Na Hepes	137 mg	Sigma H-3784
Hepes (free acid)	126 mg	Sigma H-6147
D stock	0.5 mL	Stokta belirtilmiştir.
M stock	0.5 mL	Stokta belirtilmiştir.
Percoll	50 mL	Sigma P-1644

pH'sı 7.2-7.4, osmotik basıncı 280-300 mOsmol/kg'a ayarlanmıştır. Küçük sapmalar S2 solusyonu kullanılarak ayarlanmıştır. Osmotik basınçta büyük sapmalar var ise solüsyonlar yeniden hazırlanmıştır.

Percoll-SOF filtre edilmeden +4°C sıcaklıktaki buzdolabında 1 ay saklanarak kullanılabilme imkanı bulunmasına rağmen her uygulamadan önce taze olarak hazırlanmıştır.

3.2.5. *In vitro* Fertilizasyon ve Embriyo Kültür Medyumları (BSOF, SOF):

Fertilizasyon (BSOF) ve embriyo kültür (SOF) mediumlarının bileşimi aşağıda sunulduğu gibidir. Her iki medyum SOF temelli bir medyumdur Medyumun hazırlanışı şu şekildedir.

BSOF Fertilizasyon Medyumu:

Stok	Miktar	Firma-katalog No
S2 stok	1 mL	Stokta belirtilmiştir.
B stok	1 mL	Stokta belirtilmiştir.
C stok	0,2 mL	Stokta belirtilmiştir.
M stok	0,1 mL	Stokta belirtilmiştir.
L stok	0,3 mL	Stokta belirtilmiştir.
Na pyruvate	1,08 mg	Sigma P-3662
Glutamin Stok (200 mM)	50 µL	Sigma G-6392
PS stock	0,1 mL	Stokta belirtilmiştir.
Kanamycin	0,8 mg	Sigma K-1377
Embryo test edilmiş su ile tamamlanır.	10 mL	Sigma W-1503

*Fertilizasyon medyumunu (BSOF) %2 oranında (v/v) koyun östrus serumu ile desteklenmiştir (4.9 ml BSOF + 100 µL koyun östrus serumu). 0.22 µm filtre ile filtre edilerek sterilize edilmiştir. Uygulama gününden bir gün önce taze olarak hazırlanmıştır. Phenol red bu medyuma isteğe göre SOF medyumuna katılan miktarda

katılmıştır. Osmolaritesi düşük çıkması halinde S2 stok ilave edilerek 283 ± 10 mOsm/kg' a ayarlanmış olup pH'sı 7.9'a ayarlanmıştır.

SOF (Sentetik Ovidukt Sıvısı) Kültür Medyumu:

Stok	Miktar	Firma-katalog No
S2 stok	1 mL	Stokta belirtilmiştir.
B stok	1 mL	Stokta belirtilmiştir.
C stok	0,1 mL	Stokta belirtilmiştir.
M stok	0,1 mL	Stokta belirtilmiştir.
L stok	0,1 mL	Stokta belirtilmiştir.
Na pyruvate	0,36 mg	Sigma P-3662
Glutamin Stok (200 mM)	47.4 μ L	Sigma G-6392
PS stok	0,1 mL	Stokta belirtilmiştir.
Kanamycin	0,8 mg	Sigma K-1377
Phenol red Stok	5 μ L	Stokta belirtilmiştir.
BSA (fatty acid free)	40 mg	Sigma A-8806
BME-aa	0,4 mL	Sigma B-6766*
MEM-non ess aa	0,1 mL	Sigma M-7145
Embriyoda test edilmiş su ile tamamlanır.	10 mL	Sigma W-1503

Medyumların osmotik basınçları kontrol edilerek 283 ± 10 mOsmol/kg'a ayarlanmıştır. Her iki medyumun pH'sı 7,9'a ayarlanmıştır. Medyumun pH ve osmotik basınç ayarları yapıldıktan sonra 0.22 μ m filtreden geçirilerek sterilize edilip +4°C sıcaklıktaki buzdolabında 1 hafta kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Her hafta medyum taze olarak hazırlanmıştır. Gametler medyumların içine koyulmadan %5 CO₂, %5 O₂ ve

%90 N₂ gaz karışımı ortamda pH'nın dengelenmesi ve gaz kompozisyonu dengeleninceye kadar bir gece önceden gazlanmış olmalıdır.

SOF2 Kültür medyumunu:

Hazırlanan SOF'tan 20 mL SOF içine 480 µL G stok (son glikoz oranı 1,5 mM olacak şekilde) ve %10 FCS eklenir. 0.22 µm filtre ile filtre edilir.

3.2.6. Spermatozoa Sayımı İçin Kullanılan Hancock Solüsyonu:

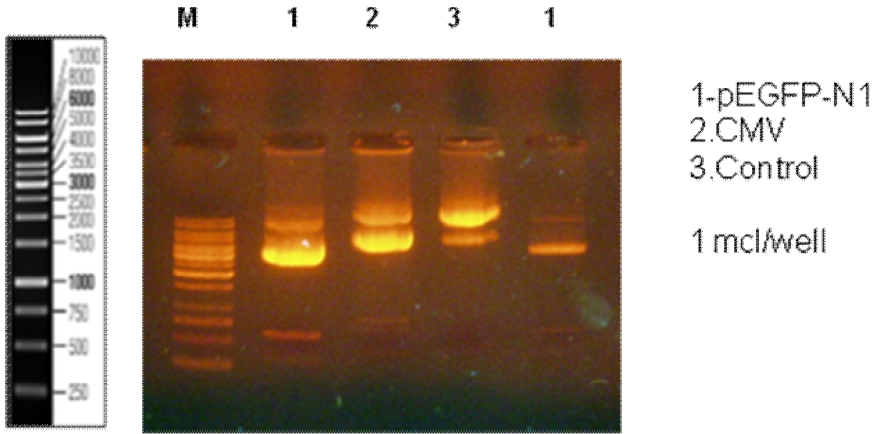
1.Solusyon		
	NaCl	1.13 gr
	Bidistile su ile tamamlanır.	62,5 mL
2. Solusyon		
Kısım A)	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	2.71 gr
	Bidistile su ile tamamlanır.	62,5 mL
Kısım B)	KH ₂ PO ₄	2,78 gr
	Bidistile su ile tamamlanır.	62,5 mL
	25 mL A + 10 mL B karıştırılarak 2. solüsyon elde edilmiştir.	
1. Solüsyondan	18.75 mL	
2. Solüsyondan	12,50 mL	
Formalin	81 mL	
Bidistile su	62,5 mL	

3.2.7. Elektroporasyon İçin Kullanılan PBS:

Kullanılacak miktarda embriyoda test edilmiş Ca-Mg Free PBS içerisine 3 mg/mL BSA Fraksiyon V ilave edilip 0.22 µm filtre ile filtre edilmiştir. Kullanmadan önce oda ısısında bekletilmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan Plazmid DNA'nın Eldesi

Çalışmada kullanılan plazmid DNA (pDNA) pEGFP-N1 Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Kadir TURAN tarafından sentezlenmiş ve bu çalışma için hediye edilmiştir. DNA'nın izolasyonu için piyasada mevcut olan Qiagen ve Macherey-Nagel kitleri kullanılmıştır. Tüm işlemlerin sonunda elimizde 911ng/µL Plazmid DNA olacak şekilde sentezlenmiştir.



3.4. Gen Transferinde Kullanılacak Oositlerin Elde Edilmesi

Çekmeceli Et Kombinasi Mezbaha'sından 30°C'lik PBS solüsyonu içerisinde kesimden sonra 2 saat içerisinde İ.Ü.Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı İn vitro Fertilizasyon Laboratuvarı'na getirilen koyun ovaryumları 37°C'lik PBS ile yıkandıktan sonra yüzeysel kesme işlemine tabi tutulmak için 37°C'lik PBS içeren cam beherlere konulmuştur. Ovaryumlar tek tek folliküllerinin üzeri yüzeysel olarak kesme şeklinde çizik atılıp Oosit Yıkama Medyumu (OWM) içeren enjektörlerle uygun toplama kaplarının içine yıkandıktan sonra elde edilen iyi kalitede oositler OWM içeren petri kaplarına toplanmış ve üç kez pasajlanarak yıkandıktan sonra

her kuyucukta 30-40 oosit olacak şekilde içinde olgunlaşma medyumunu (OMM) içeren dört kuyucuklu petrilere konularak 24 saat boyunca en az %95 oranında neme doyurulmuş atmosfer ortamında %5 CO₂ içeren, 38,5°C inkübatörde olgunlaşmaya bırakılmıştır.

3.5. MI Aşamasına Olgunlaşmış Oositlerin Gen Transferi İçin Hazırlanması:

Yirmi dört saat boyunca olgunlaşmaya bırakılan oositler ilk olgunlaşma kriteri olan kumulus hücrelerinin ekspansiyonu yönünden incelenmiş ve ekspansiyonu iyi olan oositler denudasyon işlemi için öncelikli olarak kullanılmıştır. Kumulus-oosit komplekslerinin kumulus hücrelerinden arındırılarak denude edilmesi işlemi 300 IU/mL hiyaluronidaz enzimi ve 5 mg/mL Sitokalsin B (CB) içeren 400 µL'lik HSOF bulunan tüplere kumulus-oosit komplekslerinin aktarılıp 2 dk 37°C'lik etüvde bekletilerek 1 dk boyunca vortex işlemi yapıp kumulus hücreleri arasındaki hyaluronik asit bağlarının çözünmesi sağlanarak denude edilmişlerdir. Vorteksleme işlemi sonrasında oositler kendiliklerinden aktive olmalarını engellemek amacıyla Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-Free HSOF içeren petrilere 3 kez pasajlanmışlardır. Maturasyonun temel belirtisi olan I. polar cisim atan oositlerin ayrımı stereo mikroskop altında yapılmıştır.

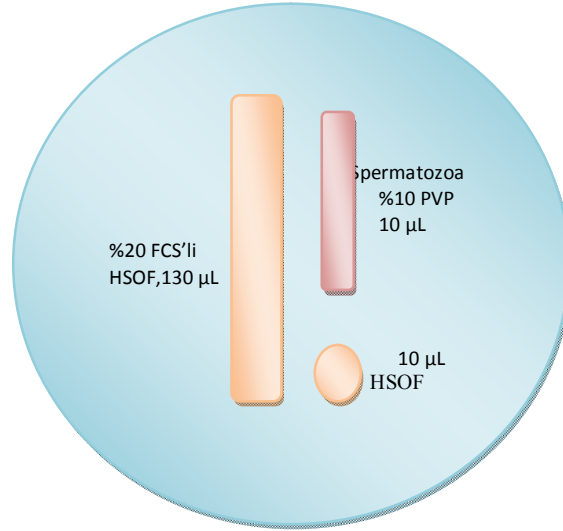
3.6. Gen Transferi İçin Kullanılacak Olan Spermatozoanın Elde Edilmesi ve Ön Hazırlık Aşamaları:

İ.Ü.Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Hayvan Barınakları'nda barındırılan 3 adet Kıvrıcık ırkı koçtan elektro ejakülator ile alınan sperma örnekleri elde edilir edilmez Anabilim Dalı Sperma Laboratuvarında bulunan 37°C'lik su banyosuna konulmuş ve her bir örnek için kitle hareketi ve motilite kontrolü yapılmıştır. Uygun bulunan ejakülatlardan eşit hacimde (200 µL) örnekler alınarak karıştırılıp 'pooling' işlemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan pooling için de kitle hareketi ve motilite kontrolleri yapıldıktan sonra 200 µL alınarak önceden hazırlanmış Percoll tüpünün üst kısmına dikkatlice bırakılarak 24°C'de 1500 G kuvvetinde 15 dakika santrifüj edilmiş, daha sonra supernatant atılıp 5 ml HSOF ile sulandırılan spermatozoa 24°C'de 600 G kuvvetinde 6 dakika boyunca ikinci bir santrifüj işleminden geçirilmiştir. Bu işlemde sonra oluşan supernatant atılmış, dipte kalan spermatozoa pelletinden alınan 5 µL örnek Hancock Solüsyonu ile fikse edilip (995µL Hancock+5 µL

Spermatozoa) Thoma lamında sayılarak yapılacak çalışmaya göre belirlenen konsantrasyonlarda sulandırılmıştır.

3.7. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu İşlemi

Denude edilen oositler Ca^{++} , Mg^{++} -Free HSOF içerisinde intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu için enjeksiyon petrisine alınmıştır (Şekil 3-1).



Şekil 3-1 Mineral yağ ile kapatılmış intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu petrisi

3.8. Spermatozoa Aracılığı ile Gen Transferi İçin Grupların Oluşturulması ve Spermatozoanın Hazırlanması

3.8.1. Kontrol Grubu

Bu grupta ön hazırlık işlemlerinden geçmiş spermatozoa 200 µl Proteinsiz HSOF içerisinde 200.000 spermatozoa olacak şekilde sulandırılmış ve 1/1(v/v) %10'luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine konulmuştur.

3.8.2. Soğutma Grubu

Anabilim Dalı'nda koç spermalarının dondurulması ile ilgili yürütülen bir çalışmada koç spermatozoasının oda ısısından $+4^{\circ}C$ 'a soğutma hızlarının membran bütünlüğüne etkisi incelenmiş ve $30^{\circ}C$ 'den $5^{\circ}C$ 'ye $0,9^{\circ}C/dk$ hızında soğutulduğunda spermatozoonların özellikle baş kısımlarının plazma membranlarının ve akrozomlarının ciddi derecede hasar gördüğü belirlenmiştir (97). Bu sebeple soğutma çalışmasında kullanılacak olan spermatozoa ön hazırlık işlemlerinden geçtikten sonra istenilen

oranlarda HSOF ile sulandırılıp BioCool otomatik alkollü soğutma cihazına konularak verilen hızda 5°Cye soğutulmuştur. 200 000 Spermatozoa, 200 µL Proteinsiz HSOF içerisinde 10 µg (50ng/µL) plasmid DNA ile 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 1/1(v/v) %10'luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine konulmuştur.

3.8.3. Elektroporasyon Grubu

Bu gruptaki her bir DNA konsantrasyonu için (0,25, 50 ve 125 ng/µL) 200 000'er spermatozoa 200 µL Elektroporasyon PBS'i içerisinde Plazmid DNA ile 3 dk buz üzerinde bekletilmiş, ardından 2 mm'lik Elektroporasyon küvetinde 250 V, 1 ms elektroporasyon yapılmıştır. Bunu takiben eppendorf tüpüne alınan spermatozoa 3 dk boyunca buz üzerinde bekletilmiş ve 1/1(v/v) %10'luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine konulmuştur.

3.8.4. Triton-X Grubu

Bu grupta %0.5 'lik Triton X-100 ile buz üzerinde 20 dk çalkalanarak muamele edilen spermatozoa daha sonra HSOF ile 3 kez 500 G'de 5 dk 24°C'de santrifüj edilerek yıkanmıştır. Daha sonra 200 000 spermatozoon (200 µL Proteinsiz HSOF içerisinde) 10 µg Plazmid DNA (50 ng/µL) ile 1 dk buz üzerinde inkübe edilmiş ve 1/1(v/v) %10'luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine koyulmuştur. Çalışmada Triton X-100 (Sigma;T8787) kullanılmıştır.

3.8.5. Turbofect Grubu

Turbofect™ transfeksiyon ajanı olarak hücrelerde kullanıldığından spermatozoada kullanımında ön denemeler yapılmış ve belirlenen gen konsantrasyonları için maddenin kendi uygulama prosedürlerinde bazı optimizasyonlara gidilmiştir. Çalışmada Turbofect #R0531 Fermentas ürünü kullanılmıştır.

3 µg Plazmid DNA grubu: Spermatozoayı 3 µg Plazmid DNA (3 ng/µL) ile muamele etmek için kullanılan ilk grupta 3,27 µL Plazmid DNA (3µg) + 96,73 µL proteinsiz HSOF içerisinde sulandırılmış, 2 µL Turbofect bu karışım ile birleştirilerek oda ısısında 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra 898 µL içerisinde 1×10^6 adet spermatozoa bulunan karışımın üzerine aktarılarak 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1/1(v/v) %10'luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine konulmuştur.

4 µg Plazmid DNA grubu: Kullanılacak DNA'nın artırılarak 4 µg Plazmid DNA (4 ng/µL) yüklenmesi için 4,4 µL Plazmid DNA (3µg) + 95,6 µL proteinsiz HSOF içerisinde sulandırılmış, 2 µL Turbofect bu karışım ile birleştirilerek oda ısısında 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra 898 µl içerisinde 1×10^6 adet spermatozoa bulunan karışımın üzerine aktarılarak 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1/1(v/v) %10'luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine konulmuştur.

10 µg Plazmid DNA grubu: Çalışma grupları içinde genellikle en iyi transgeniklik değerlerine sahip olan 10 µg Plazmid DNA'nın ortama yüklenmesi için (10 ng/µL) 9,87 µL Plazmid DNA (10µg) + 90,13 µL proteinsiz HSOF içerisinde sulandırılmış, 6 µL Turbofect bu karışım ile birleştirilerek oda ısısında 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra 794 µl içerisinde 1×10^6 adet spermatozoa bulunan karışımın üzerine aktarılarak 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1/1(v/v) %10'luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine konulmuştur.

20 µg Plazmid DNA grubu: Turbofect grubunda daha yüksek miktarda DNA'nın (20 ng/µL) embriyo gelişimine etkilerinin araştırılması için 16,46 µL Plazmid DNA (20µg) + 83,54 µL Proteinsiz HSOF içerisinde sulandırılmış, 10 µL Turbofect karışım ile birleştirilerek oda ısısında 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra 790 µl içerisinde 1×10^6 adet spermatozoa bulunan karışımın üzerine aktarılarak 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1/1(v/v) %10'luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine konulmuştur.

3.8.6. Lipofectamin Grubu

Çalışmada LipofectaminTM 2000 Reagent kullanılmıştır (katolog no 11668-07). Finalde 3 µg Plazmid DNA(10 ng/µL) taşınması için; 3,29 µl DNA 150 µL proteinsiz HSOF ile sulandırılmış, 3 µl Lipofectamin 150 µL proteinsiz HSOF içinde sulandırılmış ve daha sonra bu iki karışım birleştirilmiştir. Bu karışım 500 000 adet spermatozoanın üzerine eklenmiş ve oda ısısında 1 saat inkübasyona alınmıştır.

Aynı grupta etken maddenin 4 µg Plazmid DNA taşınması için (13,33 ng/µL); 4,39 µL DNA 150 µl Proteinsiz HSOF ile sulandırılmış, 4 µL Lipofectamin 150 µL proteinsiz HSOF içinde sulandırılmış ve daha sonra bu iki karışım birleştirilmiştir. Bu karışım 500 000 adet spermatozoanın üzerine eklenmiş ve oda ısısında 1 saat inkübasyona alınmıştır.

Gen taşıtt maddesinin 8 µg Plazmid DNA (26,66 ng/µL) taşıması için; 8,78 µL DNA 150 µl Proteinsiz HSOF ile sulandırılmış, 8 µL Lipofectamin 150 µL proteinsiz HSOF içinde sulandırılmış ve daha sonra bu iki karışım birleştirilmiştir. Bu karışım 500 000 adet spermatozoanın üzerine eklenmiş ve oda ısısında 1 saat inkübasyona alınmıştır.

Lipofectaminin 10 µg Plazmid DNA taşıması için (33,33 ng/µL) 10,97 µL DNA 150 µL proteinsiz HSOF ile sulandırılmış, 10 µL Lipofectamin 150 µL proteinsiz HSOF içinde sulandırılmış ve daha sonra bu iki karışım birleştirilmiştir. Bu karışım 5 x 10⁵ adet spermatozoanın üzerine eklenmiş ve oda ısısında 1 saat inkübasyona alınmıştır.

Tüm gruplar inkübasyon sonunda 1/1(v/v) %10'luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine yerleştirilmiştir.

3.8.7. LDH Grubu

3.8.7.1. Çalışmada kullanılan katmanlı çift hidroksitlerin eldesi

Çalışmada Mg-Al-Cl LDH ile Ca-Al-Cl LDH gen transferinde kullanılmıştır. Bu amaçla İ.Ü.Kimya Mühendisliği Laboratuvarları'nda Prof.Dr.Saadet Pabuccuoğlu önderliğinde Araş.Gör.Dr.Koray Gök tarafından sentezlenmiştir.

Ca ve Mg LDH hazırlamak için MgCl₂ veya CaCl₂ dan 3 mmol ve AlCl₃.6H₂O dan 1 mmol alınarak 10 mL deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Sonrasında 40 mL NaOH (6 mmol) içerisine hızlı bir şekilde altta karıştırırken dökülmüştür. Karışım oda sıcaklığında 10 dakika boyunca karıştırılmış ve elde edilen karışım 5 dakika 4500 devir/dk'de santrifüje edilmiştir. Pelletler 40 mL deiyonize suda 2 kere karıştırılarak yıkanmış ve son olarak 10 dakika 4500 devir/dk santrifüje edilerek elde edilen pelletler 50 mL deiyonize su içerisinde dağıtılmıştır. Elde edilen homojen olmayan süspansiyon kapalı bir kaba konarak 100°C de 16 saat bırakılmış ve sonunda heterojen LDH nanopartikülleri elde edilmiştir. Uygulama öncesi düşük pH'lı Ca ve Mg-Al tampon çözeltileri kullanılarak; (2 mM MgCl₂ veya CaCl₂– 1mM AlCl₃ alınarak 10 mL deiyonize suda çözümlenerek hazırlandı) LDH çözeltisinin pH'sı 8,5'dan 7,5'e düşürülmüştür (97).

LDH süspansiyonlarına gen yüklemek için, 320,78 µL (2,13 mg/mL) LDH süspansiyon içeriğinden (0,22 lik membrandan geçirildi) ve 15 µL (911 ng/µl) GFP

içeriğinden alınmış (50:1 w/w) üzerine 31 µL steril su ve 34 µL Mg-Al-tampon çözeltiden konulmuş ve 37°C’de 4 saat karanlıkta karıştırılmıştır. 250 devir/dk ile karışma sonrasında üründe çökme görüldüğünden vorteks ile uygulama öncesi tekrar karıştırılmıştır. Sonrasında bu karışım içinden 5,86 µL alarak (200 ng GFP ye karşılık geldiğinden) önce 9 µL sperm ile muamele ederek üzerine toplamda 400 µL karışım olacak şekilde 372,54 µL HSOF katılmıştır. 37 °C’de etüvde bekletilmiştir.

Mg ve Ca LDH maddeleri istenilen gen miktarlarını taşımaları için 4 saatlik bir süre sonunda 200 ng (0.5ng/µL) ve 1 µg (2.5ng/µl) plazmid DNA’yı taşıyacak duruma getirilmiştir. 400 µL proteinsiz HSOF içerisine 10⁶ spermatozoa olacak şekilde LDH’lar ile 1 saat inkübasyona bırakılan spermatozoa inkübasyon sonunda 1/1(v/v) %10’luk PVP ile karıştırılarak ICSI petrisine yerleştirilmiştir.

3.8.8. Poli-β-Poli-aminoester Grubu

Çalışmada poli-β-aminoester İ.Ü. Kimya Mühendisliği Laboratuvarları’nda Prof.Dr. Saadet Pabuccuoğlu önderliğinde Araş.Gör.Dr. Koray Gök tarafından sentezlenmiştir. Nanoçöktürme veya çözücü yer değiştirme yöntemi (etanol-su sistemi) kullanılarak hazırlanmıştır. Nanopartikül polimerleri hazırlamak için ±1°C hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen kontakt termometreli manyetik karıştırıcıda su sabit bir hızda karıştırılırken, 42,5 mL distile suya PBAE polimerinin 7,5 mL etanoldeki çözeltisi oda sıcaklığında damla damla ilave edilmiştir. Karışım 5 saat daha karıştırmaya devam edilmiştir. Hazırlanan polimer solüsyonu gen yüklenmiş nanopartikül hazırlığı öncesinde, partiküllerin büyüklüklerine göre ayrıştırılmaları için santrifüje edilmiş ve santrifüj sonrası üst kısım ve alt kısım ayrıştırılarak pDNA ile 1 saat muamele edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Bu grupta 200 000 spermatozoa için 200 ng pDNA (0,5 ng/µL) kullanılmıştır.

3.9. İntrasitoplazmik Gen Enjeksiyonu Sonrasında Oosit Aktivasyonu ve Embriyo Kültürü

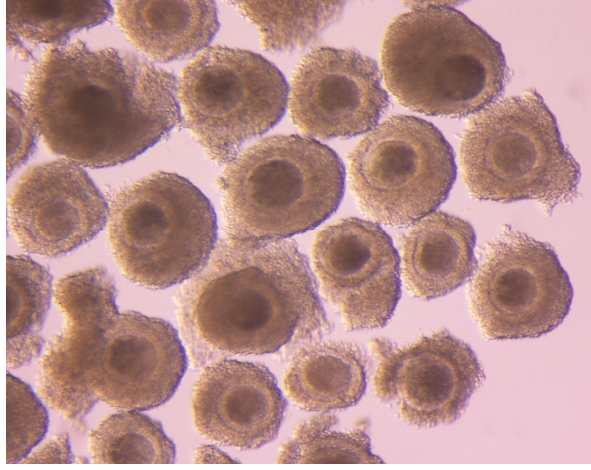
Peura ve Vajta (2003) tarafından klon koyun embriyolarının aktivasyonu ve kültüründe kullanılan metodlarda bazı değişiklikler yapılarak embriyo kültürü devam ettirilmiştir (98). ICSI prosedürünü takiben aktivasyonların uyarılması için 5 µg/mL ionomisin içerisinde 5 dakika boyunca bekletilen oositler %2 östrus koyun serumu içeren BSOF içerisinde yıkamalardan geçirilerek BSOF kültür damlalarına aktarılmıştır.

Embriyolar 18-22 saat sonra önce HSOF daha sonra SOF yıkamalarından geçirilip SOF kültür damlalarına aktarılmıştır. Bunu takiben 2. günde bölünme kontrolleri yapılmıştır. Kültürün 4. gününde bölünen embriyolar glikoz içeren SOF2 medyumunun kültür damlalarına aktarılmıştır. Embriyoların gelişimleri 9. güne kadar takip edilmiştir.

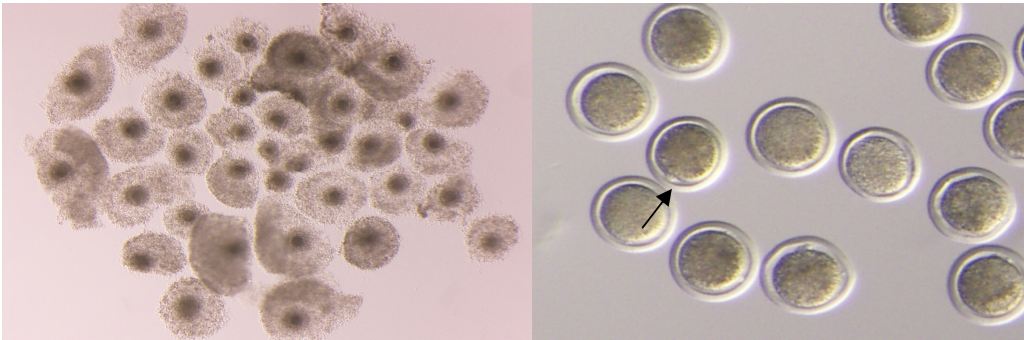
Çalışmada elde edilen bulguların istatistik analizleri Dunken yöntemi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmada mezbahada kesilmiş olan koyun ovaryumlarından kazanılmış olan toplam 1835 adet primer koyun oositi (Şekil 4-1) olgunlaşmaları için maturasyon medyumuna aktarılmış, 24 saatin bitiminde kumulus açılımı gösteren oositlerden (Şekil 4-2) toplam 932 adedi birinci polar atımlarını gerçekleştirmiş (Şekil 4-2) ve yine bunların içinden 819 adedi ICSI yoluyla transgenik koyun embriyosu üretimi çalışmasında kullanılmıştır.



Şekil 4-1: Olgunlaşma öncesi primer koyun oositleri



Şekil 4-2: Olgunlaşma sonrası kumulus açılımı gösteren ve MII aşamaya gelmiş koyun oositleri (ok işareti: 1. Polar)

Tablo 4-1: Elektroporasyonla spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar

Grup No	Gen miktarı	Toplam oosit sayısı	Yarıklanan oosit sayısı (%)	Erken dönem (%)**	Morula (%)**	Blastosist (%)**	Dejenere (%) *	Fragmente (%)**	Transgenik (%)**	Transgenik etkinlik (kimeriklik yüzdesi)
(1)	50 ng 0.25 ng/ μ L	25	11 (44,00) ^b	7 (58,33) ^b	4 (33,33) ^c	0 (0) ^a	1 (7,69) ^b	0 (0) ^a	2 (16,66) ^b	2/2 kimerik (100) ^b
(2)	10 μ g 50 ng/ μ L	56	43 (76,78) ^a	20 (46,51) ^a	21 (48,83) ^b	2 (4,65) ^a	5 (8,92) ^a	3 (6,97) ^a	28 (65,11) ^a	27/28 kimerik (96,42) ^a
(3)	25 μ g 125 ng/ μ L	18	11 (61,11) ^{ab}	0 (0) ^{ab}	11 (100) ^a	0 (0) ^a	3 (16,66) ^c	0 (0) ^a	7 (63,63) ^a	7/7 kimerik (100) ^a

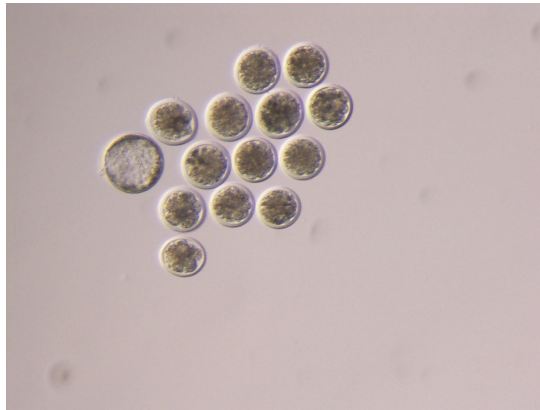
abc: Aynı kolonda farklı harflerle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (Dunken test; $p < 0,05$)

*Dejenereasyon oranları manipule edilen toplam oosit sayıları esas alınarak hesaplanmıştır.

**Bu gelişim evrelerinin % oranların hesaplanmasında yarıklanan hücre sayıları esas alınmıştır.

Elektroporasyon ile spermatozoanın transfeksiyonunun elde edildiği grup sonuçları incelendiğinde (Tablo 4-1), yarıklanma açısından 10 µg (50ng/µLgen) kullanılan grubun (Grup 2) diğerlerine göre daha iyi olduğu ($p<0,05$), erken döneme kadar gelişebilen embriyolar açısından bakıldığında yine bu grubun önde geldiği; ancak morulaya ulaşma açısından 25 µg (125ng/µL) gen kullanılan grubun (Grup 3) diğerlerinden daha iyi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Blastosiste ulaşım açısından bakıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Manipulasyon sonrası embriyolarda dejenerasyon yönünden en yüksek oranlar 3. grupta bulunmuş bunu takiben aralarında istatistiksel fark olarak 1. ve 2. grupların izlediği saptanmıştır ($p<0,05$). Fragmentasyon yönünden en yüksek değerler 2. grupta bulunmuştur; ancak gruplar arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Transgeniklik ve transgenik etkinlik açısından en başarılı grubun 2. grup olduğu saptanmış ve bu grup elektroporasyon yönteminin en iyi grubu olarak belirlenmiştir.

Soğuk şoku ile transfeksiyon sağlanmaya çalışılan gruplar incelendiğinde (Tablo 4-2) yarıklanmalar ve erken dönem embriyo dönemine gelme açısından gruplar arasında istatistiksel fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Morula aşamasına gelinmesi yönünden en iyi grup 7. grup iken, en kötü sonuçların 5. ve 6. gruplarda olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Blastosiste gelişim yönünden 6. ve 8. gruplar ön plana çıkmakla birlikte transgeniklik yönünden 8. grup hem oransal hem de istatistiksel açıdan diğer gruplar arasında tartışmasız en yüksek sonuçlara ulaşılan grup olarak soğutma yönteminin en iyi grubu olmuştur ($p<0,05$). Bu yöntemde gerek dejenerasyon gerekse fragmentasyon açısından gruplar arası istatistiksel bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).



Şekil 4-3: Soğuk şoku grubunda elde edilmiş embriyolar

Tablo 4-2: Soğuk şoku ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar

Grup (no)	Gen Miktarı	Toplam oosit sayısı	Yarıklanan oosit sayısı (%)	Erken dönem (%)**	Morula (%)**	Blastosist (%)**	Dejenere (%)*	Fragmente (%)**	Transgenik (%)	Transgenik etkinlik (kimeriklik yüzdesi)
(4)	50 ng 0.25ng/μL	50	23 (46,00) ^a	10 (43,47) ^a	13 (56,52) ^{ab}	0 (0) ^a	10 (20) ^a	3 (13,04) ^a	5 (21,73) ^b	5/5 kimerik (100) ^b
(5)	100 ng 0.5ng/μL	15	6 (40,00) ^a	5 (83,33) ^a	1 (16,66) ^b	0 (0) ^a	3 (20) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^b	0/0 (0) ^b
(6)	200 ng 1 ng/μL	15	11 (73,33) ^a	3 (27,27) ^a	7 (63,63) ^b	1 (9,09) ^a	3 (20,00) ^a	2 (18,18) ^a	0 (0) ^b	0/0 (0) ^b
(7)	300 ng 1.5ng/μL	15	8 (53,33) ^a	1 (12,50) ^a	7 (87,50) ^a	0 (0) ^a	5 (33,33) ^a	3 (37,50) ^a	3 (37,50) ^b	3/3 kimerik (100) ^b
(8)	10 μg 50ng/μL	45	30 (66,66) ^a	17 (56,66) ^a	12 (40,00) ^{ab}	1 (3,33) ^a	4 (8,88) ^a	9 (30,00) ^a	20 (66,66) ^a	20/20 kimerik (100) ^a

abc: Aynı kolonda farklı harflerle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (Duncken test; p<0,05)

*Dejenerasyon oranları manipule edilen toplam oosit sayıları esas alınarak hesaplanmıştır.

**Bu gelişim evrelerinin % oranların hesaplanmasında yarıklanan hücre sayıları esas alınmıştır.

Tablo 4-3: Lipofectamin ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar

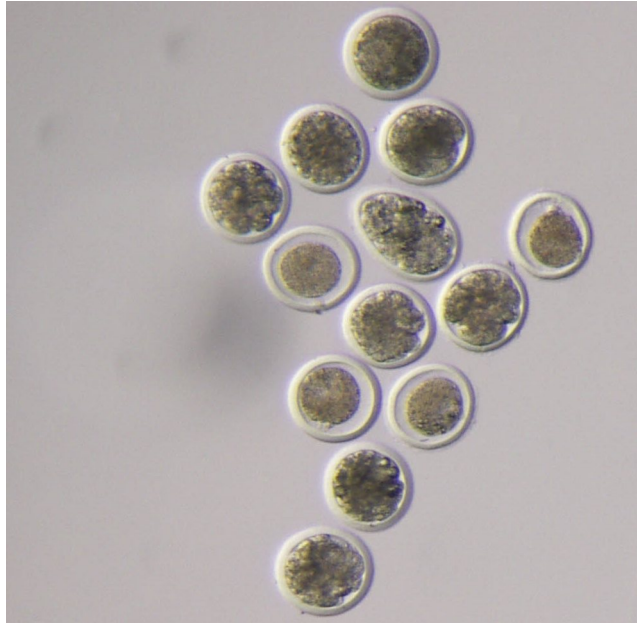
Grup adı, (no)	Gen Miktarı	Toplam oosit sayısı	Yarıklanan oosit sayısı (%)	Erken dönem (%)**	Morula (%)**	Blastosist (%)**	Dejenere (%)*	Fragmente (%)**	Transgenik (%)	Transgenik etkinlik (kimeriklik yüzdesi)
(9)	3 µg 10 ng/µL	20	15 (75) ^{ab}	9 (60) ^{ab}	5 (33,33) ^a	1 (6,66) ^a	1 (5) ^a	0 (0) ^a	2 (13,33) ^{ab}	2/2 kimerik (100) ^b
(10)	4 µg 13,33 ng/µL	20	20 (100) ^a	14 (70) ^a	5 (25) ^a	1 (5) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^b	0/0 (0) ^{ab}
(11)	8 µg 26,66 ng/µL	14	9 (64,28) ^b	4 (44,44) ^b	5 (55,55) ^a	0 (0) ^a	1 (7,14) ^a	0 (0) ^a	3 (33,33) ^{ab}	3/3 kimerik (100) ^{ab}
(12)	10µg 33.33 ng/µL	78	53 (67,94) ^{ab}	25 (47,16) ^{ab}	28 (52,83) ^a	0 (0) ^a	6 (7,69) ^a	5 (9,43) ^a	20 (37,73) ^a	20/20 kimerik (100) ^a

abc: Aynı kolonda farklı harflerle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (Duncken test; p<0,05)

*Dejenerasyon oranları manipule edilen toplam oosit sayıları esas alınarak hesaplanmıştır.

**Bu gelişim evrelerinin % oranların hesaplanmasında yarıklanan hücre sayıları esas alınmıştır.

Lipofectamin taşıyıcı maddesinin kullanılması ile transgenik embriyo üretiminin sonuçları incelendiğinde (Tablo 4-3) yarıklanma yönünden 10 ve 11. gruplar arasında istatistiksel fark görülmüş olup, aynı fark erken döneme ulaşan embriyolarda da saptanmıştır ($p<0,05$). Morula ile blastosist evrelerine erişme yönünden ve dejenerasyon ile fragmentasyon (Şekil 4-3) açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Transgenik etkinlik yönünden de farklılık oluşmamışsa da transgeniklik açısından 9, 11 ve 12. gruplar oransal yönden iyi bulunmuştur. Lipofectamin kullanılan denemelerin en iyi grubu 12 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-4: Lipofectamin grubunda görülen dejenerasyon ve fragmentasyonlar

Tablo 4-4: Turbofect ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar

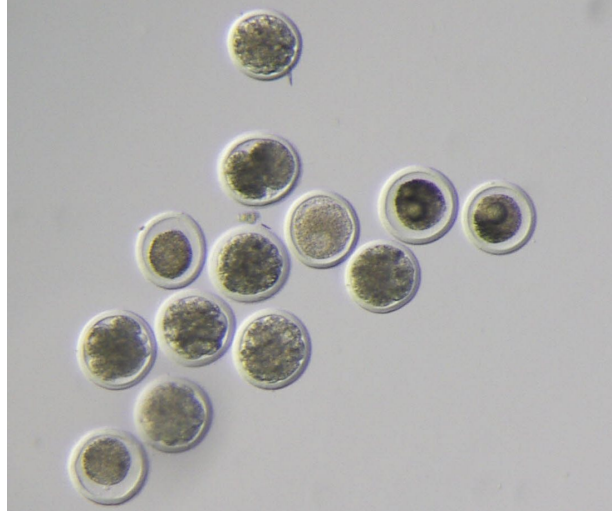
Grup adı, (no)	Gen Miktarı	Toplam oosit sayısı	Yarıklanan oosit sayısı (%)	Erken dönem (%)**	Morula (%)**	Blastosist (%)**	Dejenere (%)*	Fragmente (%)**	Transgenik (%)	Transgenik etkinlik (kimeriklik yüzdesi)
(13)	3 µg 3 ng/µL	29	11 (37,93) ^a	0 (0) ^a	11 (100) ^a	0 (0) ^a	14 (48,27) ^a	7 (63,63) ^b	3 (27,27) ^a	3/3 kimerik (100) ^a
(14)	4 µg 4 ng/µL	15	7 (46,66) ^a	4 (57,14) ^a	3 (42,85) ^{ab}	0 (0) ^a	4 (26,66) ^a	2 (28,57) ^{ab}	1 (14,28) ^a	1/ kimerik (100) ^a
(15)	10 µg 10 ng/µL	74	26 (35,13) ^a	11 (42,30) ^a	15 (57,69) ^{ab}	0 (0) ^a	36 (48,64) ^a	3 (11,53) ^a	11 (42,30) ^a	11/11 kimerik (100) ^a
(16)	20 µg 20 ng/µL	22	5 (22,72) ^a	4 (80,00) ^a	1 (20,00) ^b	0 (0) ^a	10 (45,45) ^a	1 (20,00) ^a	1 (20,00) ^a	1/1 kimerik (100) ^a

abc: Aynı kolonda farklı harflerle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (Duncken test; p<0,05)

*Dejenereasyon oranları manipule edilen toplam oosit sayıları esas alınarak hesaplanmıştır.

**Bu gelişim evrelerinin % oranların hesaplanmasında yarıklanan hücre sayıları esas alınmıştır.

Turbofect™ kullanıldığında (Tablo 4-4) embriyoların yarıklanmalarında, erken döneme ulaşmalarında, blastosist aşamasına gelmelerinde, dejenerasyon, transgeniklik ve transgenik etkinliklerinde gruplar arasında önemli bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$). Ancak morula evresine ulaşmada 13 ve 16. Gruplar arasında ciddi istatistiksel bir fark mevcut olup, aynı fark fragmentasyon yönünden (Şekil 4-4) 13, 15 ve 16. gruplar arasında da görülmüştür ($p<0,05$). Bu yöntemde en iyi gruplar olarak 13 ve 15 gruplarının seçilmiş olmalarının nedeni ise hem maddenin daha önce SMGT tekniği ile birlikte kullanılmamış olması hem de bu iki grubun orantısal olarak diğer iki gruba nazaran daha fazla transgeniklik sonucu göstermiş olmalarıdır.



Şekil 4-5: Turbofect Grubunda görülen dejenerasyon ve fragmentasyonlar

Tablo 4-5: Triton X -100 ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan grupta elde edilen sonuçlar

Grup adı, (no)	Gen Miktarı	Toplam oosit sayısı	Yarıklanan oosit sayısı (%)	Erken dönem (%)**	Morula (%)**	Blastosist (%)**	Dejenere (%)*	Fragmente (%)**	Transgenik (%)	Transgenik etkinlik (kimeriklik yüzdesi)
(17)	10 µg 50ng/µL	85	61 (71,76)	28 (45,90)	33 (54,09)	0 (0)	2 (2,35)	10 (16,39)	25 (40,98)	25/25 kimerik (100)

*Dejenereasyon oranları manipule edilen toplam oosit sayıları esas alınarak hesaplanmıştır.

**Bu gelişim evrelerinin % oranların hesaplanmasında yarıklanan hücre sayıları esas alınmıştır.

Tablo 4-6: LDH ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar

Grup adı, (no)	Gen Miktarı	Toplam oosit sayısı	Yarıklanan oosit sayısı (%)	Erken dönem (%)**	Morula (%)**	Blastosist (%)**	Dejenere (%)*	Fragmente (%)**	Transgenik (%)	Transgenik etkinlik (kimeriklik yüzdesi)
MgLDH (18)	1 µg 2.5ng/µL	62	46 (74,19) ^a	20 (43,47) ^a	26 (56,52) ^a	0 (0) ^a	16 (25,80) ^a	12 (26,08) ^a	6 (13,04) ^a	6/6 kimerik (100) ^a
MgLDH (19)	200 ng 0.5ng/µL	12	6 (50) ^a	3 (50) ^a	3 (50) ^a	0 (0) ^a	4 (33,33) ^a	0 (0) ^a	1 (16,66) ^a	1/1 kimerik (100) ^a
CaLDH (20)	1 µg 2.5ng/µL	45	32 (71,11) ^a	18 (56,25) ^a	14 (43,75) ^a	0 (0) ^a	12 (26,66) ^a	3 (9,37) ^a	7 (21,87) ^a	7/7 kimerik (100) ^a

abc: Aynı kolonda farklı harflerle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (Duncken test; p<0,05)

*Dejenereasyon oranları manipule edilen toplam oosit sayıları esas alınarak hesaplanmıştır.

**Bu gelişim evrelerinin % oranların hesaplanmasında yarıklanan hücre sayıları esas alınmıştır.

Tablo 4-7: Aminoester ile spermatozoanın transfeksiyonu uygulanan gruplarda elde edilen sonuçlar

Grup adı, (no)	Gen Miktarı	Toplam oosit sayısı	Yarıklanan oosit sayısı (%)	Erken dönem (%)**	Morula (%)**	Blastosist (%)**	Dejenere (%)*	Fragmente (%)**	Transgenik (%)	Transgenik etkinlik (kimeriklik yüzdesi)
Aminoester Üst (21)	200ng 0.5ng/µL	14	6 (42,85) ^a	0 (0) ^a	6 (100) ^a	0 (0) ^a	4 (28,57) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0/0 (100) ^a
Aminoester Alt (22)	200 µg 0.5ng/µL	39	19 (48,71) ^a	4 (21,05) ^a	15 (78,94) ^a	0 (0) ^a	19 (48,71) ^a	4 (21,05) ^a	5 (26,31) ^a	5/5 kimerik (100) ^a

abc: Aynı kolonda farklı harflerle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (Dunken test; p<0,05)

*Dejenereasyon oranları manipule edilen toplam oosit sayıları esas alınarak hesaplanmıştır.

**Bu gelişim evrelerinin % oranların hesaplanmasında yarıklanan hücre sayıları esas alınmıştır.

Tablo 4-8: Kontrol grubu ile elde edilen sonuçlar

Grup adı, (no)	Gen Miktarı	Toplam oosit sayısı	Yarıklanan oosit sayısı (%)	Erken dönem (%)**	Morula (%)**	Blastosist (%)**	Dejenere (%)*	Fragmente (%)**
(23)	0 µg	55	28 (50,90)	17 (60,71)	11 (39,28)	0 (0)	19 (34,054)	11 (39,28)

*Dejenereasyon oranları manipule edilen toplam oosit sayıları esas alınarak hesaplanmıştır.

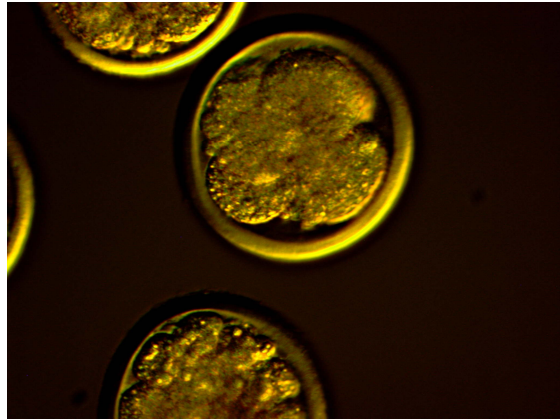
**Bu gelişim evrelerinin % oranların hesaplanmasında yarıklanan hücre sayıları esas alınmıştır.

Triton X-100 grubu spermatozoada plazma membranının hasar verilerek ekzojen DNA'nın bağlanacağı bölgeye gelmesine yardımcı bir işlem olduğu bildirilen bu yöntemde önceden belirtildiği gibi 10 µg plazmid DNA ile çalışılmıştır (Tablo 4-5).

LDH grupları arasında herhangi bir açıdan istatistiksel olarak fark görülmemiştir ($p>0,05$). Bu yüzden aralarında en iyi grubu belirlerken Ca grubu ve Mg grubundan transgeniklik yüzdesinin yüksek olması ve dejenerasyon oranının düşük olması nedeniyle 18 ve 20. gruplar seçilmiştir (Tablo 4-6).

Aminoester gruplarında maddenin kimyasal yapısı ile ilgili olarak santrifüj yapılmış ve santrifüjün alt ve üst kısımları kullanılmıştır (Tablo 4-7). İki grubun embriolarında yarıklanma, erken döneme ulaşma, morula ve blastosiste erişme ile transgeniklik ve transgenik etkinlik parametreleri açısından herhangi bir istatistiksel fark olmamasına rağmen ($p>0,05$), yüzde oranlara bakıldığında Aminoester alt grubunun transgeniklik açısından Aminoester üst grubuna kıyasla yüksek olması nedeniyle bu yöntemin en iyi grubu olarak saptanmıştır.

Kontrol grubunda elde edilen gelişim sonuçları da Tablo 4-8'de verilmiştir.



Şekil 4-6: Triton X-100 grubundan elde edilmiş embriyolar

Tablo 4-9: En iyi transgenik embriyo oranını veren grupların karşılaştırılmaları

Grup adı, (no)	Gen Miktarı	Toplam oosit sayısı	Yarıklanan oosit sayısı (%)	Erken dönem (%)**	Morula (%)***	Blastosist (%)**	Dejenere (%)*	Fragmente (%)**	Transgenik (%)	Transgenik etkinlik (kimeriklik yüzdesi)
2	50ng/μL	56	43 (76,78) ^a	20 (46,51) ^a	21 (48,83) ^a	2 (4,65) ^a	5 (8,92) ^a	3 (6,97) ^{ab}	28 (65,11) ^a	26/27 kimerik 1 tam (96,42) ^a
8	50ng/μL	45	30 (66,66) ^{abc}	17 (56,66) ^{ab}	12 (40) ^{ab}	1 (3,33) ^a	4 (8,88) ^{ab}	9 (30) ^{bc}	20 (66,66) ^{ab}	20/20 kimerik (100) ^{ab}
12	33.33ng/μL	78	53 (67,94) ^{abc}	25 (47,16) ^{ab}	28 (52,83) ^{ab}	0 (0) ^a	6 (7,69) ^{abc}	5 (9,43) ^{ab}	20 (37,73) ^{bc}	20/20 kimerik (100) ^{bc}
13	3ng/μL	29	11 (37,93) ^d	0 (0) ^{cde}	11 (100) ^{ab}	0 (0) ^a	14 (48,27) ^{de}	7 (63,63) ^c	3 (27,27) ^{de}	3/3 kimerik (100) ^{de}
15	10ng/μL	74	26 (35,13) ^d	11 (42,30) ^{de}	15 (57,69) ^b	0 (0) ^a	36 (48,64) ^{de}	3 (11,53) ^a	11 (42,30) ^{cde}	11/11 kimerik (100) ^{cde}
17	50ng/μL	85	61 (71,76) ^{abc}	28 (45,90) ^{abc}	33 (54,09) ^{ab}	0 (0) ^a	2 (2,35) ^{abc}	10 (16,39) ^{ab}	25 (40,98) ^{cd}	25/25 kimerik (100) ^{cd}
18	2.5ng/μL	62	46 (74,19) ^a	20 (43,47) ^a	26 (56,52) ^{ab}	0 (0) ^a	16 (25,80) ^{cd}	12 (26,08) ^{bc}	6 (13,04) ^{de}	6/6 kimerik (100) ^{de}
20	2.5ng/μL	45	32 (71,11) ^{ab}	18 (56,25) ^a	14 (43,75) ^{ab}	0 (0) ^a	12 (26,66) ^{bc}	3 (9,37) ^{ab}	7 (21,87) ^{cde}	7/7 kimerik (100) ^{cde}
22	0.5ng/μL	39	19 (48,71) ^{cd}	4 (21,05) ^{bcd}	15 (78,94) ^{ab}	0 (0) ^a	19 (48,71) ^{de}	4 (21,05) ^{ab}	5 (26,31) ^{cde}	5/5 kimerik (100) ^{cde}
23 (Kontrol)	0 μg	55	28 (50,90) ^{bcd}	17 (60,71) ^e	11 (39,28) ^b	0 (0) ^a	19 (34,054) ^e	11 (39,28) ^{bc}	0 (0) ^e	0 (0) ^e

abc: Aynı kolonda farklı harflerle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (Dunken test; p<0,05)

*Dejenereasyon oranları manipüle edilen toplam oosit sayıları esas alınarak hesaplanmıştır.

**Bu gelişim evrelerinin % oranların hesaplanmasında yarıklanan hücre sayıları esas alınmıştır.

Çalışmada kullanılan her yöntem için ideal olan gruplar belirlendikten sonra bu grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmaları Tablo 4-9'da verilmiştir.

ICSI işlemi sonrası embriyoların yarıklanmaları açısından bakıldığında yarıklanma oranlarının yüksek bulunduğu 2, 8, 12, 17, 18 ve 20. gruplar arasında fark görülmemişken ($p>0,05$), oranların daha düşük görüldüğü gruplardan 13, 15, 22 ve 23. grupların kendi aralarında da istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Yarıklanma açısından en iyi sonuçlar 2. ve 18. gruplarda elde edilmiş ve 8, 13, 15, 22 ve 23. gruplara göre oldukça önemli seviyede yüksek sonuçlar vermiştir ($p<0,05$).

Erken dönemde gelişimleri duran embriyolar açısından gruplar ele alındığında 2, 18 ve 20. grupların en iyi sonucu veren gruplar olduğu görünmekle beraber 8,12 ve 17. gruplarla aralarında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Diğer taraftan 13, 15 ve 23. gruplarda embriyoların önemli derecede yüksek oranda gelişmelerinin erken dönemlerinde bloke olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

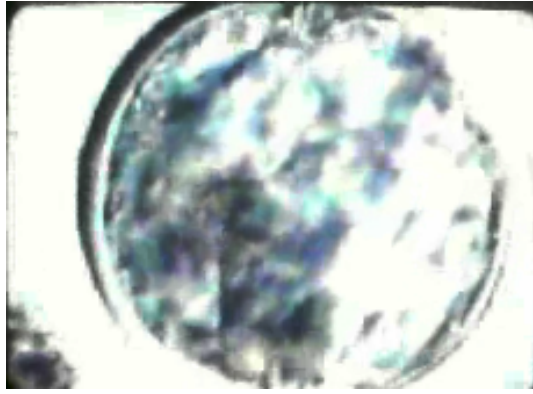
Morula dönemine ulaşma, çalışmada transgenin ekspresyonunun tespitinde önemli bir aşamayı oluşturmakla beraber 2, 8, 12, 13, 17, 18, 20 ve 22. gruplar arasında anlamlı fark çıkmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmadaki tüm deneme grupları ve kontrol grubunda blastosiste gelişim oranları oldukça düşük olarak tespit edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel açıdan farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).

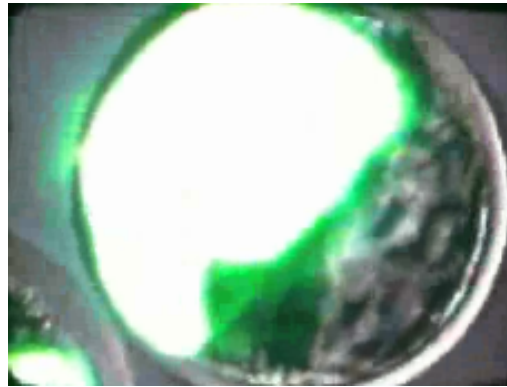
Çalışma gruplarının ICSI işleminden sonra dejenere olan embriyo durumu incelendiğinde 2, 8, 12, ve 17. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemesine rağmen ($p>0,05$) 2. Grup ile 13, 15, 18, 20, 22 ve 23. gruplarla arasında önemli fark olduğu ($p<0,05$) saptanmış ve bu gruplara kıyasla 2. grupta daha düşük oranda dejenerasyon görülmüştür.

Embriyonal gelişim döneminde istenmeyen bir durum olan fragmentasyon oranları açısından gruplar ele alındığında 8, 13, 18 ve 23. gruplar en yüksek oranları vermiş ve bu grupların değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunmamış ($p>0,05$) diğer gruplarla bu oranlar karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Soğutma grubu olan 8. grubun fragmentasyon oranı Turbofect grubu olan 15. grup ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). Aynı zamanda bu grubun değerleri ile 13. grubun değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) fark görülmüştür.

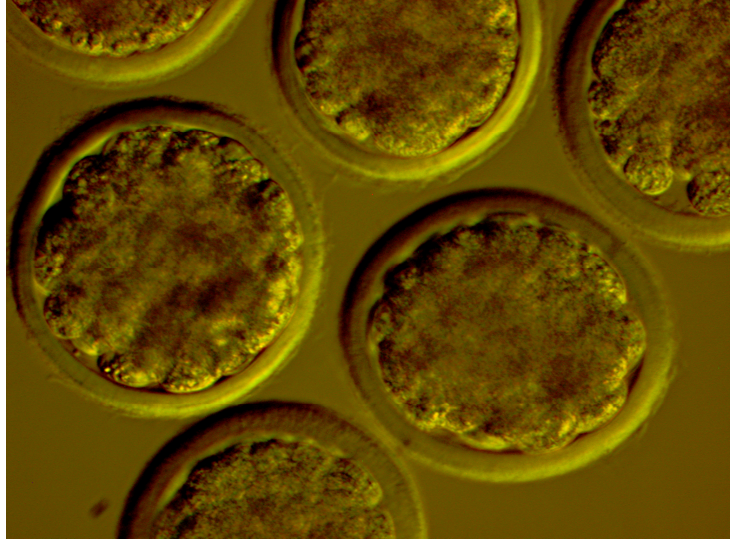
Çalışmanın temel amacını meydana getiren transgeniklik ve transgenik etkinlik açısından (Şekil 4-7 ve Şekil 4-8) gruplar arasında bulunan farklar incelendiğinde, 2 numaralı elektroporasyon grubunun 12, 13, 15, 17, 18, 20, 22 gruplarından istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) derecede daha iyi, 8 numaralı soğutma grubundan ise istatistiksel açıdan önemli olamamasına ($p>0,05$) rağmen bölünen embriyolar üzerinden yüzde oran bakıldığında daha yüksek bulunduğu, transgenik etkinlik açısından (Şekil 4-5 ve şekil 4-6) 8. grup hariç diğer tüm gruplardan anlamlı bir fark ($p<0,05$) ile çok daha üstün bulunduğu saptanmıştır.



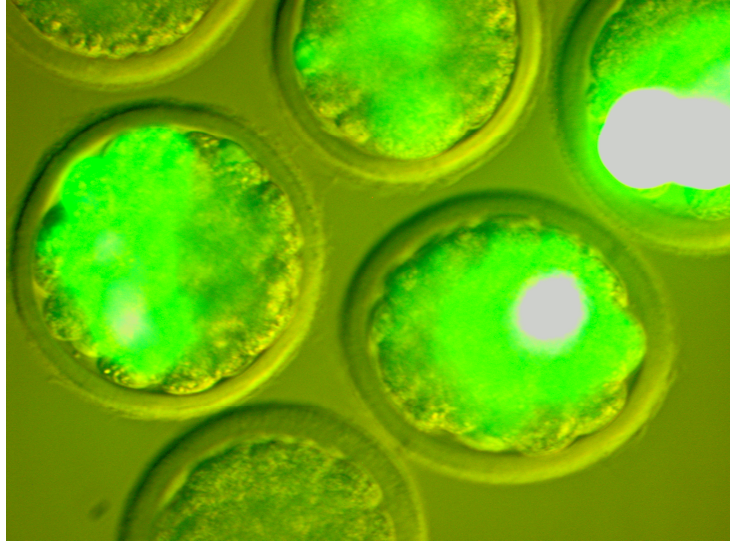
Şekil 4-7: 2. grupta elde edilen bir blastosist



Şekil 4-8: 2. grupta elde edilen blastosistin eGFP ışımaya görüntüsü



Şekil 4-9: Morula aşamasına gelmiş embriyolar



Şekil 4-10: Morula aşamasındaki embriyoların eGFP ışınmaları

5. TARTIŞMA

Büyük çitlik hayvanları üzerinde biyoteknolojik çalışmalar yapmak çeşitli faktörlere bağlı olarak laboratuvar hayvanlarına nazaran daha çok çaba gerektirmektedir. Bu faktörlerin başında oositlerin elde edildiği temel kaynak olan mezbahalar gelmektedir. Ülkemizde de ne yazık ki mezbahalarda kesilen kuzuların çoğunlukla prepubertal yaşta olması özellikle embriyo elde etmek için *in vitro* maturasyonun mecburi olduğu çalışmalarda dünyada olduğu gibi çeşitli negatif etkilere neden olmaktadır (99). O'Brien ve ark. (100), koyunlarda yapılan bir çalışmada prepubertal ve erişkin koyunlardan aldıkları oositlerin *in vitro* ve *in vivo* gelişimlerini incelemiş ve prepubertal oositlerin yetişkin oositlerine göre istatistiksel anlamda önemli olacak şekilde daha düşük blastosist dönemine geliştiklerini saptayarak ve bunu prepubertal hayvanlardan alınan oositlerin *in vitro* maturasyona ve fertilizasyona alındığında hormonlara ve diğer follüküler maddelere uygun olmayacak şekilde maruz kalmaları sonucu anormal gelişim gösterebilecek olmalarına bağlamıştır. Bunu destekleyici olarak Morton ve ark. (101) tarafından yapılmış bir çalışmada ise istatistiksel fark bulunmaksızın prepubertal oositlerde *in vitro* fertilizasyon yapıldığında, bölünme oranlarının daha düşük olduğu ve blastosiste ulaşmada daha geç kaldıklarını tespit edilmiştir.

Çalışmada ICSI yöntemi kullanılarak elde edilen koyun blastosistlerinin sayıca düşük olmasınai gerek mezbahadan getirilen oositlerin kalitesi (ağırlıklı olarak prepubertal veya peripubertal hayvan kesimleri nedeniyle) gerekse laboratuvarında yaşanan aksaklıklar neden olmuştur. Kullanılan koyun oositlerinin % 67.14'ü yarıklanmıştır, kontrol grubunda kullanılan oositlerdeki %50.90 yarıklanma oranıyla karşılaştırıldığında bu oranın düşük olmadığı tespit edilmiştir.

ICSI yöntemiyle döllenmiş koyun oositlerinin aktivasyonu için kullanılan yöntem (ICSI prosedürünü takiben aktivasyonların uyarılması için 5 µg/mL Ionomisin içerisinde 5 dakika boyunca bekletilen oositlerin %2 östrus koyun serumu içeren BSOF kültür damlalarına aktarılması) ile genellikle kullanılan ionomisin + 6-DMAP yöntemine göre bölünme ve gelişim açısından bir gerilik saptanmamıştır. Sığırlarda uygulanan bir çalışmada bu iki yöntem arasında çok ciddi bir fark olmadığı bildirilmiştir (102). Bu

yöntem klasik koyun *in vitro* fertilizasyon prosedürlerinin aktivasyon protokollerinin ICSI ile gen transferi için modifiye edilmiş halidir. Özellikle gruplar içinde en iyi olduğu tespit edilen grupların birbirleriyle karşılaştırıldığında embriyo gelişimi ve blastosiste ulaşım açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadığı görülmüştür. Sığırlarda spermatozoon çapının insanlara nazaran daha büyük olmasının kullanılan enjeksiyon pipetlerinin çaplarının da büyük olmasına ve oolemmaya daha fazla hasar verilmesine neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sığır oositlerinin oolemmalarının elastik olması klasik ICSI prosedürü için zorluk oluşturmaktadır (99). Oositlerin lipit vakuollerinin fazlalığı içlerinin görünümünü zorlaştırır. Bu zorluk, oositlerin santrifüj edilmeleri ile giderilse bile bu işlemin oositlerin erken aktivasyonuna sebep olabileceği bildirilmiştir. Spermatozoonların immobilizasyonu için kullanılan PVP'nin gerek spermatozoonlar gerekse embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir. *In vitro* maturasyon sonucu elde edilen oositlerde glutatyon sentezinin bloke edilmesinin *in vitro* fertilizasyon sırasında pronükleer oluşumu ve appozisyonu etkilediği ve oositlerin kalitesinin ICSI yönteminin başarısında büyük payı olduğu bildirilmiştir (101).

Spermatozoa aracılığı ile transgenik hayvan üretimi birçok faktöre bağlıdır. Genellikle yapılan çalışmaların birbirlerinden farklı sonuçlar vermeleri kullanılan yöntemlerdeki çeşitli farklılıklardan meydana gelmektedir. Hayvan türünde spermatozoanın morfolojik yapılarının farklı olması nedeniyle farklı yöntemlerle birçok farklı sonuç elde edilmiştir. Moisyadi ve ark. (17) tarafından hamster gibi büyük akrozomlu spermatozoaya sahip türlerde ICSI yöntemi ile fertilizasyon yapıldığında, akrozomal enzimler nedeniyle oositin ölümüne varan sorunlar görülmesine rağmen, fare gibi türlerde Triton X-100 ve lizolesitin gibi kimyasallar kullanarak yaptıkları çalışmalarda böyle bir problemle karşılaşmadığı belirtilmiştir. Bu noktada spermatozoanın ekzojen DNA'yı içselleştirdiğine dair kanıtlar 1993 yılında Francolini ve ark. tarafından bildirilmiştir (94). SMGT yöntemi ile suni tohumlama yapılarak transgenik hayvan elde etme çalışmaları ile farklı çalışma gruplarında farklı türlerde farklı sonuçlar elde edilmiştir; koyunlarda ekzojen DNA ile inkübe edilmiş spermatozoayla herhangi bir başarı elde edilemese de domuzlarda %30 ve 36'lık başarılar bildirilmiştir (29,72,103).

Bacci ve ark.(104) domuzlarda yaptıkları çalışmada DNA ile muamele edilen spermada 5 dakikalık inkubasyon ile karşılaştırıldığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda motilitenin düştüğünü gözlemlemişlerdir.

ICSI yönteminde normal fertilizasyona kıyasla oositin hücre içinde meydana gelen Ca^{+} dalgalanmalarının daha geç gerçekleştiği bildirilmiştir (105). ICSI yönteminin 500 kb gibi büyük transgenlerin doğru ekspresyonu için kullanılan yegane yöntem olduğu bildirilmiştir (17).

ICSI transgenезis yönteminin konsantrasyonlar ve kullanılan teknikler doğrultusunda (IVF, motil ICSI, canlı-immotil ICSI, ölü immotil ICSI) incelendiği bir çalışmada ise eşit DNA miktarlarında en yüksek transgenik embriyo eldesinin sırayla IVF, canlı-immotil ICSI, ölü-immotil ICSI ve motil ICSI tekniklerinde görüldüğü bildirilmiştir (106). Ayrıca IVF tekniğinde transgen ekspresyonu göstermeyen embriyoların PCR analizlerinde % 79.6 oranında pozitiflik vermesinden ötürü şüphe götürür bir sonuç oluşturduğu, zonayı geçemeyip takılı kalan spermatozoanın pasif olarak PCR analizinde DNA'yı DNaz uygulamasından koruduğuna işaret ettiği bildirilmiştir (106).

Çalışmada ICSI yöntemi ile kullanılan spermatozoa motil spermatozoa olup en iyi oranları elde ettiğimiz soğutma grubunda spermatozoanın dondurup çözündürme işleminde aldığı DNA hasarı kadar hasar almadıklarının bir göstergesi olduğu düşünülmektedir.

Koyunlarda SMGT yönteminde kullanılacak olan plazmid DNA'nın konsantrasyonunun belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Çalışmada yapılan ön denemeler sonucunda 50 ng/ μ L konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir. Morerira ve ark.'ın (107) farelerde yaptıkları bir çalışmada gerek oositlerin canlılıklarını sürdürmeleri gerekse yavrularda transgenin ekspresyonunun görülmesi açısından en iyi oran 15 ng/ μ L olarak belirlenmiş ve büyük yapıdaki gen konstraktlarının yüksek yoğunluklarda kullanılmasının prosedürü olumsuz etkilediği belirtilmiştir. Shadanloo ve ark.'ın (106) keçilerde SMGT üzerine yaptığı çalışmada 200 ng/ 10^6 spermatozoanın en yüksek transgenik embriyo oranını verdiğini bildirmiştir. McCarty ve Ward (93) tarafından farelerde yapılan bir çalışmada, 10-20 μ g/ μ L aralığında spermatozoon-ekzojen DNA inkübasyonunun denenmiş olduğu bildirilmiştir. Sunulan tez çalışmasında elektroporasyon grubunda denenen 125 ng/ μ L konsantrasyonun yarıklanma oranlarını

düşürdüğü, blastosist gelişim oranlarını olumsuz etkilediği ve istatistiksel anlamda önemli olarak yüksek ölçüde bir dejenerasyona sebep olduğu bulunmuştur. Campos ve ark. (86) tarafından sığırlarda nanopolimer kullanılarak yapılmış bir SMGT çalışmasında transfeksiyonda kullanılan ekzojen DNA'nın plazmid ya da lineer olmasının spermatozoanın DNA taşımada farklılık göstermediği; ancak linearize DNA'nın (1 µg) spermatozoanın canlılığında düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. Sunulan çalışmada ise plazmid DNA kullanımı tercih edilmiştir.

Carballada ve Espanda (92) tarafından farelerde spermatozoaya ekzojen DNA bağlanmasını etkileyen faktörlerin araştırıldığı bir çalışmada, Ca-Mg içeren basit çözeltilerde %80-95 oranları arasında bağlanmanın gerçekleştiği, Ca-Mg içermeyen PBS'te bu oranların biraz düşse dahi yakın sonuçların alınabileceği, sonikasyon ile membranlara zarar verildiğinde de bu oranın aynı kaldığı ve elektron mikroskopla spermatozoa incelendiğinde çoğunluğunun akrozomdan yoksun olduğunun görüldüğünü bildirmiştir. Bu veriler, sunulan tez çalışmasında hem spermatozoanın DNA ile inkübasyonunu gerçekleştirdiğimiz proteinsiz HSOF'un kullanılmasını hem de soğuk şoku ve Triton X-100 kullanıp plazma membranlarında oluşturulan hasarın akrozoma hasar vererek ekzojen DNA'yı akrozom enzimlerinden korumamızı sağladığını destekler niteliktedir.

Spermatozoanın plazma membranı SMGT çalışmaları için karşılaşılan bir engel olarak tanımlanmıştır (24). Farelerde spermatozoanın plazma membranlarına zarar vermek açısından dondurup çözündürme, Triton X-100 ve NaOH kullanılan Li ve ark. (76) tarafından yapılmış bir çalışmada aynı konsantrasyonlarda DNA kullanıldığında canlı transgenik embriyo eldesi açısından bakıldığında en yüksek oranı dondurulup çözündürme yönteminin verdiği diğer iki grubun aralarında istatistiksel olarak fark olmadığı ve ilk gruba göre daha düşük oranlara sahip oldukları bildirilmiştir. Bu sonuçlar sunulan tez çalışmasındaki Triton X-100 ve soğutma grupları kıyaslandığında aynı doğrultuda sonuçların elde edildiği görülmektedir. Garcia-Vazquez ve ark. (108) tarafından domuzlarda yapılmış bir çalışmada, Triton X-100 ile muamele edilen domuz spermatozoasında hızlı ve yavaş dondurma ile muamele görenlere oranla daha yüksek oranda ölü spermatozoa olduğu, blastosiste gelişen embriyoların ve transgenin ekspresyonunun görülme oranlarının ise diğer iki gruba göre daha düşük olduğu sağlanmış olup bu durum Triton X-100 maddesinin spermatozoon membranına hasar

vererek yüksek konsantrasyonlarda DNA bağlanmasına ve kimyasalın kendisinin embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin olabileceğine bağlanmıştır. Sunulan çalışmada ise bu maddeler plazmid DNA'nın spermatozoanın postakrozomal bölgesinde bulunan reseptöre bağlanabilmesi için plazma membranına hasar verilmesi amacıyla hem soğuk şoku hem de Triton X-100 maddeleri ile çalışılmış ve soğuk şoku grubunda gerek blastosist gerekse transgenik embriyo eldesinde istatistiksel yönden anlamlı olarak daha yüksek bir başarı elde edilmiştir (Tablo 4-9). Tian ve ark.(75)'in domuzlarda sperma hazırlığının ICSI yöntemi kullanılarak embriyo gelişimi üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada Triton X-100 kullanımını kriyoprotektan madde kullanılmaksızın bir kez dondurup çözündürme ile kıyasladığında yarıklanan embriyo açısından daha yüksek yüzdeye sahip olduğu, ancak blastosist eldesi açısından bakıldığında istatistiksel yönden aralarında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir.

Elektroporasyon denemelerinde koç spermatozoasının kullanıldığı çalışmalar temel alınarak ilk etapta uygulama tekniği geliştirilmiştir. Denemeler sonucunda elektrik akım şiddeti ve spermatozoa konsantrasyonu tespit edildikten sonra oluşturulan 0.25 ng/μL, 50 ng/μL ve 125 ng/μL DNA konsantrasyonlarında deneme grupları oluşturulmuştur. Blastosiste ulaşma, elde edilen transgenik embriyo oranı ve embriyolardaki transgenik etkinlik açısından bakıldığında 50 ng/μL grubunun en yüksek sonucu verdiği belirlenmiştir (p<0,05).

Özellikle hücre hatlarının transfeksiyonunda kullanılan elektroporasyon yöntemi ile SMGT birçok türde denenmiş, belli bir düzeyde başarı elde edilmiştir (68,103,104). Sun (109) tarafından keçilerde uygulanmış bir SMGT-elektroporasyon çalışmasında 0, 300, 600, 900 ve 1200 V, 1.25 μsn, 2 μg/ml plazmid DNA ve 0.4 mL sperm+DNA karışımı ile 4 mm aralıklı elektroda sahip elektroporasyon kuvvetlerinde elektroporasyon yapıldığında spermatozoanın ekzojen DNA bağlamalarında sırayla %33, 65, 91, 90 ve 100 oranları bulunmasına rağmen bu voltajlarda elde edilen motilite değerleri sırayla %52, 53, 25, 13 ve 0 bulunmuş ve 1200 V grubundaki embriyoların biyopsisi ile FISH analizinde bu gruptaki embriyolarda %25'lik pozitif değer çıkmış olduğu bildirilmiştir. Bunu destekler nitelikte Simoes ve ark. (110) sığırlarda elektroporasyon yöntemini kullanarak yaptıkları bir SMGT çalışmasında kullanılan voltajın artmasının blastosist oranlarını düşürdüğü bildirilmiştir. Sunulan tez çalışmasında koç spermatozoasında 600, 900 ve 1200 V'luk voltaj değerleri denendiğinde spermatozoanın ICSI için kullanılamaz

halde oldukları görülmüştür. Bu yüzden sperma üzerinde gerçekleştirilen uygun akım şiddeti ön denemelerinde 250, 300, 400, 600 V akım şiddetleri kullanılmış ve elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak belirlenen 250 V 1 ms değerlerinde elektroporasyon uygulamasının en iyi motilite değeri vermesi nedeniyle transgenik çalışmalarda bu akım şiddeti kullanılmıştır.

Horan ve ark.'nın (81) domuz spermatozoasında yaptıkları bir çalışmada, motil spermatozoanın %75'inin post-akrozomal kısmında ekzojen DNA'yı taşıdıkları bildirilmiştir. Gagne ve ark. (111) tarafından boğa spermatozoasının elektroporasyon yöntemi ile transfekte edilmesini araştırdıkları çalışmada (dondurulmuş spermatozoon kullanıldığından sağlıklı bir kıyaslama olarak kabul edilmese de) gerek elektroporasyonun TALP medyumunda yapılması (mannitol medyumunu ve mannitol içeren TALP medyumunda spermatozoanın öldüğü belirtilmiştir) gerekse IVF yapıldığında fertilizasyon oranlarının %55 olması açısından bu yöntemin etkin olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da 3 mg/ml BSA Fraksiyon V ilave edilmiş Ca-Mg Free PBS elektroporasyon için tercih edilmiştir. Çalışmada 50 ng/ μ L elektroporasyon grubunda ICSI sonrası yarıklanmış oosit yüzdesinin %76.78 olması ve blastosist oranının en yüksek bu grupta elde edilmiş olması Gagne ve ark.'nın (111) çalışmalarında elde ettikleri bulguları destekler niteliktedir.

Garcia-Vazquez ve ark.(108) tarafından yapılmış olan domuz spermatozoasının ekzojen gen taşıması ile ilgili bir çalışmada, hızlı soğutmada kademeli soğutmaya oranla ölü spermatozoa oranını artırmış olmasına rağmen, DNA'nın spermatozoaya bağlanma oranının istatistiksel olarak anlamlı olacak bir şekilde arttığı ve yarıklanma oranlarının benzerlik göstermesine rağmen kademeli soğutmanın blastosist gelişim oranını yükselttiği, hızlı soğutmanın ise transgenin ekspresyonunu neredeyse iki kat daha yükselttiği bildirilmiştir. Sunulan çalışmada ise koç spermatozoasının plazma membranlarına ciddi derecede hasar veren bir yöntem ile soğutulan spermatozoa kullanılmış ve gerek blastosist gelişimi gerekse transgeniklik açısından diğer gruplarla karşılaştırıldığında (elektroporasyon grubu hariç) anlamlı derecede yüksek yüzdeler elde edildiği görülmüştür. Pereyra-Bonnet ve ark. (72) tarafından koyunlarda yapılmış olan SMGT çalışmasında olduğu gibi birçok çalışmada, dondurulmuş çözündürülmüş spermatozoa kullanılmış ve çalışmalarında 0.5 μ g/ 10^6 spermatozoa konsantrasyonunda

kullanılan plazmid DNA ile inkübasyon sonucunda yapılan ICSI işlemi ile elde edilen blastosistlerden %91.6'sında transgenik etkinlik saptandığı bildirilmiştir.

Yin ve ark. (112) tarafından rodentlerde polikatyonik lipozomlarla yapılmış bir SMGT çalışmasında elde edilmiş olan transgenik yavru eldesinin düşüklüğü (%0.5-4) spermatozoanın hazırlığı sırasında yaşanmış olabilecek problemlere ve seminal sıvıdan kalıntı kalmasıyla inhibitör faktörlerin etkisine bağlanmıştır. Lai ve ark. (82) domuzlarda lipofectin kullanarak yaptıkları bir SMGT çalışmasında, IVF ve ICSI yöntemlerini kullanarak %30 oranında transgeni eksprese eden embriyo elde edildiği bildirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan Lipofectaminin dört farklı DNA konsantrasyonu kullanılan gruplardan 10 µg (33,33ng/µL) grubu transgenik etkinlik açısından en yüksek grup olmasına rağmen, gerek embriyoların dejenerasyonu gerekse fragmentasyon açısından diğer gruplardan yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). Bu durumun yüksek miktarda DNA taşımada kullanılan Lipofectamin miktarının da artmasından kaynaklandığı ve bunun koyun embriyolarının gelişiminde negatif etki yapmasının bir göstergesi olduğu fikri ortaya çıkmıştır. Diğer taşıt maddeler arasında incelendiğinde lipofectamin grubunun transgeniklik yüzdesi açısından 10 µg (10 ng/µL) Turbofect grubundan sonra ikinci en yüksek yüzdeyi vermesine karşın ($p>0.05$), dejenerasyon açısından 6 kat daha düşük olduğu, bu yüzden embriyo gelişimi açısından daha az negatif etkisi olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

Sığırlarda yapılmış bir çalışmada hem lipozomlarla yeni bir transfeksiyon ajanı olan FuGen6 kullanılarak karşılaştırılmış ve her iki maddenin de spermatozoaya DNA bağlanmasını sırayla 15-27 ile 50-120 kat artırdığı bildirilmiş, lipozomların kullanıldığı durumda yüksek konsantrasyondaki plazmidlerin miseller içinde hapsedilmelerinin bağlanan plazmid sayısını düşürdüğü ve FuGen6 ile yapılan SMGT'nin transgenik embriyo üretiminde daha etkin bulunduğu iddia edilmiştir (113). Çalışmamızda kullandığımız Turbofect (10 ng/µL) grubu diğer taşıt madde grupları ile kıyaslandığında en yüksek transgenik embriyo yüzdesini vermiş olsa da dejenerasyon açısından Aminoester alt grubu ile beraber en yüksek orana sahip olduğundan embriyo gelişimi üzerine negatif etkide bulunduğu olarak yorumlanabilir.

Campos ve ark. (83) tarafından sığırlarda nanopolimer kullanılarak yapılmış bir SMGT çalışmasında lipofectamin, NanoFect ve Halloysite Nanotüpleri kullanılmış ve lipofektamin diğer iki gruba göre hem transgenin ekspresyonu hem de embriyo gelişimi

açısından daha zayıf kalmıştır. Çalışmamızda kullanılan Lipofektamin grubu nanopartikül taşıyıcı gruplar ile karşılaştırıldığında transgenik etkinlik ve embriyo gelişimi açısından daha üstün, sadece yarıklanma açısından Mg ve Ca LDH gruplarından daha düşük olduğu saptanmıştır.

At spermatozoasının Lipofectamin™ 2000 ile transfekte edildiği Ball ve ark.'nın (114) çalışmasında lipofectamin kullanımının spermatozoaya ekzojen DNA bağlanmasını arttırdığı bildirilmiştir.

Shemesh ve ark. (71) sığırlarda yaptıkları bir çalışmada REMI kullanılarak ST yöntemi ile transgenik yavrular elde edildiği (%66.66), aynı yöntemin tavuklarda kullanıldığında % 83'lük transgeniklik yüzdesi elde edildiğini ve hem IVF hem de ST yöntemlerinin bu teknik ile kullanıldıklarında ile etkin yöntemler oldukları bildirilmiştir.

Transgenik başarının Gordon (15) tarafından bir DNA molekülünün oositin sitoplazmasına girdikten sonra aktarılan genin konakçı DNA'ya giriş öncesi veya sonrasında bu gen konstraktının fragmente olup olmamasına bağlandığı bildirilmiştir.

SMGT yönteminin başarılı bulunduğu kadar Eghbalsaied ve ark.(115) tarafından SMGT'yi IVF tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada olduğu gibi yetersiz bulunduğu çalışmalar da mevcuttur .

Yapılan çalışmada tüm grupların sonuçları ele alındığında; ICSI işleminden sonra dejenere olan embriyo oranları açısından 2, 8, 12, ve 17. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemesine rağmen ($p>0,05$) 2. grubun önemli derecede 13, 15, 18, 20, 22 ve 23. gruplarla arasında önemli fark olduğu ($p<0,05$), ve bu gruplara kıyasla 2. grupta daha düşük oranda dejenerasyon görülmesi dikkat çekici bulunmuştur. Yüksek dejenerasyonun diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı fark ifade ettiği ($p<0,05$) 13, 15, 22 ve 23. gruplarda önceki gelişim evrelerindeki verilere bakıldığında bu durumun beklenen bir durum olduğu anlaşılmaktadır.

Yarıklanma oranları açısından elektroporasyon grubu olan 2. grup ile Mg ve Ca LDH gruplarının (sırayla 18 ve 20) Turbofect grubuna kıyasla hem istatistiksel hem de oransal açıdan en yüksek değerleri sağlamış olmaları ($p<0,05$), bu yöntemlerin yarıklanma üzerine herhangi bir olumsuz etkisi olmadığını düşündürürken kontrol grubunda (23.grup) düşük yarıklanma oranları, kullanılan spermatozoanın ve oositlerin kalitesi ile ilgili sıkıntıların yaşanabileceğini düşündürmektedir. Özellikle Turbofect

grubunun Lipofectamin ile Mg-LDH ve Ca-LDH grupları ile kıyaslandığında oldukça dikkat çekici düzeyde düşük yarıklanma göstermesi ($p>0,05$), Turbofect'in embriyo yarıklanma üzerine olan etkisinin olumsuzluğuna dikkat çekmiştir.

Embriyolarda gözlemlenen fragmentasyon olayının aktarılan gen miktarı ve gen taşıyıcı maddesine bağlamak mümkün gibi gözükse de, bulgular ışığında sadece 2. grupta aralarında anlamlı fark tespit edilen 17 ve 23. grupların diğerleri ile aralarındaki farkın önemsiz olması, diğer bulgularla uyumlu olarak, daha fazla DNA taşıyabilmek için yüksek miktarda Turbofect konsantrasyonunun kullanıldığı gruptaki gelişimde yaşanan aksaklıkların kontrol grubunda da benzer olması bu durumun rastlantısal olduğunu teyit etmektedir. Fragmentasyonlar hangi aşamadan sonra gerçekleşirse gerçekleşsin istenmeyen bir durum olduğundan, yüksek fragmentasyon değerlerini veren gruplar olan 8, 13, 18 ve 23. gruplar bu aşamada çalışmamızda şüpheyle yaklaştığımız gruplar olmuştur. Soğutma grubu olan 8. grubun bu Turbofect grubu olan 15. gruptan istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bir şekilde yüksek fragmentasyon değeri vermesi şaşırtıcı görünse de diğer Turbofect grubu olan 13. grupta da arasında istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) fark görülmesi bu sonuçların yöntemle ilgili olmayabileceği düşüncesine yöneltilmektedir.

Blastosist evresine ulaşımda gruplar arasında farklılık görülmemesinin ($p>0,05$) kullanılan yöntemlere bağlı olmadığı ve oosit kalitelerinin ya da laboratuvar kökenli sorunlardan ileri geldiği düşünülmektedir.

Çalışmanın temel amacını meydana getiren transgeniklik ve transgenik etkinlik açısından gruplar arasında bulunan farklar incelendiğinde, 2 numaralı elektroporasyon grubunun 12, 13, 15, 17, 18, 20, 22 numaralı gruplardan istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) derecede daha iyi, 8 numaralı soğutma grubundan ise istatistiksel açıdan önemli olamamasına ($p>0,05$) rağmen yüzde oran bakımından daha yüksek bulunduğu transgenik etkinlik açısından 8. grup hariç diğer tüm gruplardan anlamlı bir fark ($p<0,05$) ile çok daha üstün bulunduğu saptanmıştır. Çalışmada tamamen transgenik elde edilen tek blastosistin bu grupta elde edilmesi bu verileri destekler niteliktedir.

Sonuç olarak; çalışmada tüm kullanılan yöntemler içinde koyunlarda SMGT yöntemi ile yapılacak transgenik embriyo üretimi çalışmalarında koç spermatozoasının 25 ng/ μ L konsantrasyonda pDNA (eGFP) içeren Ca- Mg- Free PBS ortamında 1 ms süre ile 250 V akım verilerek transfekte edilmeleri ve bu spermatozoanın ICSI yöntemi ile kullanılarak yüksek oranlarda transgenik embriyo üretilebileceği savunulabilir.

KAYNAKLAR

1. Keefer CL. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim Reprod Sci* 2004; **82-83**: 5-12.
2. Houdebine LM. Transgenic Animal Models in Biomedical Research. İçinde Sioud M, editör. *Methods in Molecular Biology* Humana Press: Totowa; pp 163-192.
3. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microb* 2009; **32**: 107-121.
4. Niemann H, Kues W ve Camwath JW. Transgenic Farm Animals: Present and Future. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz* 2005; **24**: 285-298.
5. Garrels W, Ivics Z ve Kues WA. Precision genetic engineering in large mammals. *Trends Biotechnol* 2012; **30**: 386-393.
6. Gandolfi F. Sperm -Mediated Transgenesis. *Theriogenology* 2000; **53**: 127-137.
7. Smith K ve Spadafora C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays* 2005; **27**: 551-562.
8. Cosgrove DE, Chakraborty AK ve Hodgson CP. Transgenic animal models and gene therapy. *Expert opin Ther Pat* 1994; **4**:237-245.
9. Smith KR. Sperm cell mediated transgenesis. A review. *Anim Biotechnol* 1999; **10**: 1-13.
10. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Paltimer RD ve Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985; **315**:680-683.
11. Schnieke AE ve ark. Human factor IX transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts. *Science* 1997; **278**: 2130-2133.
12. Garcia-Vazquez FA, Ruiz S, Grullon LA, Ondiz A, Gutierrez-Adan A ve Gadea J. Factors affecting porcine sperm mediated gene transfer. *Res vet Sci* 2011; **91**: 446-453.
13. Bağış H ve Pabuccuoğlu S. Studies on Production of Transgenic mice. *Turk J Vet Anim Sci* 1997; **21**:287-292.
14. Ekici A, Aktopraklıgil D, Timur M, Akkoç T ve Bağış H, The Effect of Linear versus Circular Vector on Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) Expression in Transgenic Zebrafish (*Drario rerio*). *J Anim Vet Adv* 2010; **9**: 1238-1236.

15. Gordon IR. *Reproductive Technologies in Farm Animals*. Wallingford, UK: CABI Pub.2004. pp.282-291.
16. Niemann H ve Kues WA. Transgenic Farm Animals: Present and Future. *Reprod Fert Develop* 2007; **19**: 762-770.
17. Moisyadi S, Kaminski JM ve Yanagimachi R. Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. *Comp Immunol Microb* 2009; **32**:47-60.
18. Vasquez-Salat N ve Houdebine LM. Will GM animals follow GM plant fate? *Transgenic Res* 2013;**22**:5-13.
19. Vasquez-Salat N, Salter B, Smets G ve Houdebine LM. The current state of GMO governance: Are we ready for GM animals?.*Biotechnol Adv* 2012; **30**:1336-1343.
20. Bellingham JK. First US approval for a transgenic animal drug. *Nat Biotechnol* 2009; **27**:302-30421.
21. Cooper CA, Nelson KM, Maga EA ve Murray JD. Consumption of transgenic cows' milk containing human lactoferrin results in beneficial changes in the gastrointestinal tract and systematic health of young pigs. *Transgenic Res* 2013;**22**:571-578.
22. Duranthon V, Beaujean N, Brunner M, Odening KE, Santos AN, Kacskovics I, Hiripi L, Weinstein EJ ve Bosze Z. On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Res* 2012;**21**:699-713.
23. Prather RS, Lorson M, Ross JW, Whyte JJ ve Walters E, Genetically Engineered Pig Models for Human Diseases. *Annu. Rev Anim Biosci* 2013; **1**:203-219.
24. Celebi C, Guillaudeux T, Auvray P, Vallet-Erdtmann V ve Jegou B. The making of 'Transgenic Spermatozoa'. *Biol Reprod* 2002; **68**:1477-1483.
25. Ishii A., Vinuela F., Murayama Y., Yuki I., Nien Y.L., Yeh D.T., Vinters H.V. Swine Model of Carotid Artery Atherosclerosis: Experimental Induction by Surgical Partial Ligation and Dietary Hypercholesterolemia. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; **27**:1893-1899.
26. Lieschke GJ ve Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007; **8**:353-367.
27. Klymiuk N, Böcker W, Schönitzer V, Bahr A, Radic T, Fröhlich T, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Schilling E, Herbach N, Wanke R, Nagashima H, Mutschler W, Arnold GJ, Schwinzer R, Schieker M ve Wolf E. First inducible transgene expression im porcine large animal models. *Faseb J* 2012; **26**:1086-1099.

28. Garkavenko O, Wynyard S, Nathu D, Quane T, Durbin K, Denner J ve Elliot R. The first clinical xenotransplantation trial in New Zealand: Efficacy and safety. *Xenotransplantation* 2012;**19**:2-22.
29. Lavitrano M, Stoppacciaro A, Bacci ML, Forni M, Fioretti D, Pucci L, Di Stefano C, Lazzereschi D, Rughetti A, Caretta S, Zannoni A, Rahimi H, Moioli B, Rossi M, Nuti M, Rossi G, Seren E, Alfani D, Cortesini R ve Frati L. Human Decey Accelerating Factor Transgenic Pigs for Xsenotransplantation Obtained by Sperm-Mediated Gene Transfer. *Transpl P* 1999;**31**:972-974.
30. Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ, Plante C, Poolard JW, Fan MZ, Hayes MA, Laursen J, Hjorth JP, Hacker RR, Phillips JP ve Forsberg CW. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol* 2001; **19**:741-745.
31. Forsberg CW, Phillips JP, . Golovan SP, Fan MZ, Meidinger RG, Ajakaiye A, Hillborn D ve Hacker RR. The Enviropig physiology, performance and contribution to nutrient management advances in a regulated environment: The leading edge of change in the pork industry. *J Anim Sci* 2003; **83**:E68-E77.
32. Saeki K, Matsumoto K, Kinoshita M, Suzuki I, Tasaka Y, Kano K, Taguchi Y, Mikami K, Hirabayashi M, Kashiwazaki N, Hosoi Y, Murata N ve Iritani A. Functional expression of a $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Pnas* 2004; **101**:6361-6366.
33. Wu X, Ouyang H, Duan B, Pang D, Zhang L, Yuan T, Xue L, Ni D, Cheng L, Dong S, Wei Z, Li L, Yu M, Sun Q, Chen D, Lai L, Dai Y ve Li G, Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. *Transgenic Res* 2012; **21**:537-543.
34. Golovan SP, Hayes MA, Phillips JP ve Forsberg CW. Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. *Nat Biotechnol* 2001; **19**:429-433.
35. Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, Sathiyaseelan J, Wu H, Matsushita H, Koster J, Kato S, Ishida I, Soto C, Robl JM ve Kuroiwa Y. Production of cattle lacking prion protein *Nature Biotechnology* 2007 **25**, 132 – 138.
36. Kragh PM, Nielsen AL, Li J, Du Y, Lin L, Schmidt M, Bogh IB, Holm IE, Jakobsen JE, Johansen MG, Purup S, Bolund L, Vajta G ve Jorgensen AL. Hemizygous minipigs

- produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res* 2009; **18**:545-558.
37. Jacobsen JC, Bawden CS, Rudiger SR, McLaughlan CJ, Reid SJ, Waldvogel HJ, MacDonald ME, Gusella JF, Walker SK, Kelly JM, Webb GC, Faull RLM, Rees MI ve Snell RG. An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet* 2010; **19**:1873-1882.
38. Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray Jr PB, Zabner J, Prather RS ve Welsh MJ. Disruption of the CFTR Gene Produces a Model of Cystic Fibrosis in Newborn Pigs. *Science* 2008; **321**:1837-1841.
39. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK ve Palmiter RD. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci* 1985; **82**:4438-4442.
40. Pereya-Bonnet F, Gibbons A, Cueto M, Sipowicz, Fernandez-Martin R ve Solomon D. Efficiency of Sperm-Mediated Gene Transfer in the Ovine by Laparoscopic Insemination, *In Vitro* Fertilization and ICSI. *J Reprod Develop* 2011; **57**:188-196
41. Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R ve Pelczar P. Recombinase-mediated transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2005; **64**:1704-1715.
42. Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E ve Pfeifer A. Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes. *Biol Reprod* 2004; **71**:405-409.
43. Shinohara ET, Kaminski JM, Segal DJ, Pelczar P, Kolhe R, Ryan T, Coates CJ, Fraser MJ, Handler AM, Yanagimachi R ve Moisyadi S. Active integration: new strategies for transgenesis. *Transgenic Res* 2007; **16**:333-339.
44. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE ve Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000; **405**:1066-1070.
45. Niu Y ve Liang S. Progress in gene transfer by germ cells in mammals. *J Genet Genomics* 2008; **35**: 701-714.

46. Freitas VJF, Seraoia IA, Moura RR, Andreeva LE, Melo LM, Teixeira DIA, Pereira AF, Lopes-Jr ES, Dias LPB, Nunes-Pinheiro DCS, Sousa FC, Alcantara-Neto AS, Albuquerque ES, Melo CHS, Rodrigues VHV, Batista RITP, Dvoryanchikov GA ve Serov OL. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Res* 2012;**105**:105-113.
47. Zhang Y, Xi Q, Ding J, Cai W, Meng F, Zhou J, Li H, Jiang Q, Shu G, Wang S, Zhu X, Gao P ve Wu Z. Production of Transgenic Pigs Mediated by Pseudotyped Lentivirus and Sperm. *Plosone* 2012; **7**:1-8.
48. Hiripi L, Negre D, Cosset FL, Kvell K, Czömpöly T, Baranyi M, Gocza E, Hoffmann O, Bender B ve Bosze Zs. Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. *Transgenic Res*. 2010; **19**:799-808.
49. Jacobsen JE, Li J, Kragh PM, Moldt B, Lin L, Liu Y, Schmidt M, Winther KD, Schyth BD, Holm IE, Vajta G, Bolund L, Callesen H, Jorgensen AL, Nielsen AL ve Mikkelsen JG. Pig transgenesis by Sleeping Beauty DNA Transposition. *Transgenic Res* 2011;**20**:533-545.
50. Suganuma R, Pelczar P, Spetz JF, Hohn B, Yanagimachi R ve Moisyadi S. Tn5 transposase-Mediated Mouse Transgenesis. *Biol Reprod* 2005;**73**:1157-1163.
51. Giraldo P ve Montoliu L. Size matters: the use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res* 2001; **10**:83-103.
52. Watanabe M, Kurome M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Shiota A, Nakauchi K ve Nagashima H. The creation of transgenic pigs expressing human proteins using BAC-derived, full-length genes and intracytoplasmic sperm injection-mediated gene transfer. *Transgenic Res* 2012; **21**:605-618.
53. Kukowska-Latallo JE, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomolia DA ve Baker Jr JR. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Sturbust polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci* 1996;**93**:4897-4902.
54. Sato T, Ishii T ve Okahata Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 2001;**22**:2075-2080.
55. Hirayabashi M, Kato M ve Hochi S. Transgenesis via Intracytoplasmic Sperm Injection(ICSI) in Rodents. *J Mam Ova Res* 2006;**23**:86-90.
56. GÖK MK. Doğal ve Sentetik Biyouyumlu Polimerik Nanopartiküler Gen Taşıyıcı Sistemlerin Elde Edilmesi Ve Transfeksiyon Etkinliğinin İncelenmesi. Doktora Tezi

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimyasal Teknolojiler Programı. Danışman, Prof. Dr. Saadet K. Pabuccuoğlu, İkinci Danışman, Doç. Dr. Erdal Cevher Ekim, 2012.

57. Jere D, Xu CX, Arote R, Yun CH, Cho MH ve Cho CS. Poly(β -amino ester) as a carrier for si/shRNA delivery in lung cancer cells. *Biomaterials* 2008; **29**:2535-2547.

58. Choi MK, Arote R, Kim SY, Chung SJ, Shim CH, Cho CS ve Kim DD. Transfection of primary human nasal epithelial cells using a biodegradable (ester amine) based on polycaprolactone and polyethylenimine as a gene carrier. *J Drug Target* 2007; **15**:684-690.

59. Jere D, Jiang HL, Arote YK, Choi YJ, Cho MH, Akaike T ve Cho CS. Degradable polyethylenimines as DNA and small interfering RNA carriers. *Expert Opin Drug Del.* 2009; **6**:827- 834.

60. Lou D ve Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 2000; **18**:33-37.

61. Kim TS, Lee SH, Gang GT, Lee YS, Kim SU, Koo DB, Shin MY, Park CK ve Lee DS. Exogenous DNA Uptake of Boar Spermatozoa by Magnetic Nanoparticle Vector System. *Reprod Domest Anim* 2010; **45**:201-206.

62. Shen W, Li L, Pan Q, Min L, Dong H ve Deng J. Efficient and Simple Production of Transgenic Mice and Rabbits Using the new DMSO-Sperm Mediated Exogenous DNA Transfer Method. *Mol Reprod Dev* 2006; **73**:589-594.

63. Ladewig K, Niebert M, Xu ZP, Gray PP ve Lu GQ. Controlled preparation of layered double hydroxide nanoparticles and their application as gene delivery vehicles. *App Clay Sci.* 2010; **48**:280-298.

64. Celebi C, Auvray P, Benvegna T, Plus-Quellec D, Jegou B ve Guillaudeau T. Transient Transmission of a Transgene in Mouse Offspring Following *In Vivo* Transfection of Male Germ Cells. *Mol Reprod Dev* 2002; **62**:477-482.

65. Smith KR. The role of sperm-mediated gene transfer in genome mutation and evolution. *Med Hypotheses* 2002; **59**:433-437.

66. Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays* 1998; **20**:955-964.

67. Zhao Y, Wei H, Wang Y, Wang L, Yu M, Fan J, Zheng S ve Zhao C. Production of Transgenic Goats by Sperm-mediated Exogenous DNA Transfer Method. *Asian-Aust J Anim Sci* 2010; **23**:33-40.
68. El-Gendy EA, Ahmed MM ve El-Tantawy SE. Development of transgenic chickens by sperm-mediated gene transfer. *Afr J Biotechnol* 2013; **12**:2755-2763.
69. Kouznetsov A. The rules of sperm- mediated gene transfer.
<http://www.rule110.org/amhso/results/gene-transfer.pdf>
70. Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Hayashi Y, Nakatsukasa E, Fuchimoto D, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, ve Kikuchi K. Viable Piglets Generated from Porcine Oocytes matured In Vitro and Fertilized by Intracytoplasmic Sperm Head Injection. *Biol Reprod* 2003;**68**:1003-1008.
71. Shemesh M, Gurevich M, Markowitz EH, Benvenisti L, Shore LS ve St ram Y. Gene Integration Into Bovine Sperm Genome and Its expression in Transgenic Offspring. *Mol Reprod Dev* 2000; **56**: 306-308.
72. Pereyra-Bonnet F, Gibbons A, Cueto M, Sipowicz P, Fernandez-Martin R ve Salamone D. Efficiency of Sperm-Mediated Gene Transfer in the Ovine by Laparoscopic Insemination, In Vitro Fertilization and ICSI. *J Reprod Develop* 2011; **57**:188-196.
73. Vargiolu A, Manzini S, de Cecco M, Bacci ML, Forni M, Galeati G, Cerrito MG, Busnelli M, Lavitrano M ve Giovannoni R. In vitro production of Multigene Transgenic Blastocysts via Sperm-mediated gene Transfer Allows Rapid Screening of Constructs to Be Used in Xenotransplantation Experiments. *Transpl P* 2010;**42**.2142-2145.
74. Canovas S, Guitierrez-Adan A ve Gadea J. Effect of Exogenous DNA on Bovine Sperm Functionality Using the Sperm Mediated Gene Transfer (SMGT) Technique. *Mol Reprod Dev* 2010;**77**:687-698.
75. Tian JH, Wu ZH, Liu L, Cai Y, Zeng SM, Zhu SE, Liu GS, LI Y ve Wu CX. Effects of oocyte activation and sperm preparation on the development of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2006; **66**:439-448.
76. Li C, Mizutani E, Ono T ve Wakayama T, An Efficient Method for Generating Transgenic Mice Using Na-OH Treated Spermatozoa. *Biol Reprod* 2010;**82**:331-340.
77. Mehier-Humbert S ve Guy RH. Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliver Rev* 2005;**57**:733-753.

78. Gagne M, Francois P ve Sirard MA. The Use of Electroporated Bovine Spermatozoa to Transfer Foreign DNA into Oocytes. Nickoloff JA editör. İçinde , Methods in Molecular Biology, Vol.48, Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols, Humana press Inc.1995 pp:161-166.
79. Rieth A, Pothier ve Sirard MA. Electroporation of Bovine Spermatozoa to Carry DNA Containing Highly Repetitive Sequences Into Oocytes and Detection of Homologous Recombination Events. *Mol Reprod Dev* 2000;**57**:338-354.
80. Barry PA. Efficient Electroporation of mammalian Cells in Culture. Heiser WC. Editör. İçinde Methods in Molecular Biology, Vol:245, Gene Delivery to mammalian Cells: Vol:1 Nonviral Gene Transfer Techniques. Humana Press Inc.2004 pp:207-213
81. Horan R, Powell R, Bird JM, Gannon F ve Houghton JA. Effects of Electroporation on the Association of Foreign DNA With Pig Sperm. *Syst Biol Reprod Mec* 1992; **28**:105-114.59.
82. Lai L, Sun Q, Wu G, Murphy CN, Külholzer B, Park KW, Bonk AJ, Day BN ve Prather RS. Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into in vitro matured oocytes. *Zygote* 2001; **9**:339-246.
83. Campos VF, Moura de Laon PM, Komninou ER, Dellagostin OA, Deschamps JC, Seixas FK ve Collares T. NanoSMGT: transgene transmission into bovine embryos using hallosite clay nanotubes or nanopolymer to improve transfection efficiency. *Theriogenology* 2011;**76**:1552-1560.
84. Özgümüş S, Gök MK, Bal A ve Güçlü. Study on exfoliated polyampholyte nanocomposite hydrogels based on acrylic monomers and Mg-Al-Cl layered double hydroxide: Synthesis and characterization. *Chem Eng J* 2013;**223**:277-286.
85. Desigaux L, Belkacem MB, Richard P, Cellier J, Leone P, Cario L, Leroux F, Taviot-Gueho C ve Pitard B. Self-Assembly and Characterization of Layered Double Hydroxide/DNA Hybrids. *Nano Lett* 2006;**6**:199-204.
86. Campos VF, Komninou ER, Urriaga G, Leon PM, Seixas FK, Dellagostin OA, Deschamps JC ve Collares T. NanoSMGT: Transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. *Theriogenology* 2011;**75**:1476-1481.
87. Gandolfi F. Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. *Transgenic Res* 1998;**7**:147-155.

88. Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y ve Yanagimachi R. Mammalian Transgenesis by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Science* 1999; **284**:1180-1183.
89. Wang HJ, Lin AX ve Chen YF. Assosiation of Rabbit Sperm Cells Wiyh Exogenous DNA. *Anim Biotechnol* 2003; **14**:155-165.
90. Zani M, Lavitrano M, French D, Lulli V, Maione B, Sperandio S ve Spadafora C. The mechanism of Binding of Exogenous DNA to Sperm Cells: Factors Controlling The DNA Uptake. *Exp Cell Res* 1995; **217**:57-64.
91. Anzar M ve Buhr MM. Sponataneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. *Theriogenology* 2006;**65**:683-690.
- 92.Carballada R ve Esponda P. Regulation of Foreign DNA Uptake by Mouse Spermatozoa. *Exp Cell Res* 2001;**262**:104-113.
93. McCarthy S ve Ward SW. Interaction of Exogenous DNA With the Nuclear Matrix of Live Spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2000; **56**:235-237.
94. Francolini M, Lavitrano M, Lamia CL, French D, Frati L, Cotelli F ve Spadafora C. Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. *Mol Reprod Dev* 1993;**2**:133-139.
95. Horan R, Powell R, McQuaid S, Gannon F ve Houghton JA. Association of Foreign DNA with Porcine Spermatozoa. *Syst Biol Reprod Mec* 1991; **26**:83-92.
96. Kang JH, Halimov H, Ruiz A, Friendship RM, Buhr M ve Golovan SP. The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. *Theriogenology* 2008;**70**:1288-1296.
97. Bakırer G, Demir K, Cirit Ü, Bozkurt H, Aktaş A, Sandal Aİ, Özdaş ÖB, Ak K, Ağca Y, Birlir S, Pabuccuoğlu S. Investigation Of The Effect Of Osmotic Stress On Ram Semen By Casa And TEM. 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı) Bildiri Kitapçığı. 84-85.
98. Peura TT ve Vajta G. A Comparision of Established and New Approaches in Ovine and Bovine Nuclear Transfer. *Cloning Stem Cells* 2003;**5**:257-277.
99. Horiuchi T ve Numabe T. Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) In Cattle and Other Domestic Animals; Problems and Improvements in Practical Use. *J Mamm Ova Res* 1999;**16**:1-9.

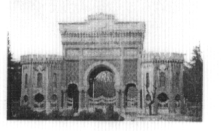
100. O'Brien JK, Catt SL, Ireland KA, Maxwell MC ve Evans G. In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* 1997;**47**:1433-1443.
101. Morton K, Catt SL, Maxwell WMC ve Evans G. In vitro and in vivo capabilities and kinetics of in vitro development of in vitro matured oocytes from adult, unstimulated and hormone-stimulated prepubertal ewes. *Theriogenology* 2005;**64**:1320-1332.
102. Bevacqua RJ, Pereyra-Bonnet F, Fernandez-Martin R ve Salamone D. High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. *Theriogenology* 2010;**74**:922-931.
103. Lavitrano M, Forni M, Varzi V, Pucci L, Bacci ML, Di Stefano C, Fioretti D, Zoraqi G, Moiola B, Rossi M, Lazzereschi D, Stoppacciaro A, Seren E, Alfani D, Cortesini R ve Frati L. Sperm-Mediated Gene Transfer: production of Pigs Transgenic for a Human Regulator of Complement Activation. *Transpl P* 1997;**29**:3508-3509.
104. Bacci ML, Zannoni A, De Cecco M, Fantinati P, Bernardini C, Galeati G, Spinaci M, Giovannoni R, Lavitrano M, Seren E, ve Forni M. Sperm-mediated gene transfer-treated spermatozoa maintain good quality parameters and in vitro fertilization ability in swine. *Theriogenology* 2009;**72**:1163-1170.
105. Morozumi K, Shikano T, Miyazaki S ve Yanagimachi R. Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. *PNAS* 2006;**103**:17661-17666.
106. Shadanloo, F, Najafi, MH, Hosseini, S M., Hajian M, Forouzanfar M, Ghaedi, K, Abedi P, Ostadhosseini S, Hosseini L, Eskandari-Nasab M-P and Esfahani MHN. Sperm status and DNA dose play key roles in sperm/ICSI-mediated gene transfer in caprine. *Mol Reprod Dev* 2010;**77**: 868–875.
107. Moreira PN, Perez-Crespo M, Ramirez MA, Pozueta J, Montoliu L, ve Gutierrez-Adan A. Effect of Transgene Concentration, Flanking matrix Attachment Regions, and RecA-Coating on the Efficiency of Mouse transgenesis mediated by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biol Reprod* 2007;**76**:336-343.
108. Garcia-Vazquez FA, Garcia-Rosello E, Gutierrez-Adan A, ve Gadea J. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology* 2009;**72**:506-518.

109. Sun Y. Caprine Sperm Cells As Vectors for Gene Transfer. Doktora Tezi. Louisiana State University, Agricultural and Mechanical Collage, Department of Animal Science, Mayıs 1997
110. Simoes R, Nicacio AC, Binelli M, Paula-Lopes FF, Milazzotto MP, Visintin JA ve Assumpção MEOD. Sperm-mediated gene transfer: effect on bovine in vitro embryo production. *Zygote* 2012;**Ekim**:1-5.
111. Gagne MB, Pothier F ve Sirard MA. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol Reprod Dev* 1991; **29**:6-15.
112. Yin J, Zhang JJ, Shr GG, Xie SF, Wang XF ve Wang HL. Sperm mediated human coagulation factor VIII gene transfer and expression in transgenic mice. *Swiss Med WKL* 2009;139:364-372.
113. Hoelker M, Mekchay S, Schneider H, Bracket BG, Tesfaye D, Jennen D, Tholen E, Gilles M, Rings F, Griese J ve Schellander K. Quantification of DNA binding, uptake, transmission and expression in bovine sperm mediated gene transfer by RT-PCR: Effect of transfection reagent and DNA architecture. *Theriogenology* 2007;**67**:1097-1107.
114. Ball BA, Sabeur K ve Allen WR. Liposome-mediated uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer. *Equine Vet J.* 2008; **40**:76-82.
115. Eghbalsaied S, Ghaedi K, Laible G, Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Oback F, Nasr-Esfahani MH ve Oback B. Exposure to DNA is insufficient for in vitro transgenesis of live bovine sperm and embryos. *Reproduction* 2013;**1**:97-108.

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



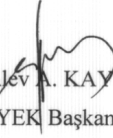
Sayı: 118


29/07/2010

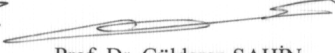
Sn. Prof. Dr. Serhat PABUÇCUOĞLU
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No: 118
Başvuru Tarihi: 14/07/2010

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Vet. Hek. Gül BAKIRER'e ait "Transgenik Embriyo Üretimi İçin Koç Spermatozoonlarının Farklı Yöntemlerle Transfekte Edilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Alev A. KAYMAZ
İ. Ü. HADYEK Başkanı


Prof. Dr. Müjdat UYSAL
Üye


Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN
Üye

Prof. Dr. Nuriye AKEV
Üye

Prof. Dr. Alper YILMAZ
Üye


Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye


Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Avukat Safiye ALTUN
Üye

Mak. Müh. Seyfettin AVCI
Üye

İstanbul Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı
İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü 34119 Beyazıt-İSTANBUL
TEL : (0 212) 440 00 00/ 10013
E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gül	Soyadı	Bakırer Öztürk
Doğ. Yeri	Fatih	Doğ. Tar.	02.08.1984
Uyruğu	TC	TC Kim No	46456314834
Email	gulbakirer@yahoo.com	Tel	05362600464

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2007-
Yük.Lis.	-	-
Lisans	İ.Ü.Veteriner Fakültesi	2007
Lise	FMV Özel Işık Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araş.Gör.	İ.Ü.DETAE	2012-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	88,75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	72.339	70.079	66.272
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	iyi
Excell	iyi
Ppt	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Evecen, M., Cirit Ü., Demir K., Karaman E., Hamzaoğlu, A. İ., Bakırer, G.: Developmental Competence of Domestic Cat Oocytes From Ovaries Stored at Various Durations at 4 °C Temperature. Animal Reproduction Science 116:169–172, 2009.

Evecen,M.,Cirit,Ü.,Demir,K.,Karaman,E.,Bakırer,G.,Hamzaoglu,A.İ.,Birler,S.,Pabuccuoğlu, S.: Comparison of Two Different Media For In Vitro Production Of Dog Embryos.

The Journal of The Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas. 16 (6): 897-902, 2010.

Evecen,M.,Cirit,Ü.,Demir,K.,Karaman,E.,Bakırer,G.,Hamzaoglu,A.İ.,Birler,S.,Pabuccuoğlu, S.: Effect of Dog Oocyte Diameter on In Vitro Embryo Production. The Journal of The Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas 16 (6): 947-950, 2010.

Birler, S., Pabuccuoğlu, S., Demir, K., Cirit, U., Karaman, E., Bacınoğlu, S., Özdaş, Ö.B., Evecen, M., Alkan, S., Baran, A., Bakırer, G., Hamzaoglu,A.İ, Özcan, C., Koçak, Ö., Kılıçarslan, R., Kaşıkçı, G., Toydemir, S., Dinç, H., Koban, E., Togan, İ., İleri, İ.K., Ak, K: Production of Cloned Lambs: Transfer of Early Cleavage Stage Embryos to Final Recipients J. Fac. Vet. Med. İstanbul Univ.36 (1), 1-8, 2010.

Evecen, M., Cirit,Ü., Demir,K.,Hamzaoglu,A.İ, Bakırer,G., Pabuccuoğlu, S., Birler,S.: Adding hormones sequentially could be an effective approach for IVM of dog oocytes. Theriogenology, In Press, 2011.

Sunumlar:

Bakırer,G.,Demir,K.,Cirit,U.,Bozkurt,H.,Aktas,A., Özdas,B.Ö., Ak,K., Pabuccuoğlu,S. Soğutmanın ve Kriprotektan Maddelerle Oluşturulan Hiperosmotik Stresin Koç Spermatozoa Hareket Özelliklerine ve Ultrastrüktürel Yapısına Etkileri, 5. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Elazığ 2009, Sözlü sunum

Bakırer,G. Koç Spermatozoonlarının Taramalı Elektron Mikroskopunda İncelenmesi, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı 2010, Sözlü Sunum

Bakırer,G. Temel Hücre Kültürü Teknikleri,İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Şubat 2011, Sözlü Sunum

Bakırer,G.,Demir,K.,Cirit,U.,Bozkurt,H.,Aktas,A., Sandal,A.I., Özdas,B.Ö., Ak,K., Ağca,Y., Pabuccuoğlu,S. Osmotik Stresin Koc Spermata Üzerindeki Etkilerinin CASA ve Elektron Mikroskop Düzeyinde incelenmesi 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 2011, Bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmektedir. Proje numarası. 107 G 093 Sözlü sunumu.

Nur,Z., Birler,S., Üstüner,B., Zik,B., Bakırer,G., Alcay,S., Sagırkaya,H., Peker,S., Özdas,Ö.B., Pabuccuoğlu S. Liyofilize Koc Spermata Kullanarak intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu Yöntemi ile *In Vitro* Embriyo Üretimi, 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 2011, Poster sunumu.

Pabuccuoğlu,S., Birler,S., Öztürk,E., Bakırer,G., Demir, K., Arıcı, R., Evecen,M., Cirit Ü. MI ve MII Aflamaındaki Koyun Oositlerinin Konvansiyonel Kademeli Yavaş veya

Quartz Kapillar Kullanılarak Vitrifikasyon Teknikleriyle Uzun Süreli Dondurulması, 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 2011, Poster sunumu.

Evecen,M., Ciri,Ü., Demir,K., Sandal,A.İ., Bakırer,G., Birler,S., Pabuccuoğlu S. In-Vitro Köpek Embriyosu Üretimi Üzerine iki Farklı Medyumun Etkisi, 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 2011, Poster sunumu.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak.