



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUN'İ TOHURLAMA ANABİLİM DALI**

**İMLANTASYON ÖNCESİ FARE EMBRİYOLARINDAN
FARKLI BİYOPSİ TEKNİKLERİ İLE BİYOPSİ ÖRNEĞİ ALINMASI
SONRASINDA EMBRİYO GELİŞİMİNİN İN VİTRO VE İN VİVO İNCELENMESİ**

Ali Cihan TAŞKIN

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2012



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

İMLANTASYON ÖNCESİ FARE EMBRİYOLARINDAN
FARKLI BİYOPSİ TEKNİKLERİ İLE BİYOPSİ ÖRNEĞİ ALINMASI
SONRASINDA EMBRİYO GELİŞİMİNİN İN VİTRO VE İN VİVO İNCELENMESİ

Ali Cihan TAŞKIN

(DOKTORA TEZİ)

1.Danışman: Prof.Dr.Hakan SAĞIRKAYA
2.Danışman: Prof.Dr.Haydar BAĞIŞ

Bu çalışma TÜBİTAK KAMAG 107G027 Nolu proje tarafından desteklenmiştir.
Bursa

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	I
İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY).....	III
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
Farelerde Reprodüksiyon.....	3
Farelerden Embriyo Elde Yöntemleri.....	3
Süperovulasyon.....	3
İmplantasyon Öncesi Embriyoların Elde Edilmesi.....	4
Zigot Eldesi.....	4
İki Hücreli, Dört Hücreli, Sekiz Hücreli Embriyo ve Morula Embriyo Eldesi ...	4
Blastosist Eldesi.....	4
Embriyo Taşıyıcı Olarak Kullanılan Yalancı Gebe Farelerin Hazırlanması.....	5
<i>In Vitro</i> Embriyo Kültür	5
Prenatal (İmplantasyon) Öncesi Genetik Tanı (PGT).....	7
Embriyo Gelişimi.....	9
Oosit ve Embriyolarda Uygulanan Biyopsi Teknikleri	10
Kutup Hücre Biyopsisi.....	11
Kompaktlaşma Öncesi Embriyo Biyopsisi	12
1-Zona Delme Tekniği.....	13
A-Tirod Asidi	13
B-Lazer ile Delme	13
C-Bölgesel (Partial) Zona Diseksiyonu (PZD)	13
2-Blastomer Aspirasyon Tekniği	14
3-Trofektoderm Biyopsisi.....	15
GEREÇ ve YÖNTEM.....	16
Çalışmada Kullanılan Hayvanlar	16
Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	17
Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	18
Süperovulasyon Amacıyla Gonodotropinlerin Hazırlanması.....	20
PMSG (Pregnant Mare Serum Gonodotropin)	20
hCG (Human Chorionic Gonodotropin).....	21
Yıkama Medyumunun Hazırlanması	21
Kültür Medyumunun Hazırlanması	21
Biyopsi Medyumunun Hazırlanması	21
Verici Farelerin Süperovulasyonu	22
Süperovulasyon Programı.....	22

Embriyoların Elde Edilmesi.....	23
Blastomer Aspirasyon Biyopsisi.....	24
Trofektoderm Biyopsisi	26
Biyopsi Sonrası <i>İn Vitro</i> Kùltür	27
Toplam Hùcre Sayısının Florasan Boyama ile Belirlenmesi	27
Embriyoların Transferi	28
Sonuçların İstatistiksel Değerlendirmesi	29
BULGULAR.....	30
TARTIŞMA ve SONUÇ	34
KAYNAKLAR.....	41
TEŞEKKÜR.....	47
ÖZGEÇMİŞ	48

ÖZET

Bu çalışmada sekiz blastomerli fare embriyolarında aspirasyon biyopsisi ve sekiz hücre aşamasından *in vitro* gelişen blastosistlerde trofektoderm biyopsisi yapıldıktan sonra, manipüle edilen embriyoların *in vitro* gelişim oranları, kalite değerlendirmesi ve alıcı farelere transferden sonra *in vivo* implantasyon ve fetal gelişim oranları araştırıldı.

CB6F1 (C57BL/6 X BALB/C) dişi farelere 10 IU gebe kısrak serum gonadotropini (SIGMA- PMSG) intraperitoneal (i.p) enjeksiyonla uygulandı. Enjeksiyondan 48 saat sonra, 7,5 IU insan koriyonik gonadotropini (Organon-hCG) i.p. yolla verilerek süperovulasyon protokolü tamamlandı ve dişi fareler erkek CB6F1 (C57BL/6 X BALB/C) fareler ile çiftleştirildi. Süperovule dişiler hCG uygulamasından 68-72 saat sonra, sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen farelerin oviduktları HEPES tamponlu ve 3 mg/ml BSA ile takviye edilmiş HTF medyumumu ile yıkanarak 8 hücreli embriyolar elde edildi.

Biyopsi işlemleri içerisinde Ca^{2+}/Mg^{2+} bulunmayan HEPES tamponlu ve 3 mg/ml BSA + 5 µg/ml sitohalazin B içeren Quinn's HTF medyumununun 50 µl'lik damlalarında yapıldı. Blastomer ve trofektoderm biyopsi gruplarındaki embriyolar sırasıyla 48 saat ve 24 saat süre ile 4 mg/ml BSA içeren Quinn's blastosist medyumunda %5 CO₂, %5 O₂ ve 37°C yüksek nemli inkübatör içerisinde blastosist aşamasına kadar kültür edildi ve stereo mikroskop altında *in vitro* gelişim oranları değerlendirildi. Gelişen blastosistlerden bazılarında toplam hücre sayısı belirlenirken, bazılarıda alıcı CD-1 farelere transfer edildi ve 13-15 gün sonra *in vivo* gelişim oranları saptandı. Sonuçlar SPSS 17.0 istatistik programında bağımsız T-Testi ve ANOVA ile değerlendirildi.

Blastomer aspirasyon grubunda 152 ve kontrol grubunda 63 sekiz hücreli embriyo kullanıldı ve *in vivo* gelişimi değerlendirmek için blastomer grubundan 36 ve kontrol grubundan 30 embriyo transferi yapıldı. Trofektoderm grubunda 79 ve kontrol grubunda 28 blastosist kullanıldı ve *in vitro* kültür sonrası *in vivo* gelişimi değerlendirmek için, trofektoderm grubundan 32 ve kontrol grubundan 22 embriyo transferi yapıldı. Gelişen blastosistlerden bazıları floresan boyama tekniği ile boyandıktan sonra, toplam hücre sayıları belirlendi.

Blastomer biyopsi grubunda gelişim oranı %81,02 (121/152) ve toplam hücre sayısı 50 olarak saptanırken, kontrol grubunda ise gelişim oranı %96,37 (62/63) ve ortalama toplam hücre sayısı 50 olarak saptandı. Blastomer biyopsi ve kontrol gruplarının gelişim

oranları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Gelişen blastosistlerin toplam hücre sayıları karşılaştırıldığında da gruplar arasında benzer biçimde anlamlı bir farka rastlanmadı. Blastomer biyopsi grubunda uygulanan embriyo transferi sonucunda %25 (9/36) oranında implantasyon bölgesi saptandı ve bu bölgelerde %19,44 (7/36) oranında fetal gelişim saptandı. Kontrol grubunda yapılan embriyo transferi sonucunda ise %26 (8/30) oranında implantasyon saptandı ve bu bölgelerde % 20 (6/30) oranında fetal gelişim belirlendi. *In vivo* gelişimi değerlendirmek için yapılan embriyo transferi sonuçları karşılaştırıldığında, implantasyon alanları ve fetal gelişim oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmadı.

Trofektoderm biyopsi grubunda gelişim oranı %86,96 (69/79) ve toplam hücre sayısı 26,66 olarak saptanırken, kontrol grubunda gelişim oranı %93,33 (23/28) ve toplam hücre sayısı 55,33 olarak saptandı. Trofektoderm biyopsi ve kontrol gruplarının gelişim oranları arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Gelişen blastosistlerin toplam hücre sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$). Trofektoderm biyopsi grubunda yapılan embriyo transferi sonucunda %21,88 (7/32) oranında implantasyon bölgesi saptandı fakat bu bölgelerde fetal gelişim oluşumu gözlenmedi. Kontrol grubunda yapılan embriyo transferi sonucunda ise %59,09 (13/22) oranında implantasyon bölgesi saptandı ve bu bölgelerden % 18,18 (4/22) oranında fetal gelişim saptandı. *In vivo* gelişimi değerlendirmek için yapılan embriyo transferi sonuçları karşılaştırıldığında, implantasyon alanları bakımından gruplar arasında fark bulunmazken, fetal gelişim oranları bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu ($P<0,05$).

Çalışma sonucunda trofektoderm biyopsi grubunda *in vitro* gelişim ve *in vivo* implantasyon oluşumunun olumsuz etkilenmemesine karşın, *in vivo* fötal gelişim olumsuz yönde etkilenmiştir. Bunun olası nedeninin biyopsi sürecinde oluşan fazla sayıdaki hücre kaybı düşünülmektedir. Oysa, blastomer biyopsi grubunda fetal gelişim de dahil kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark bulunmadı. Dolayısıyla, erken gelişim döneminde yapılacak biyopsi işlemlerinin embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilemediği ve özellikle hızlı gelişen ve toplam hücre sayısı daha düşük olan fare gibi türlerde yapılacak biyopsi uygulamalarının erken gelişim dönemlerinde yapılmasının daha avantajlı olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Fare, embriyo kültürü, implantasyon öncesi genetik tanısı, biyopsi, embriyo transferi

SUMMARY

***In Vitro* and *In Vivo* Investigation of Embryo Development Following Biopsy with Different Techniques in Preimplantation Mouse Embryos**

In this study, *in vitro* development ratios, quality evaluation, *in vivo* implantation and fetal development ratios after transfer to foster mother mice of manipulated embryos were investigated following aspiration biopsy in eight blastomer mouse embryos and trophectoderm biopsy in blastocyst developed from eight cell stage embryos *in vitro*.

10 IU pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG) was intraperitoneally injected to female CB6F1 (C57BL/6 X BALB/C) mice and 48 hours later 7,5 IU human chorionic gonadotrophin (hCG) was also injected intraperitoneally to complete superovulation protocol. They were mated with male CB6F1 (C57BL/6 X BALB/C) mice. Superovulated female mice were approximately sacrificed 68-72 hours after hCG administration. Eight cell embryos were flushed from oviducts of sacrificed mouse with HTF (human tubal fluid) supplemented with HEPES and 3 mg/ml BSA.

All embryos were biopsied in 50 µl drops of Ca²⁺/Mg²⁺ free HTF medium containing HEPES + 3 mg/ml BSA + 5 µg/ml cytochalasine B. After biopsy, embryos were cultured for 24 and 48 hours in Quins blastocyst medium supplemented with 4 mg/ml BSA in %5 CO₂, % 5 O₂, and 37°C in humidified air for blastomere biopsy and trophectoderm biopsy groups, respectively. After culture period, *in vitro* development ratios of embryos were evaluated under stereo microscope. Some of the developing blastocysts were used to determine total cell number and some of them were transferred to the recipient CD-1 mouse to determine *in vivo* development ratios at the 13-15th day of pregnancy. Results were evaluated by independent T Test and ANOVA of SPSS 17.0 statistic program.

In blastomere aspiration and control groups, 152 and 63 eight cell embryos were respectively used. To evaluate *in vivo* development, 36 and 30 embryos at blastocyst stage were transferred from blastomere biopsy and control groups, respectively. In trophectoderm and control groups, 79 and 28 eight cell embryos were respectively used. To evaluate *in vivo* development, 32 and 22 embryos at blastocyst stage were transferred from trophectoderm biopsy and control groups, respectively. Some of developing

blastocysts were stained with fluorescent staining technique and total cell numbers were determined.

In blastomere biopsy and control groups, development rates and total cell numbers were determined as 81.02% (121/152), and 96.37% (62/63) and 50, and 50, respectively. There was not any significant difference between groups in terms of development ratios and total cell numbers. In blastomere biopsy and control groups, implantation region and fetal development rates were found as 25% (9/36), and 26% (8/30) and 19.44% (7/36), and 20% (6/30), respectively. No significant difference was observed between groups in terms of implantation region and fetal development rates.

In trophoctoderm biopsy and control groups, development rates and total cell numbers were found as 86.96% (69/79), and 93.33% (23/28) and 26.66, and 55.33, respectively. Although there was not any significant difference between groups in terms development rates, there was a significant difference between groups in terms of total cell numbers ($P<0.05$). In trophoctoderm biopsy and control groups, implantation region and fetal development rates were determined as 21.88% (7/32), and 59.09% (13/22) and 0% (0/32), and 18.18% (4/22), respectively. Although there was not any significant difference between groups in terms implantation region rates, there was a significant difference between groups in terms of fetal development rates ($P<0.05$).

As a result of this study, in trophoctoderm biopsy group, while *in vitro* development and *in vivo* implantation formation were not affected negatively, *in vivo* fetal development is negatively affected. As a possible reason for this, it is thought that lots of cell losses during biopsy happen. However, there was no significant difference between groups in blastomere biopsy and control groups including fetal development rates. Therefore, it was concluded that biopsy applied at early stage of embryonic development does not affect embryo development negatively and biopsy procedures applied at early developmental stages have more advantages especially in embryos developing faster with low number of total cell number such as mouse species.

Key Words: Mouse, embryo culture, preimplantation genetic diagnosis, biopsy, embryo transfer

GİRİŞ

Üreme biyoteknolojisi alanındaki çalışmalar daha fazla embriyo elde edilmesi, embriyoların uzun süre saklanması (kriyoprezervasyon), embriyo kültürü, embriyolarda genetik tanı ve embriyo transferi gibi konular üzerinde yoğunlaşmaktadır. Reprodüksiyon biyoteknolojisinde yer alan mikromanipülasyon teknikleri özellikle yardımcı üreme teknolojisi ve laboratuvar hayvanları ile tasarlanan araştırmalarda önemli bir yere sahiptir.

Hayvan modelleri üzerine ilk çalışmalar on dokuzuncu yüzyılda yapılmakla beraber, bu çalışmaların yayınlanması 1930'lu yılları bulmuştur. Söz konusu çalışmalardan elde edilen deneysel sonuçlar modern *in-vitro* fertilizasyon (IVF) uygulamalarının temelinin oluşturmuştur (1-3).

İmplantasyon öncesi embriyolarda genetik tanı amacıyla biyopsi için yeni yollar önerilmektedir. Memeli embriyo biyopsisi, çiftlik hayvanlarının embriyo cinsiyetinin belirlenmesi çalışmalarında ve özellikle insanlarda genetik kusurlu bebek doğmasının önüne geçebilecek çok önemli bir tekniktir. Memeli embriyo biyopsisi farelerde ilk kez 1959 yılında uygulanmıştır (4). Gardner ve Edwards (5), blastosist evresindeki tavşan embriyolarında uyguladıkları biyopsi işlemi ile cinsiyet tanımlaması yapmışlardır. Bu biyopsi türü teknik olarak fertilizasyon sonrası genetik materyalin analiz edilmesi temeline dayanmaktadır. Embriyo biyopsi tekniğinin tek başına embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkisi bulunmamaktadır. Fare (6), maymun (7) ve insan (8) embriyolarında yapılan biyopsi çalışmalarında bu sonuç ortaya konmuştur. Ayrıca Willadsen' de (9), blastomer aspirasyon tekniğinin kullanımını koyunlarda da göstermiştir.

Prenatal (implantasyon) öncesi genetik tanının (PGT) amacı, embriyoyu alıcılara transfer etmeden önce, bazı olası genetik hastalıkların ve cinsiyetin belirlenmesidir. Bu işlem çiftlik hayvanlarında başarılı sonuçlar vermiştir (10).

Günümüzde implantasyon öncesi hayvan ve insan embriyolarında, biyopsi ve sonrasında tek hücreden genetik analizler yapılabilmektedir. İmplantasyon öncesi genetik tanı tekniklerinin insanlarda uygulanması, embriyolarda olabilecek kalıtsal hastalıkların ve diğer birçok genetik durumun tanısına olanak sağlamaktadır (11).

Monk ve Handyside (12), fare embriyolarında yapılan blastomer aspirasyon biyopsi örneklerinde X geni ile ilişkili olarak cinsiyet tayini yapmışlardır. Kunieda ve arkadaşları

(13), farelerde implantasyon öncesi biyopsi örneklerinde, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniğini kullanarak Y kromozomuna spesifik diziler ile cinsiyeti belirlemiştir. Dört hücreli embriyolarda yapılan blastomer aspirasyon biyopsisi sonrası, tek hücreden trizomi tanısı yapılmıştır (14). Yu ve arkadaşları (15), yeni doğanlar için oluşabilecek nörodejeneratif hastalıkların erken tanısı için kullanılacak modelde blastomer aspirasyon tekniğini kullanmışlardır. Deoksiribonükleik asitin (DNA) moleküler analizi ile duchenne kas distrofisi ve hemofili A veya B gibi hastalıkların tanısı konulabilmektedir (16,17). Fare embriyolarında farklı gelişim dönemlerinde üst üste yapılan blastomer aspirasyon uygulamalarının *in vitro* embriyo gelişimi üzerine etkileri, ilk olarak Illmensee ve arkadaşları (10) tarafından gösterilmiştir. Fare embriyolarında biyopsi uygulaması mekanik yöntemler kullanılarak da yapılmıştır (18). Çiftlik hayvanlarında fertilizasyon sonrası embriyoya yapılan biyopsi sonrası cinsiyet seçimi yapılabilmektedir. Bu uygulama, ilerleyen zamanlarda işletmelerin üretim planlamaları açısından da stratejik bir öneme sahip olacaktır (19). Süt işletmesi için kaliteli bireylerden elde edilecek dişi yavrular çok önemli iken, etçi hayvan yetiştiren bir işletme açısından erkek yavrular daha büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, cinsiyeti belli yavru elde edilmesi, işletme planı açısından oldukça değerlidir.

Bredbacka ve arkadaşları, blastomer aspirasyon biyopsisi ve blastosist mikro bıçak biyopsisi (20, 21) uygulamasını sığır embriyolarında uygulamıştır. İmplantasyon öncesi embriyolardan yapılan biyopsinin uygulamada rutin hale gelmesinde ortaya çıkan yüksek giderler ile embriyolarda biyopsi sonrası elde edilen canlılık ve yavru elde etme oranları karşılaşılan önemli sorunlar olarak önümüze çıkmaktadır.

Sunulan çalışmanın amacı, implantasyon öncesi farklı gelişim dönemlerindeki fare embriyolarından (sekiz blastomerli ve blastosist aşamasındaki embriyolar) farklı biyopsi teknikleri ile biyopsi örneği alınması sonrası, embriyo gelişiminin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesidir. Embriyolarda biyopsi uygulaması fiziksel ve kimyasal yollar ile yapılmaktadır. Sunulan çalışmada fiziksel yöntemlerden, sekiz blastomerli embriyolara aspirasyon biyopsisi ve blastosistlere uygulanan trofektoderm biyopsisi ile örneğin alınması sonrası, kültür çalışması sonucunda *in vitro* gelişim oranları, kalitesi ve alıcı farelere embriyo transferleri sonrası embriyoların *in vivo* implantasyon oranları araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Farelerde Reprodüksiyon

Dişi fare üreme organı, bir çift ovaryum ve ovidukt, iki kornulu ve Y şeklinde bir uterus, kısa serviks ve musküler yapıdaki vajinadan oluşmaktadır (22). Puberteye ulaşma süresi ırka göre değişmekle beraber, genellikle 28. ile 49. günler arasında tamamlanır (23). Fareler poliöstrik hayvanlardır ve tüm yıl üreyebilme özelliğine sahiptirler (22, 24). Dişi farelerde puberteye ulaşmanın ilk belirtileri, vajinanın açılması ve kornifiye epitel hücrelerinin vajinal mikroskopide gözlenmesidir (25). Farelerde ovulasyon 4-5 günde bir oluşmakta ve karanlık periyot başladıktan sonra, 4-5 saat içinde ovulasyon gerçekleşmektedir. Fertilizasyon, çiftleşme sonrası gece yarısı oluşmaktadır (22, 24). Çiftleşme sonrası erkeklerin seminal plazmadan salgılanan sekresyonlarının koagüle olmasının ardından, süt beyazı görünümlü vajinal plaklar oluşur ve bu plaklar 16-24 saate kadar gözlenebilir. Gebelik süresi ortalama 19-21 gün sürmektedir (25).

Farelerden Embriyo Elde Etme Yöntemleri

Süperovulasyon

Süperovulasyon 6-8 haftalık dişi farelerin çiftleşmeden önce, ovulasyonlarının indüklenmesi aracılığıyla oositlerin sayısını artırmak için dişi farelere gonodotropinlerin uygulanması işlemidir. Uygulama sırasında folikül uyarıcı hormon (FSH) etkisine sahip olan ve follikülleri uyaran gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) ile çok sayıda follikülün gelişimi uyarılır. Gelişen folliküllerin ovulasyonun oluşması için lüteinleştirici hormon (LH) benzeri etkisi olan insan korionik gonodotropin (hCG) hormonu kullanılır (24, 26-31).

Süperovulasyon başarı oranları, kullanılan dişilerin ırkına, ağırlığına, yaşına ve gonadotropinlerin uygulama zamanı ile dozuna göre farklılıklar göstermektedir. Ayrıca, amaç oosit değil de embriyo elde etmek ise gonodotropin enjeksiyonlarından sonra çiftleşmeye alınan erkeklerin performansı ile oositlerin fertilize olmasına da bağlıdır (24, 26-30). Hayvan başına 5 IU (internasyonel ünite) PMSG intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonla uygulanır. PMSG uygulanmasından 48 saat sonra, olgunlaşmış foliküllerin ovulasyonunu sağlamak için ikinci gonodotropin olan hCG her bir hayvan için 5 IU i.p. yoldan uygulandıktan sonra, dişiler fertil erkeklerle çiftleşmeleri için bir araya getirilir (26-31).

İmplantasyon Öncesi Embriyoların Elde Edilmesi

Zigot Eldesi

Süperovule dişi farelerin vajinal plak göstermesini takiben, 0-12 saatlik zaman dilimi içerisinde servikal dislokasyon ile sakrifeye edilen dişilerin sağ ve sol oviduktları, kornu uteri ile birleşme yerine yakın bölgeden kesilerek çıkarılır. Oositlerin çevresindeki kumulus hücrelerini uzaklaştırmak için, hyaluronidazlı Hapes tamponlu M2 manipülasyon medyumu kullanılır. Elde edilen oviduktlar bu medyumun içerisine konular ve stereo mikroskop altında oviduktun ampulla bölgesi çok ince uçlu 2 adet göz cerrahi pensi yardımı ile yırtılarak kumulus hücreleri ile çevrili zigotlar elde edilir. Ağız toplama pipeti yardımı ile zigotlar enzimsiz M2 medyumuna alınarak 3 kez yıkanır ve yıkama sonunda biyopsi yapılana kadar M2 medyumunda bulunan küçük petri kabında gazsız inkubator içinde saklanır (24, 27).

İki Hücreli, Dört Hücreli, Sekiz Hücreli Embriyo ve Kompakt Morula Eldesi

Süperovule dişi farelerin vajinal plak göstermesini takiben, 20-68 saat içinde, ovidukt ve uterus yıkaması ile iki, dört, sekiz hücreli embriyo ve kompakt morula elde edilmektedir. İki hücreli embriyo elde etmek amacıyla, servikal dislokasyon ile sakrifeye edilen dişilerin, sağ ve sol oviduktları kornu uteri ile birleşme yerine yakın bölgeden kesilerek total olarak uterus ve ovidukt alınır ve M2 medyumunda dolu 25 gauge (ga)'lık insülin enjektörü ile yıkanır. Dört, sekiz hücreli ve kompakt morula aşamasındaki embriyoların eldesi içinse kornu uterilerin içerisi M2 medyumunda akışı sağlanarak yıkanır. Embriyolar ağız toplama pipeti ile yıkama medyumunda 3 kez yıkandıktan sonra, küçük petri kabına aktarılır (24, 27).

Blastosist Eldesi

Blastosist eldesi, süperovule dişi farelerin vajinal plak gözlenmesini izleyen 3,5. ile 4,5. günler arasında, dişilerin servikal dislokasyon aracılığıyla sakrifiye edilmesinden sonra, sağ ve sol uterus lumenine 25 ga'lık insülin enjektörü ile M2 medyumunda verilerak yıkanması ile gerçekleştirilir. Yıkama sonrası embriyolar ağız toplama pipeti ile 3 kez yıkandıktan sonra küçük petri kabına aktarılır ve manipülasyona kadar gazlı inkubator içinde saklanır (25, 27).

Embriyo Taşıyıcı Olarak Kullanılan Yalancı Gebe Farelerin Hazırlanması

Yalancı gebe fareler, vazektomize (infertil) erkekler ile doğal östrustaki dişilerin çiftleştirilmesi ile elde edilir. Uygulamada 7-10 haftalık genç erişkin dişiler kullanılır. Reprodüktif ve annelik özelliklerinden dolayı CD-1 farelerin taşıyıcı anne olarak kullanılması önerilir. İnfertil erkekler ile çiftleşen ve vajinal plak gözlenen bireyler yalancı gebe (psuedopregnant) olarak ayrılır ve alıcı olarak embriyo transferine hazırlanır. Çiftleşmesi vajinal plak gözlemi ile saptanmış alıcı bireylerde 0-0,5 gün içinde ovidukt içerisine embriyo transferi yapılır ve 2,5 ile 3,5. günler arasında ise alıcı dişilerde uterus içerisine embriyo transferi yapılır (24, 27).

***In Vitro* Embriyo Kültürü**

İmplantasyon öncesi aşamadaki fare embriyoları canlılıkları için elverişli ortamı sağlayan kültür ortamlarında gelişim gösterirler. Embriyolar kültür ortamlarındaki değişimlere karşı vücut dokularına bağlı olarak daha duyarlıdırlar (32). Embriyo üretimi için en önemli aşama, *in vitro* embriyo kültürü ve gelişim koşullarıdır. Embriyo kültüründe ticari olarak geliştirilmiş ve özel komponentlere sahip vasatlar (mediyumlar) kullanılarak *in vitro* memeli embriyonun gelişimi sağlanır (33).

Medyum içeriğinde yer alan maddeler (besleyici mineraller, protein kaynakları, serbest radikaller vb.), atmosfer koşulları (CO₂ ve O₂ oranları), ortam ısısı, medyumun osmotik basıncı, kültür damlalarının hacmi, embriyo manipülasyonu ve diğer bazı etkenler embriyo kültüründe embriyo gelişimini etkilemektedir (34, 35).

Son 50 yılda implantasyon öncesi fare embriyolarının kültürü için geliştirilmiş medyumlarda önemli ölçüde ilerleme kaydedilmiştir. Biggers tarafından, embriyo kültüründe gelişen *in vitro* embriyoların başarılı bir şekilde alıcı dişilerin ovidukt ve uteruslarına transferleri sonrası canlı yavrular elde edildiği bildirilmiştir (36).

İmplantasyon öncesi memeli embriyoları için farklı embriyo kültür medyumları kullanılmaktadır. Bunlar, çeşitli fare ırklarının ve onların F1 jenerasyonlarının embriyo gelişimini destekler. İnsan IVF kliniklerinde M16, T6, Earle's ve CZB kültür medyumları gibi değişik medyumlar kullanılmaktadır. Ayrıca, fare embriyolarının *in vitro* kültür edilmesi için KSOM, HTF ve P1 gibi değişik formülasyonlu medyumlar da geliştirilmiştir. Basit medyumlar aminoasitler açısından yetersizdir. Basit medyumlar, embriyo gelişimi

için önemli olan Na^+ , K^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , PO_4^{-3} ve Cl^- iyonlarını içermektedir. Bunlara ek olarak, medyumlara antibiyotik eklenmesi, bakteriyel kontaminasyon riskine karşı koruma sağlar. Protein kaynağı olarak serum veya albüminin medyumlara eklenmesi embriyoların plastik kanister veya pipetlere yapışmasını engeller ve embriyoları çeşitli olumsuzluklara karşı korur. Serum, mitokondrilerin yapısal hasarı ve enerji metabolizmasının bozulması sonucu embriyoda oluşabilecek zararlı etkilerin önlenmesi amacıyla kullanılmalıdır. Albumin, embriyo kültür medyumlarında makro moleküllerden en çok kullanılanıdır. Ayrıca bu medyumların içerisine çeşitli enerji kaynakları da eklenir (33, 37). Fare embriyolarının kültür medyumlarının başlıca enerji kaynağı piruvattır. Ayrıca, laktat iki hücreli ve daha ileri gelişim aşamalarındaki embriyolarda kullanılmaktadır (37).

Medyumun pH değeri (7,4) ile embriyo içerisindeki ortalama pH değeri (7,2) birbirinden farklıdır (33). İnkübatör içerisinde kullanılan medyumların pH değerlerini kendi kendine kontrol etmeleri tercih edilir. Özellikle laktik asit ve amino asitler gibi spesifik medyum bileşenleri pH değerini etkiler. Medyumdaki laktat yoğunluğu yükseldiğinde pH değeri düşebilmektedir.

CO_2 yoğunluğu bikarbonatla tamponlanmış medyumun pH değeri üzerinde direkt etkilidir. CO_2 'li ortamda bikarbonatla tamponlanmış medyum en az 4 saat boyunca bekletilerek pH değeri dengelenmelidir (33). Memeli embriyolarının *in vitro* kültür çalışmalarında %5-7 oranında oksijen yoğunluğu ile başarılı sonuçlar alınmıştır (33). Özellikle fare embriyo kültür çalışmalarında %5 O_2 düzeyi önerilmektedir (28-31).

Oosit ve embriyolar oda ısısındaki inkübasyondan sonra gelişimlerini sürdürebilseler de, hücrelerin iskelet yapılarının olumsuz etkilenmesinden dolayı, uzun süre dış ortamda bırakılmamaları gerekir (28, 33).

Karmaşık olarak sınıflandırılan embriyo kültür medyumları, doku kültürleri için tasarlanan ticari medyumlardır. Bunlara örnek olarak Ham's F10, TCM 199 ve α -MEM gibi medyumlar sıralanabilir. İçerik olarak amino asitler, vitaminler, nükleik asitler, metaller ve genellikle %5-20 oranında serum bulunmaktadır. Bu kültür medyumlarının, embriyo gelişimi üzerinde zararlı etkileri olduğundan kullanılması önerilmemektedir (33).

İmplantasyon Öncesi Genetik Tanı (PGT)

PGT, insan ve veteriner sağlığı alanlarında, implantasyondan önce embriyonun veya fertilizasyondan önce oositin genetik yönden incelenmesini kapsayan çalışmalardır. İmplantasyon öncesi genetik tanı için farklı gelişim aşamasındaki oositlerin birinci veya ikinci kutup hücre biyopsisi, erken embriyonik gelişim dönemlerinde blastomer izolasyonu veya blastosist aşamasındaki embriyolarda trofektoderm biyopsisi yapılmaktadır. İmplantasyon öncesi genetik tanı çalışmaları planlanırken, bu biyopsi yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları kesinlikle göz önünde bulundurulmalıdır.

PGT son 20 yıllık dönemdeki moleküler analiz yöntemlerinin ilerlemesi ile gelişmiştir. Farelerde, insanlarda ve çiftlik hayvanlarındaki yaygın kullanım amaçları genetik hastalıklar ve kromozom anomalilerinin belirlenmesi ile embriyolarda cinsiyetin analizidir. Edwards (38), ilk kez implantasyon öncesi embriyolarda kalıtsal hastalıkların tanısının yapılabileceğini ve cinsiyetin belirlenebileceğini göstermiştir.

PGT amacıyla implantasyon öncesi embriyolardan biyopsi örneklerinin elde edilmesinde kullanılan teknikler, hızlı ve embriyoya en az düzeyde zarar verecek şekilde yapılmalı ve tanı amaçlı kullanılan testler doğru sonuç vermelidir.

Alınan biyopsi materyalinin değerlendirilmesinde genellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) veya floresan in-situ hibridizasyon (FISH) tanı teknikleri kullanılmaktadır (39). Tek hücre tanı yöntemlerinden olan PZR, tek bir gen bozukluğundan kaynaklanan hastalıkları, X kromozomu ile ilişkili hastalıkları, otomozal hastalıkları ve triplet (CpG) tekrar eden hastalıkların tanısının konmasında kullanılmaktadır (39-41). Örneğin, insan embriyolarından izole edilen tek bir blastomerin genetik analizi ile embriyo transferi öncesi kistik fibrozis tanısı konulan çalışmalar bulunmaktadır (40, 41).

İmplantasyon öncesi genetik tanının gelişiminde en önemli aşama hayvan embriyolarının deneysel olarak mikro manipülasyonlarıdır. İmplantasyon öncesi genetik tanı, gebelik oluşmadan önce fetüsün taşıyacağı genetik hastalığın oluşma olasılığını önemli ölçüde düşürmüştür (42). Yu ve arkadaşları (15), blastomer biyopsi yöntemi ile

implantasyon öncesi dönemde nörodejeneratif hastalıkların tanı ve risklerinin ortaya konulabileceğini göstermişlerdir.

Gardner ve arkadaşları (5), sonraki dönemde tavşan embriyolarında cinsiyetin belirlenebileceğini göstermiştir. Ekonomik avantajlarından dolayı, bu alanda inek embriyolarının kromozom analizi (43-46) veya Y kromozomuna spesifik DNA proplarıyla cinsiyetin belirlenmesi başarıyla uygulanmıştır. Çiftlik hayvanlarında uygulanan embriyo transferinde PGT uygulaması, cinsiyetin önceden seçimi ile sürü planlamasında ve üst düzey dişi bireylerin yetiştirilmesinde kullanılabilir (47). PGT'nin rutinde daha etkin kullanılmasının önündeki engel biyopsi tekniklerinin kolay olmaması, tekniğin çalışma hızının yüksek olmaması, yüksek gider ve deneyimli kişi gereksinimidir.

PZR tekniği az miktarda DNA'nın hızlı kullanımı yolu ile cinsiyet tayini için geniş çalışma olanakları sunmuştur. PZR tekniği hayvancılık ve sağlık alanlarında farklı uygulama avantajları sağlamıştır (48). Cinsiyetin belirlenmesi, moleküler düzeyde Y kromozomunun tanımlanması ile yapılabilmektedir. Bu analiz, hayvanların doku, kıl, kan ve dışkı örneklerinden yapılabildiği gibi embriyo hücrelerinde de yapılabilmektedir (49, 50). PZR'nun gelişimi ile birlikte küçük DNA parçaları kısa sürede çoğaltılabilmektedir. İnsan ve fare embriyolarında bir veya birden fazla sayıda blastomerler izole edilmiş ve elde edilen blastomerler cinsiyetin belirlenmesinde kullanılmıştır (51-54).

PZR kullanılarak inek, fare, domuz, zebu ve melez ineklerin implantasyon öncesi embriyolarında cinsiyet belirlenmesi yapılmıştır (55-59).

FISH yöntemi otozomal ve cinsiyet kromozonlarında oluşan yapısal bozuklukları ortaya koymaya yarayan bir yöntemdir. Her kromozoma özel problemlerin kullanımı temeline dayanmaktadır (60-62).

PZR'nun yalnızca tek gen hastalıklarının incelemesi, öte yandan FISH'in sınırlı sayıda kromozomu incelemesinden dolayı, bu yöntemlerin yanı sıra, alternatif karşılaştırmalı genomik analiz yöntemleri de günümüzde kullanılmaktadır (63).

Sendag ve arkadaşları (64), ineklerde doğacak yavruların cinsiyetlerinin embriyonik ve fetal dönemde önceden belirlenmesinin yetiştiricilikte önemli avantajları

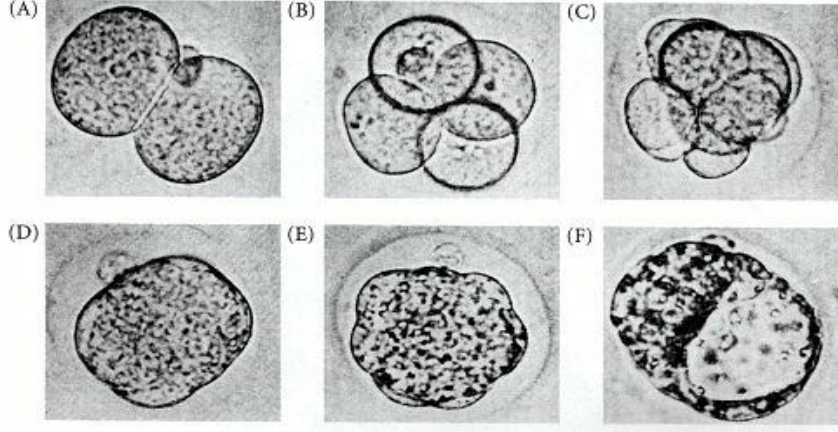
beraberinde getireceğini belirtmişlerdir. Cinsiyetin belirlenmesi et veya süt üretimi yapan işletmelerin üretim stratejilerini önceden planlamalarına olanak sağladığı gibi, biyoteknolojik çalışmalarda da (transgenik çiftlik hayvanların sütünde terapötik rekombinant proteinlerin üretimi açısından) giderleri azaltmakta ve embriyo transferi gibi işlemleri kolaylaştırmaktadır.

Günümüzde X ve Y içeren sperma örnekleri fiziksel yöntemler ile kromozomal yapılarındaki farklılıklardan yararlanılarak ayrıştırılabilmektedir. Bu amaçla, örneğin flow sitometre yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca membrandaki kimyasal farklılıkları kullanan tanı teknikleri de mevcuttur (58). Spermada cinsiyet saptanmasında kullanılan santrifüj, elektroforez, sedimentasyon, filtrasyon, saklama medyumundaki pH değeri değişiklikleri, immünojenik teknikler ve motilite ölçütleri gibi yöntemlerle elde edilen sonuçlar çok değişken olduğundan, pratik kullanımda önerilmemektedir (64). Fetal olarak cinsiyetin saptanması, yavruyu içeren sıvının analiz edilmesi ile (amniyosentez) veya ultrasonografik görüntüleme yöntemi ile fetal skrotum ile meme başı sürgünü veya fetal genital çıkıntılarının konumlanmasının saptanmasıyla yapılabilir (64).

Embriyo Gelişimi

Fertilizasyon sonrası zigot oluşumundan, uterustaki blastosistin implantasyonuna kadar geçen süreçte, embriyo gelişimindeki olayların ve değişimlerin anlaşılması, yapılacak araştırmaların tasarlanmasında çok önemlidir. Bu gelişimsel dönem, dört farklı aşama olan zigot, bölünme, kompaktlaşma ve blastosist aşamalarını içermektedir (65).

Erken gelişim döneminde, fertilize yumurtadan iki hücreli aşamaya kadar geçen süreç maternal genomun kontrolü altındadır. Kompaktlaşma öncesi ve blastosist dönemleri ise embriyonik genomun kontrolü altındadır. Embriyoda zona pellusidanın en önemli görevi, embriyoya, ovidukt sıvılarından kaynaklanan zararlı etkilere karşı koruma sağlamasıdır (65). Fare embriyosunun normal gelişim sürecinde, üçüncü günde sekiz hücreli aşamada kompaktlaşma gözlenmektedir. Kompaktlaşma hücreler arası bağların birbirine yakınlaşması ile bir hücrenin diğerine yapışmasını kapsamaktadır. Hücreler arası bağların oluşumunda kalsiyum ve magnezyum iyonları önemli rol oynamaktadır (8). Fare embriyosunun *in vitro* gelişimi şekil-1'de gösterilmiştir.



Şekil-1: Fare embriyosunun *in vitro* gelişimi (A) iki hücreli aşama (B) Dört hücreli aşama (C) Erken sekiz hücreli aşama (D) Kompaktlaşan sekiz hücreli aşama (E) Morula (F) Blastosist (66).

Blastosist, trofektoderm ve iç hücre kitlesi olmak üzere iki farklı hücre grubundan oluşur. Fare embriyolarının çiftleşme sonrası gelişim zamanları aşağıdaki gibidir.

Gelişim Aşaması Çiftleşme Sonrası Saat

Tek Hücreli	12
İki Hücreli	36
Üç-Dört Hücreli	48
Sekiz Hücreli	60
On Altı Hücreli	72
Blastosist	84-96

Oosit ve Embriyolarda Uygulanan Biyopsi Teknikleri

Biyopsi, oosit döneminde kutup hücre biyopsisi, kompaktlaşma öncesi embriyo aşamasında blastomer biyopsisi ve blastosist aşamasında trofektoderm hücrelerinin biyopsisi olmak üzere üç farklı şekilde yapılmaktadır. Kullanılan biyopsi tekniklerinin fiziksel, kimyasal ve mekanik farklılıkları vardır. Aşağıda bu dönemlerde uygulanan biyopsi tekniklerinin avantaj ve dezavantajları açıklanmaktadır.

Kutup Hücre Biyopsisi

Genetik analiz amacıyla kutup hücrelerinin analizi transfer aşamasına kadar önemli zaman avantajı sağlamaktadır. Mekanik ve lazer olmak üzere iki farklı teknik uygulanır. Oositin maternal genotipini belirlemek için kutup hücresi biyopsi materyali olarak uzaklaştırılır ve sonrasında herhangi bir şekilde *in vitro* kültür canlılık oranı etkilenmez (33).

Oosit, çapından daha küçük genişlikteki tutucu pipet yardımı ile sabitlenir ve tirod asidi içeren çok küçük özellikteki pipet ile zona pellusida üzerinde boşluk açılır. Daha büyük bir pipet yardımı ile oluşturulan bu boşluktan birinci kutup hücresi aspire edilir (37). Verlinsky ve arkadaşları (67), ilk olarak birinci kutup hücresinin genetik analizini rapor etmişlerdir. Montag ve arkadaşları (68)'da fare zigotlarından ilk kez 1,48 µm lazer kullanarak kutup hücresi çıkartıldığını bildirmişlerdir. Isachenko ve arkadaşları (69) ise, kutup hücre biyopsisi sonrası fare pronükleus embriyolarının direkt vitrifikasyonunu gerçekleştirmiş ve *in vitro* kültür grubunda %25 canlılık ve direk vitrifikasyon sonrası *in vitro* kültür grubunda ise %23 canlılık oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Kompaktlaşma Öncesi Embriyo Biyopsisi

Kompaktlaşma öncesi embriyo biyopsisi, farelerde implantasyon öncesinde iki, dört ve sekiz hücreli embriyolara genetik tanı amacıyla bir veya daha fazla sayıda blastomerin dışarı alınmasıyla uygulanan biyopsi yöntemidir. İki hücreli dönemin sonundan itibaren yapılan biyopsi embriyonik genom hakkında bilgi vermektedir.

Memeli embriyolarında bu tür biyopsi ilk olarak fare embriyolarında uygulanmıştır (4). Willadsen (9), tek blastomeri izole edilen iki hücreli embriyolardan blastosist gelişiminin sağlandığını bildirmiştir. Monk ve Handyside (12), sekiz hücreli aşamadaki fare embriyolarından blastomer aspirasyonu yaptıktan sonra, blastosist gelişimi elde etmişlerdir. İmplantasyon öncesi fare embriyolarından biyopsi yapılan blastomerlerin kullanıldığı PZR uygulamasıyla genetik tanı konabileceği de gösterilmiştir (13). Farklı gelişim dönemlerindeki fare embriyolarında uygulanan biyopsileri karşılaştırmak için yapılmış bir çalışmada ise, sekiz hücreli aşamada yapılan biyopsi uygulamasının, dört hücreli dönemde yapılan biyopsi uygulamasına göre daha uygun olduğu gösterilmiştir (6). Hardy ve arkadaşları (8), sekiz hücreli insan embriyoları ile yaptıkları çalışmada, biyopsi

yapılan gruptaki embriyolar ile kontrol grubundaki embriyoların, trofektoderm ve iç hücre kitleciğinde yer alan hücre sayı ve oranlarını karşılaştırmışlar ve biyopsi uygulamasının embriyo gelişimine zararlı etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

Illmensee ve arkadaşları (10), farklı gelişim dönemlerindeki embriyolarda sıralı blastomer biyopsisi uygulamışlar ve her embriyonun üç gelişim döneminde yapılan biyopsi işlemi sonrası blastosist gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. İlk biyopsi uygulamasında iki hücreliden tek blastomer, dört hücreliden iki blastomer ve altı hücreliden üç blastomer biyopsisi yapan araştırmacılar, izole ettikleri blastomerleri daha önceden hazırlanmış alıcı boş zona pellusida içerisine transfer etmişlerdir. Bu embriyolar kültüre edildikten sonra normal sayıya ulaştığında ikinci biyopsi yapılmıştır. Buradan da izole edilen blastomerler boş zona pellusida içerisine transfer edilmiştir. Bu embriyolar da kültüre edilip normal sayıya ulaştıktan sonra üçüncü biyopsi uygulaması yapılmıştır. Embriyoların seri biyopsi uygulamalarında, biyopsi gelişim oranları blastosist aşamasında değerlendirilmiştir. İki, dört ve altı hücreli embriyolar için gelişim oranları, sırasıyla ilk biyopside %74,3, %75,0, %66,6, ikinci biyopside %71,8, %62,6 ve %48,4 ve üçüncü biyopsi de ise % 48,4, %38,1 ve %10,6 olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, sonuç olarak birinci ve ikinci seri biyopsi uygulamalarından üçüncü seri biyopsi uygulaması ile karşılaştırıldıklarında daha yüksek gelişim oranı elde edildiğini bildirmişlerdir.

Blastomer biyopsi tekniği çiftlik hayvanları için çok önemli bir tekniktir (58, 62). Koyunlarda yapılan bir çalışmada, iki ve dört hücreli embriyolara uygulanan biyopsi sonrası, alıcı dişilere transferden %36 oranında gebelik elde edildiği bildirilmiştir (9).

Kompaktlaşma Öncesi Embriyo Biyopsi Teknikleri

1-Zona Delme (Drilling) Tekniği

A-Tirod Asidi (TA) ile Delme

B-Lazer ile Delme

C-Bölgesel Zona Diseksiyonu (PZD)

2-Blastomer Aspirasyon Tekniği

1-Zona Delme Tekniği

A-Tirod Asidi : Tirod asidi 1986 yılından beri embriyolojide ve kompaktlaşmadan önceki gelişim aşamalarında uygulanan biyopsilerde sıklıkla kullanılmaktadır (70). Ticari olarak Medicult (Origio), EmbryoMax (Millipor) diye adlandırılan tirod asit solüsyonlarının pH değeri 2,2'dir. Kullanımı sırasında embriyo üzerinde olumsuz etki oluşturabilme olasılığı nedeniyle dikkatli kullanılması gerekmektedir. Kompaktlaşmadan önceki embriyo gelişim aşamalarında kimyasal yöntem olarak kullanılan tirod asidi, genellikle iki başlıklı mikromanipülatörlerde, zona pellusidanın kısmen asidik etkiden dolayı erimesiyle delik açılması şeklinde uygulanır (33). Açıklıktan düz uçlu aspirasyon pipeti yardımı ile blastomerler ayrıştırılarak izole edilebilmektedir (71,72).

B-Lazer ile Delme : Mekanik bir teknik olan lazer ile biyopsi, insan, fare ve diğer hayvan embriyolarında güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır (33, 73).

C-Bölgesel (Partial) Zona Diseksiyonu (PZD) : Zona pellusida üzerinde mikro düzeydeki iğne bıçak ile oluşturulan bölgesel kesiklerde açıklık sağlayarak biyopsi yapılması, PGD uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemle lazer metodundaki embriyo üzerinde ısı uygulaması veya tirod asidi uygulamasındaki embriyo üzerinde kimyasal etki gibi olumsuzluklar ortadan kalkmaktadır (33, 70).

Licciardi ve arkadaşları (73), ksenon-klorit non-kontakt lazer sistemi ile zona pellusidaya delik açarak embriyolarda biyopsi işlemini uygulamışlardır. Bu uygulamada, ters mikroskobun arka girişinden embriyo üzerine 308 nm'lik ışın verilmiştir. 100 X'lik kuartz objektif ile hedef eksize edilmiştir. Lazer uygulamasını takiben, zonanın açılan yerinden blastomer çıkarılmıştır. Aynı çalışmada lazer biyopsisi sonrası blastosist aşamasına ulaşan embriyo oranı %91 iken, bu oran tirod asit kimyasal tekniği ile yapılan biyopside %94 ve zona pellusidaya dokunulmamış grupta ise %83 olarak saptanmıştır. Lazer yapılan embriyoların blastomerlerinde morfolojik bozukluklar ve embriyo gelişiminde gerilemeler gözlenmiştir. İmplantasyon oranları ise lazer biyopsisinde %34, tirod asit biyopsisinde %43 ve kontrol grubunda %37 bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda, lazer uygulaması sonrası blastosist gelişim oranının iyi olduğu; ancak, lazer uygulamasının implantasyon oranlarını düşürdüğu gözlenmiştir.

2-Blastomer Aspirasyon Tekniği

Blastomer aspirasyon tekniği, tirod asit, lazer veya bölgesel zona diseksiyonu uygulamalarına göre klinik olarak daha sıklıkla kullanılan bir embriyo biyopsi tekniğidir. Hidrolik punomatik veya ağız kontrollü şıngalarla kontrollü biyopsi pipeti 30-40 μm 'lik i çapta olmalı ve içerisinde biyopsi medyumunu bulunması gerekmektedir. Blastomerlerin oldukça kırılğan olmasından dolayı, biyopsi uygulaması sırasında, aspirasyon yavaş ve nazikçe yapılmalıdır. Aksi takdirde sert uygulamalarda blastomerler lize olabilmektedir.

Santalo ve arkadaşları (74), içinde Ca^{2+} ve Mg^{2+} olmayan biyopsi medyumlarının fare embriyolarında biyopsi sonrası canlılık oranları üzerine etkisini araştırmışlardır. Yapılan araştırmada, kontrol grubu, Ca^{2+} ve Mg^{2+} olmayan Earle's phosphate-buffered saline (PBS) ile 6 mg/ml Sığır Serum Albumini'nde 40 dakika süresince bekletildikten sonra, M16 kültür medyumuna transfer edilmiştir. Diğer kontrol grubu, biyopsi yapılmış embriyolar Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen M2 medyumuna maruz bırakılmadan, M16 kültür medyumuna transfer edilmiştir. Deney grupları biyopsi yapıldıktan sonra Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS de 10 ve 40 dakika tutulduktan sonra M16 kültür medyumuna transfer edilmiştir. Araştırmacılar, çalışmalarının sonucunda, Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen medyumlara kısa surelerde maruz bırakılmanın biyopsi yapılmış embriyolara zarar vermeyeceği kanısına varmışlardır.

Wilton ve Trounson (75), dört hucrelili F1 (CBA X C57) fare embriyolarından mikromanipülasyon tekniği ile tek blastomer biyopsisi uygulamış ve *in vitro* ve *in vivo* gelişim oranlarını araştırmışlardır. Bu çalışmada elde edilen dört hucrelili embriyolar, 60-90 dakika süresince Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen M2 medyumunda, hücreler arası iyon bağlarının ozulmesi için inkübasyona bırakılmış ve mikromanipülasyon için Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen M2 medyumunu ve üzeri parafin yağı ile kaplanmış çalışma medyumuna transfer edilmişlerdir. apı 30 μm olan tutucu pipet ve 20 μm çaplı aspirasyon pipeti bulunan mikromanipulator sistemi kullanılarak embriyolara biyopsi uygulanmıştır. Aynı biyopsi koşullarına maruz bırakılan ve biyopsi işlemi uygulanmayan embriyolar ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Uygulamalar sonrası 48 saat süresince insan amnionik sıvısı içeren mikro damlalarda %5 CO_2 'li ortamda *in vitro* kültür sonrası blastosist gelişim oranları biyopsi ve kontrol grupları için sırasıyla %94 ve %98 olmuştur. Elde edilen blastosistler, yalancı gebe (pseudopregnant) alıcı dişilerin uteruslarına transfer edilmiştir.

Yapılan karşılaştırmada, biyopsi grubunda implantasyon oranının (%53,1) kontrol grubundaki implantasyon oranından (%81,8) daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Trofektoderm Biyopsisi

Blastosistlerin dış yüzeyini kaplayan trofektoderm hücrelerinin bir kısmının alınması ile gerçekleştirilen biyopsi yöntemidir. Bu yöntemin en önemli avantajı, implantasyondan sonra fetüsün gelişiminde önemli olan iç hücre kitlesine zarar vermeden biyopsi ve tanı yapılabilme olanağının olmasıdır.

İmplantasyon sorunlarını araştırmak için tasarlanmış bir çalışmada, kullanılan fare blastositlerinden trofektoderm biyopsisi zona pellusidaya yapılmış olan açıklıktan hücre dışına deplase olmuş hücrelerin elde edilmesi ve elde edilen hücrelerde gen ekspresyonlarının analizi yapılmıştır (76). Gardner ve Edwards (5), tavşanlarda yaptıkları bir çalışmada, genişlemiş blastosistlere uyguladıkları trofektoderm biyopsisinde, *in vitro* gelişim oranını %69 olarak bildirmişlerdir. Picard ve arkadaşları (46), sığır blastosistlerinde biyopsi sonrası 24 saat *in vitro* kültür değerlendirmesi yapmış ve %42 oranında canlılık elde etmişlerdir. Çiftlik hayvanlarında kullanılan trofektoderm, biyopsi metodu özellikle cinsiyeti belirlenmiş embriyo elde etmek amacıyla sığırlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (21).

Wang ve arkadaşları (18), fare morula ve blastosistlerinin mikro bıçak biyopsisi sonrası gelişim kapasitesini araştırmışlar; biyopsi sonrası alıcılara transfer edilen embriyolardan, blastosist aşamasındaki biyopsi grubunun implantasyon oranının morula aşamasındaki biyopsi grubundan daha yüksek olduğunu bildirilmişlerdir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Kullanılan Hayvanlar

Doktora Tez Araştırma projesi kapsamında kullanılan hayvanlar için, Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından verilmiş ve yapılan deneyleerin etik olarak uygun olduğunu belirten etik kurul kararı mevcuttur. Deneysel çalışmalar, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Marmara Araştırma Merkezi (MAM) Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nün çalışma izni dâhilinde, Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmada CB6 F1 (C57BL/6 X BALB/C) 6-8 haftalık genç erişkin çiftleşmemiş 60 adet dişi hibrid fare kullanıldı. Hibrid fareler, süperovulasyon ile yüksek sayıda embriyo elde edilmesinden dolayı, embriyo çalışmalarında özellikle tercih edilmektedir.

Kullanılan fareler sıcaklığı 18-23°C, %40-60 oranında nispi nemli ve 12 saat karanlık/12 saat aydınlık foto periyodu uygulanan deney hayvanları merkezinde barındırıldı. Tüm farelerin ticari rodent pellet yem ve otomatik suluklar ile ad-libitum olarak beslenmeleri sağlandı. Kullanılan hayvan kafesleri Avrupa Tip-1 standardında ve kafeslerde altlık olarak yonga talaşı kullanıldı. Kafes altlık değişimi haftada 2 kez yapıldı ve günlük olarak su ve yem kontrolleri yapılarak gerekli temizlik ve ilaveler gerçekleştirildi.

Deneyleerin tasarımında, rastgele seçimi yapılan aynı yaşdaki fareler kullanıldı. Her grup için üç deney yapıldı ve bu gruplar en az beş bireyden oluşturuldu.

In vitro kültür sonucu gelişen blastosistlerin *in vivo* gelişimlerinin değerlendirilmesi için blastosistlerin bir kısmı toplam 12 adet CD1 alıcı (foster) fareye (her grup için 3 adet alıcı) transfer edildi. CD1 fareler annelik ve taşıyıcılık özelliklerinin üstün olmasından ötürü embriyo transferlerinde alıcı fare olarak özellikle tercih edilmektedir. Bu hayvanlarda, yapılan transferler sonrası 13 ile 15. günler arasında, implantasyon bölgelerinin ve fetal gelişimlerin kontrolleri gerçekleştirildi.

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Maddeler	Katalog No	Firma Adı
Sığır Serum Albumini (BSA)	A-3311	SIGMA
Mineral Yağ	A-155A	SAGE
Fizyolojik Serum	-	İbrahim Ethem Ulugay
Sitokalazin B	14930-96-2	SIGMA
HEPES Quinn's Advantage Medyumu	Cat-1223 Lot-7193A	SAGE
Quinn's Blastosist Medyumu	B213-C	SAGE
hCG	-	Pregnyl; Organon,
PMSG	G-4877	SIGMA
Polivinil Alkol	9002-89-5	SIGMA
Etil Alkol	-	-
Betadin	-	Kansuk
Krom Katgüt 4.0	-	VİP
Rompun	-	BAYER
Alfamin	-	ALFASAN
Hoechst Boya	33342 (B-2261)	SIGMA

Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Cihaz	Kullanım Amacı	Marka/Modeli
Binoküler Mikroskop	Embriyo Manipülasyon Amaçlı	Nikon Cds
Faz kontrast Mikroskop	Embriyo Manipülasyon Amaçlı	Soif
Ters Mikroskop	Mikroskopik İncelemelerde	Nikon Eclipse Te
Ters Mikroskop	Floresan/Hücre Boyamalarında	Zeiss/Axiovert 35 m
Stereo Mikroskop	Mikroskopik Değerlendirmelerde	Zeiss/Stemi Sv8
Bidistile Su Cihazı	Sulandırıcıların Hazırlanmasında	Ufs Elga
Hassas Terazi	Kimyasal Malzemenin Tartımında	Sartorius/Bp 2215
Kuru Sterilizatör	Kullanılacak Alet ve Ekipmanın Sterilizasyonunda	Nüve/Fn 120
İnkübatör	Embriyo Kültür Çalışmalarında	Thermo/3141
Soğuk Işık Kaynağı	Embriyo Transfer Çalışmalarında	Photonic Pl 2000 Ve Nikon Lf10
Cerrahi Set	Fare Embriyo Eldesi ve Transferinde	Oftalmik Cerrahi Set
Mikromanipülatör	Biyopsi İşleminde	Eppendorf Man/Nk 2
Steril Kabin	Medyum Hazırlanmasında	Cleanair
Tutucu Pipet	Embriyo Sabitleme Amaçlı	Eppendorf 35°, İd:15µm, Od:100 µm,
Aspirasyon Pipeti	Embriyo Biyopsi Amaçlı	Eppendorf 20°, İd:15µm, Od:20 µm,
Mikro Bıçak	Embriyo Kesim Biyopsisinde	Microfeather K-715 30° ve 15°

Cihaz	Kullanım Amacı	Marka/Modeli
Ağız Pipeti	Embriyo Manipülasyonlarında	Sigma Aldrich
Isıtıcı Tabla	Dış Ortamda Embriyo Kültür Petrileri İçin	Minitube Ht 400
Mikromanipülatör Pipet Tutucu (Havalı)	Biyopsi Pipet Tutucu	Eppendorf Cell Tram Air
Mikromanipülatör Pipet Tutucu (Yağlı)	Embriyo Tutucu	Eppendorf Cell Tram Vario
Aydınlatıcı	Ters Mikroskop Aparatı	Nikon Lhm 100 C-1
Ters Mikroskop Masası	Ters Mikroskop Altı, Titreşim Önleyici	Özel Yapım
Rodent Isıtıcı Tabla	Embriyo Transferinde, Fare Vücut Isısını Sabitleyici	Cryologic/Msm
Rodent Yoğun Bakım Kabini	Embriyo Transfer Sonrası Bakım	Vetario
Pipet Seti	Embriyo Manipülasyonları	0,2-2 µm, 0,5-10 µm Thermo/Finnpipette
Otomatik Pipet	Embriyo Kültürlerinin Hazırlanmasında	Pipettus/Hirschmann
Pipet Seti	Embriyo Kültür Hazırlanmasında	10-100 µm, 20- 200 µm ve 100-1000 µm /Rainen
Buzdolabı	Medyum Stoklamada	BEKO
Derin Dondurucu	Bazı Maddelerin Uzun Süre Saklanması	BEKO

Malzemeler	Firma	Katalog No
15X35 Petri Kabı	Grainer	08440129
15X60 Petri Kabı	-	-
15X35 Petri Kabı	Falcon	7341545
Lam ve Lamel	-	-
Eppendorf Tüpler	-	-
Mikropipet uçları	-	-
Pipet Uçları	-	-
Filtreler (22 µm çaplı)	Millipore	-
Filtre Kağıdı	-	-
Alüminyum Folyo	-	-
Enjektör (1 ml ve 10 ml)	Hayat	-
Santrifüj Tüp (15 ml ve 50 ml)	TPP Falcon	-

Süperovulasyon Amacıyla Gonodotropinlerin Hazırlanması

Dişi farelerin senkronizasyonu ve süperovulasyonu amacıyla kullanılan gonodotropinler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

PMSG (Pregnant Mare Serum Gonodotropin): SIGMA firmasına ait olan ve G-4877 numaralı PMSG, 1000 IU'lık liyofilize formda bulunmaktadır. Liyofilize formun tümü 20 ml ticari %0,9 NaCl ile eritildi ve 1 ml'lik solüsyonlar halinde bölünerek eppendorf tüplerde -20°C'lik derin dondurucuda 3 ay süre ile kullanım amacıyla saklandı.

hCG (Human Chorionic Gonadotropin): Ticari adı Pregnyl (Organon) olarak bilinen liyofilize formdaki 5000 IU'lık hCG, 9 ml %0,9 NaCl ile sulandırılarak ana stok oluşturuldu. Ana stoklardan 100 µl solüsyon alınarak 900 µl %0,9 NaCl ile 1 ml uygulama solüsyonları halinde hazırlanıp bölünerek eppendorf tüplerde -20°C'lik derin dondurucuda 3 ay süre ile kullanım amacıyla saklandı.

Yıkama Medyumunun Hazırlanması

Yıkama medyumunu, embriyo elde etmek ve inkübatör dışında yapılan manipülasyonların gerçekleştirilmesi amacıyla, günlük olarak hepa filtreli steril kabin içerisinde hazırlandı. Embriyo manipülasyonlarında CO₂'li inkübatöre gereksinim duyulmayan HEPES tamponlu medyumlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada, yıkama medyumunu olarak HEPES'li Quinn's Advantage® Medyumunu (QAM) kullanıldı. Protein kaynağı olarak medyum içerisine 3 mg/ml BSA (Katalog No: 3311 SIGMA) eklendi. BSA'nın suda çözünmesinden sonra, 10 ml enjektör ile 22 µm'lik millipore filtreden geçirilen medyum, 15 ml'lik falkon tüp içerisinde kullanılmak üzere 37°C'lik etüve kaldırıldı.

Kültür Medyumunun Hazırlanması

Çalışmada kullanılan embriyoların kültürü 4 mg/ml BSA eklenen SAGE Quinn's Blastosist Ticari Medyumunda (QBM) gerçekleştirildi. BSA katkısından sonra, medyum 22 µm'lik millipore filtreyle 5 ml'lik steril tüpe filtre edildi. Petri kabı içerisinde 10 µl'lik embriyo kültür damlaları oluşturuldu ve damlaların üstü tümüyle mineral yağ ile (SAGE, A-155) kaplanarak, %5 CO₂, %5 O₂ ve 37°C ısı ile yüksek rutubete sahip inkübatöre gazlanması amacıyla embriyoların aktarılmasından en az 2 saat önce kaldırıldı.

Biyopsi Medyumunun Hazırlanması

Biyopsi çalışması için gerekli olan medyumun içerisinde Ca²⁺ ve Mg²⁺ iyonları içermemektedir. Bu minerallerin bulunmadığı şartlarda blastomerleri bir arada tutan mekanizma geçici olarak bozulmakta ve manipülasyon sırasında blastomerlerin izolasyonu daha kolay gerçekleşmektedir. Ancak, çalışma sırasında embriyoların uzun süre bu solüsyona maruz bırakılması embriyolar üzerinde zararlı etki yaratacağından, anılan solüsyon içerisinde embriyoların 45 dakikadan fazla tutulmamasına özen gösterildi. Bu amaçla, 3 mg/ml BSA eklenen HEPES'li QAM kullanıldı. BSA katkısından sonra, medyum 22 µm'lik millipore filtreyle 15 ml'lik steril tüpe filtre edildi. Biyopsi

uygulamasında embriyo yapısının korunması amacıyla 5 µg/ml sitohalazin B filtre edilmiş medyuma sterilitiyi bozmadan eklendi. Altmış mm'lik petri kabı içerisinde 30 µl'lik 4 adet damla oluşturuldu ve buharlaşma ile kontaminasyonu engellemek amacıyla damlaların üzeri mineral yağ ile kaplandı.

Verici Farelerin Süperovulasyonu

Farelerin ovulasyon ve çiftleşme işlevleri ışık döngüsüne bağlı olduğundan, elde edilecek embriyoların hangi aşamada elde edilebilecekleri önceden hesaplanabilmektedir.

Çalışmada kullanılan farelerin temin edildiği üretim ünitesinde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık döngüsü uygulanmakta idi. Çalışmada 8-10 haftalık CB6 F1 dişi fareler embriyo eldesi amacıyla verici olarak kullanıldılar.

Süperovulasyon Programı

I. Aydınlık periyodu sabah 08:00'da ışıkların yanmasıyla başladı ve karanlık periyodu akşam 20:00'da ışıkların sönmesiyle sona erdirilerek başladı. Işıklandırma sistemi otomatik sistemle ayarlandı.

II. Verici farelerden sekiz hücreli embriyo elde edilmesi için, çarşamba saat 14:00'da uygulama için hazırlanan PMSG hormonu -20°C'den alınarak oda ısısında eritildi. Eritilen PMSG hormonu 1 ml'lik insülin enjektörü ile hayvan başına 7,5 IU PMSG dozda i.p. uygulandı.

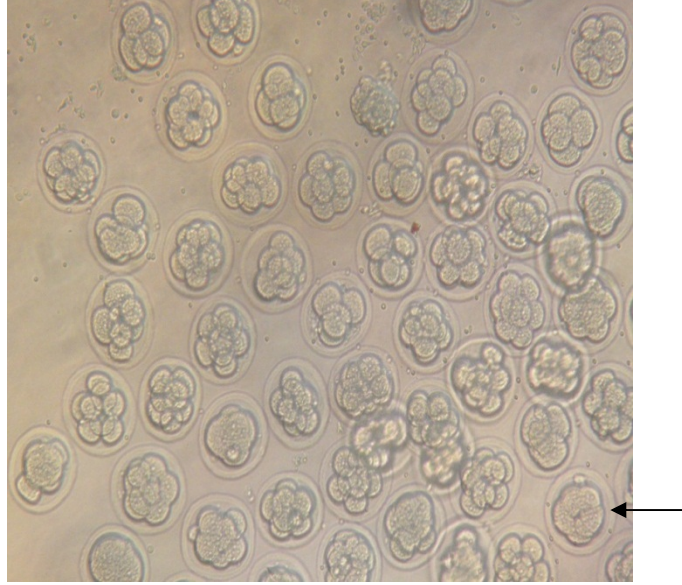
III. PMSG uygulamasından 48 saat sonra, cuma saat 14:00'da uygulama için hazırlanan hCG hormonu -20°C'den alınarak oda ısısında eritildi ve 1 ml'lik insülin enjektörüyle hayvan başına 10 IU hCG hormonu i.p. enjeksiyonla uygulandı. Enjeksiyon sonrası dişi fareler çiftleşmeleri amacıyla damızlık erkeklerle bire bir kafeslere konuldular.

IV. Cuma saat 17:00'da ve cumartesi saat 08:00-08:30'da çiftleşmenin saptanması için vajinal plak kontrolleri yapıldı ve vajinal plak gösteren fareler ayrı bir kafese konuldular. Vajinal plak gözlenen farelerin embriyolarının yaşları 0,5 gün olarak kabul edildi.

Embriyoların Elde Edilmesi

Vajinal plak saptandıktan 68-72 saat sonra, salı saat 10:00'da sekiz hücreli embriyolar farelerin uterus ve oviduktlarından toplandı. Elde edilen embriyoların toplanması amacıyla küçük petri kabına konan HEPES'li QAM yıkama medyumu, 37°C'deki ısıtıcı tabla üzerine yerleştirildi. Farelerden embriyo elde etmek için otoklavda sterilize edilen göz cerrahi pensleri ve makasları kullanıldı. Embriyo elde etmek için 68-72 saat önce vajinal plak gösteren bireylerin servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazileri yapıldı. Abdominal bölgenin mediyan hattında deriye 0,5 cm'lik ensizyon yapıldı ve ensizyon dudakları tutulup zıt yönler doğru gerdirilerek deri uzaklaştırıldı. Peritona yapılan kesitle batın içi organların tamamı ortaya çıkarıldı ve iki pens yardımı ile batın organları farenin baş ve sonuna doğru ayrıldılar. Y şeklindeki uterus, sağ ve sol oviduktlar ile kornu uterilerin birleşim yerinden makas yardımı ile kesilerek yıkama medyumu içerisine konuldu. Stereo mikroskop altında X 40'lık büyütmede göz pensler yardımı ile uterusun lumeni iki uçtan açıldıktan sonra, 1ml'lik insülin enjektörü ile yıkama medyumu verilerek embriyolar yıkama medyumu içerisine çıkartıldı. Ağız kontrollü embriyo manipülasyon pipeti yardımı ile embriyolar ısıtıcı tabla üzerindeki medyuma aktarıldılar. Kan, lipid hücreleri, kıl ve doku artıkları gibi embriyoların canlılığı üzerine olumsuz etkisi olacak dış faktörlerin uzaklaştırılması için yıkama medyumunda embriyolar ağız kontrollü pipet yardımı ile 3 kez yıkandılar (Şekil-2).

Elde edilen embriyolar %5 CO₂, %5 O₂ ve 37°C'lik inkübatör içerisine 3-4 saat önce konmuş olan fare embriyo QBM kültür medyumuna aktarıldılar. Yıkama medyumundan ve diğer nedenlerden kaynaklanabilecek kontaminasyonları elimine edebilmek için, ağız pipeti değişimi yapıldı. Pipetle aktarılabilecek yıkama medyumunu minimize etmek amacıyla, embriyolar ardışık olarak ikinci ve üçüncü kültür damlalarına pipet yardımıyla aktararak iyice yıkanmaları sağlandı.



Şekil 2: Vajinal plak gözlemlendikten 68 saat sonra uterus yıkaması ile elde edilmiş embriyolar Kompaktlaşmış sekiz hücreli fare embriyosu (Ok).

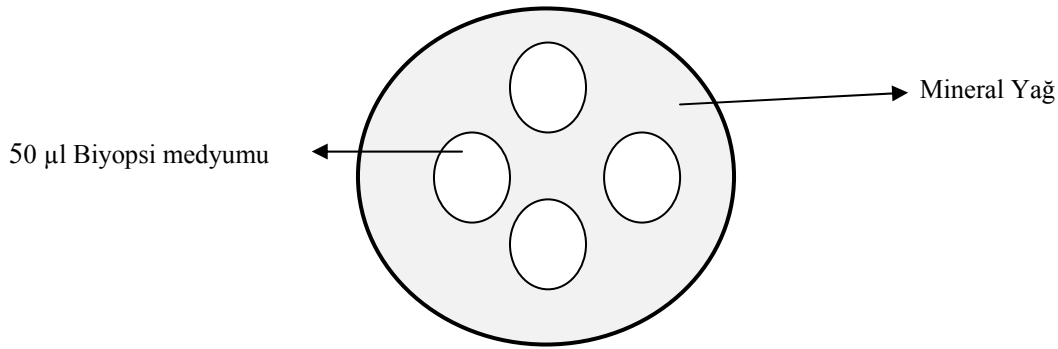
Blastomer Aspirasyon Biyopsisi

Blastomer aspirasyon biyopsisi Eppendorf Transfer Man/Nk 2 mikromanipülatörlerinin monte edildiği Nikon Eclipse Te ters mikroskop altında gerçekleştirildi . Sol mikromanipülatöre Eppendorf Cell Tram Vario embriyo tutucu pipet konsolu ve 35° açılı, 15 µm iç çaplı ve 100 µm dış çaplı Eppendorf embriyo tutucu pipeti monte edildi. Sağ mikromanipülatöre ise Eppendorf Cell Tram Air embriyo manipülasyon pipet konsolu ve 20° açılı 15 µm iç çaplı ve 20 µm dış çaplı Eppendorf embriyo biyopsi pipeti monte edildi. %5 CO₂, %5 O₂ ve 37°C'lik inkübatörde bulunan kompakt sekiz hücreli fare embriyoları 50 µl'lik 3 mg/ml BSA + 5 µg/ml Sitohalazin B ile takviye edilmiş ve içerisinde Ca²⁺ Mg²⁺ içermeyen QAM HEPES biyopsi damlalarına stereo mikroskop altında tek tek konuldu. Blastomer aspirasyon biyopsi petrisi Şekil-3'te görüldüğü gibi hazırlandı. İçerisine manipülasyon amacıyla embriyo aktarılan petri kapları, oda ısısı 22-24°C olan ortamda, 30 dakika kadar bekletilerek blastomerler arası bağların çözülmesi ile dekompaktlaşma sağlandıktan sonra uygulamaya alındı (Şekil-4).

Biyopsi uygulaması aşağıdaki sıra ile yapıldı. Ters mikroskop altında biyopsi çalışma petrisi içerisindeki embriyolar X 40 büyütmede tutucu pipet ile saat dokuz yönünde sabitlendikten sonra, saat üç yönünden biyopsi pipeti ile zona pellusidaya nazikçe punksiyon yapıldı. Perivitellin boşluk geçildikten sonra, hava kontrollü biyopsi mikromanipülatörü ile dekompakte olmuş sekiz hücreli embriyodan tek bir blastomer

aspire edildi. Biyopsi işlemi tamamlanan embriyolar yıkama medyumuna içerisinde yavaş ve kontrollü şekilde aktarıldı. Yapılan biyopsi işlemleri Şekil-5’de görüldüğü gibi Şekil-6’daki mikromanipülator seti altında gerçekleştirildi.

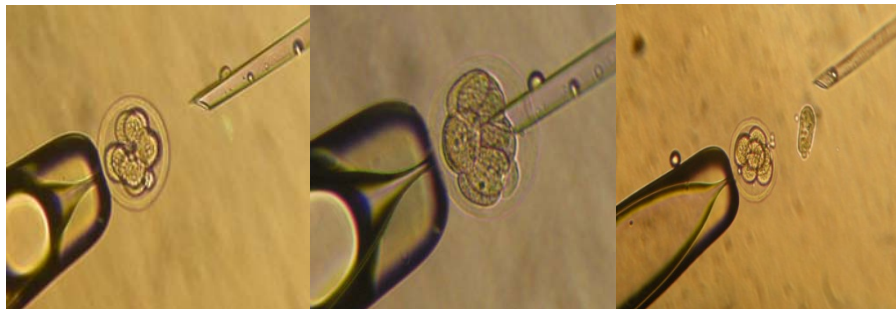
Çalışmada kontrol grubu embriyolar biyopsi işleminde kullanılan solüsyonlar içerisinde benzer süreçlerden geçirildi. Kontrol grubundaki embriyolara biyopsi işlemi uygulanmadı. Süreç sonunda, biyopsi ve kontrol grubundaki embriyolar pipet yoluyla oluşabilecek aktarımların önüne geçilebilmesi için biyopsi kültür damlarında üç kez ve her defasında yeni pipet kullanılarak yıkandı.



Şekil-3: Blastomer aspirasyon petrisi



Şekil-4: Sekiz hücreli dekompakt fare embriyosu



Şekil-5: Blastomer biyopsisi uygulaması



Şekil-6: Mikromanipülasyon seti

Trofektoderm Biyopsisi

Trofektoderm biyopsisi Eppendorf Transfer Man/Nk 2 mikromanipülatörlerinin monte edildiği Nikon Eclipse Te ters mikroskop altında gerçekleştirildi (Şekil-6). Yukarıda tanımlandığı şekilde elde edilen sekiz hücreli embriyolar 4 mg/ml BSA %5 CO₂, %5 O₂, 37°C ve yüksek rutubetli inkübatör şartlarında 48 saat süreyle SAGE-QBM'de blastosist aşamasına kadar kültür edildi. Kesim işleminde eppendorf otomatik konsollara bağlı Microfeather K-715 30° ve 15°'lik mikro bıçak kullanıldı. Genleşmiş blastosist aşamasına gelen blastosistlerden biyopsi için trofektodermden çok az bir parça kesilerek alındı

Genleşmiş blastosistler biyopsi medyumunda 3 kez yıkandıktan sonra, embriyo kesimi için hazırlanmış biyopsi petrisindeki 100 µl'lik biyopsi medyumunu bulunan damlalara, damla başına 1 embriyo düşecek şekilde aktarıldı. Embriyolar Ca²⁺ ve Mg²⁺ iyonları bulunmayan HEPES'li QAM yıkama medyumlarında yıkandıktan sonra, petri yüzeyine daha iyi yapışır hale geldiler. Ayrıca, manipülasyon esnasında embriyoların hareket etmelerini sınırlandırmak için mikro bıçak yardımıyla petri yüzeyinde birbirine paralel çizgiler çizildi. Kesim işlemi paralel çizgiler arasına mikro bıçak yardımı ile yerleştirilen embriyolarda mikro bıçak kullanılarak ters mikroskop altında X 40 büyütmede uygulandı. Kesim işlemi iç hücre kitlesinin zıt kutbunda yer alan blastosisti çepeçevre kuşatan trofektoderm hücrelerinde Şekil-7'de görüldüğü gibi uygulandı. Kesim işlemi

miromanipülâtörün vertikal hareketinden yararlanarak gerçekleştirildi. Kesimden sonra blastosistler yıkama medyumuna içerisine aktarıldıktan sonra, tekrar normal formlarını kazanmaları için kültür medyumuna aktarıldılar. Biyopsi işlemi sonrası DNA kontaminasyonu olmaması için kullanılan mikro bıçak ise sırasıyla distile su, %70 etanol ve biyopsi medyumuna ile yıkanarak temizlendi.



Şekil-7: Trofektoderm biyopsi uygulaması

Biyopsi Sonrası *In Vitro* Kültür

Biyopsi sonrası *in vitro* embriyo gelişimlerinin değerlendirilebilmesi için bütün embriyolar embriyo kültür medyumuna transfer edildi. *In vitro* embriyo kültür medyumuna olarak 4 mg/ml BSA eklenmiş SAGE-QBM kullanıldı. Embriyolar blastomer biyopsisi ve trofektoderm biyopsisi sonrasında sırasıyla 48 saat ve 24 saat boyunca %5 CO₂, %5 O₂, 37°C ve yüksek nem koşullarına sahip inkübatörde kültür edildi ve süreç sonunda *in vitro* gelişim oranları değerlendirildi

Toplam Hücre Sayısının Floresan Boyama ile Belirlenmesi

Tüm manipülasyonlar sonrası gelişen blastosistlerin gelişim kalitesinin değerlendirilmesi için, iç hücre kitlesi ve trofektoderm toplam hücre sayıları, floresan DNA boyama tekniği (Hoechst 33342; B-2261) ile boyama sonrasında, floresan mikroskop altında belirlendi. Lam üzerinde 100 µl'lik bir floresan boya damla ve ortam ışığından korumak için alüminyum folyolar hazırlandı. *In vitro* kültür ortamında blastosist aşamasındaki embriyolar seçilerek ağız kontrollü pipet seti ile hazırlanan damlalara aktarıldıktan sonra, üzerleri alüminyum folyo ile kapatılarak karanlık ortamda 10 dakika

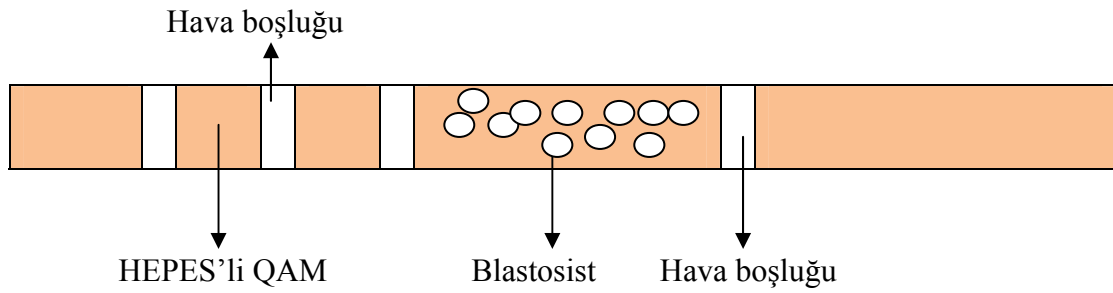
bekletildi. Bu sürenin sonunda mikroskop altında 100 µl'lik damlalara 3-5 µl boya damlatıldıktan sonra üzerleri lamel ile kapatıldı. Floresan aydınlatmalı Zeiss/Axiovert mikroskop altında toplam hücre sayımları yapıldı (25, 77).

Embriyoların Transferi

Akşamdan bireysel kafeslerde vazektomize erkek ile çiftleştirilmeye bırakılan genç erişkin CD-1 fareler, ertesi sabah seminal sıvının pıhtılaşması ile oluşan beyaz renkli vajina içini doldurmuş pıhtı (vajinal plak) açısından kontrol edildi. Vajinal plak gözlenen fareler 0-0,5günlük kabul edildi ve bunu izleyen 4. ya da 4,5. gün uterus embriyo transferi için kullanıldı. Blastosist aşamasına kadar bekletilen biyopsi yapılmış embriyolar, *in vivo* gelişim ve implantasyon oranlarının değerlendirilmesi için, alıcı CD-1 anne farelere transfer edilerek implantasyon oranları değerlendirildi. Transfer operasyonunda kullanılan bütün cerrahi malzemeler (2 makas, 4 adet oftalmik pens ve portekü) kullanımdan önce %70'lik etanol ile sterilize edildi. Embriyo transferi için alıcılarda anestezi sağlamak amacıyla 4,1 ml %0,9 serum fizyolojik + 0,4 ml Ketamin (100 mg/ml) + 0,5 ml Rompun (23,32 gr/ml)'dan oluşan 5 ml'lik ana kombine anestezik solüsyon hazırlandı. Alıcılara i.p. enjeksiyonla 10 ml/kg dozda anestezik solüsyon uygulandı. Patellar ve oküler refleks kontrolü ile yeterli anestezi derinliğinin sağlanıp sağlanmadığı kontrol edildi. Anesteziye alınan farelerin hipotermiye girmemesi için fareler ısıtıcı tabla üzerine konuldu ve göz kornealarının ışıktan zarar görmemesi maksadıyla birer damla %0,9 fizyolojik serum damlatıldı. Embriyo transferi için, regio fossa para lumbalis deksterde, deriye 1 cm genişliğinde ensizyon yapıldı. Deri altı periton duvarındaki damarları kesmemeye özen gösterilerek 0,5 cm genişliğinde ensizyon yapılarak karın boşluğuna ulaşıldı. Pens yardımı ile uterus, vücut dışına çıkarıldı. Ovidukt ve etrafında lipid doku cerrahi klips yardımıyla sabitlendi. Transfer edilecek blastosist aşamasındaki embriyolar petri kabı içerisindeki 3 farklı damlada yıkandıktan sonra, embriyolar borosilikatli cam pipet içerisine Şekil-8' de görüldüğü gibi yüklendi. Embriyo transferi yapılacak alıcı fare stereo mikroskop altında ve dokuların ısıdan zarar görmesine engel olmak için Photonic PI 2000'e monte edilmiş Nikon Lf10 tarafından soğuk ve beyaz özellikteki ışık kaynağı ile aydınlatıldı. Kornu uteriye insülün iğnesi ile punksiyon yapıldı ve bu boşluktan ağız kontrollü cam pipete yüklenmiş embriyolar mikroskop altında embriyoların verildiğinden emin olunacak şekilde

transfer edildi. Periton duvarı ve dış deri 4.0 emilebilir krom kat küt ile basit ayrı dikişle kapatıldı.

Operasyon sonrası oluşabilecek hipotermiyi önlemek ve gözlem yapabilmek için fareler Vetario yoğun bakım kabininde 1-2 saat bekletildikten sonra, uyanma sonrası temiz altlıklı bireysel kafes sistemine alındı. Transfer günü embriyonun 4,5-5. gelişim günü olarak kabul edildi ve 13-15. günlerde *in vivo* gelişim oranlarının değerlendirilmesi için alıcı fareler sakrifeye edildikten sonra, implantasyon değerlendirilmesi yapıldı.



Şekil-8: Embriyo transfer pipeti

Sonuçların İstatiksel Değerlendirilmesi

Sonuçların istatiksel değerlendirilmesinde MS Windows için geliştirilen SPSS Statistics 17.0 programı kullanıldı. Gruplar arası farkın kontrolü için ANOVA ve bağımsız T Testleri uygulandı.

BULGULAR

Blastomer aspirasyon biyopsisi grubunda kullanılan 152 adet sekiz hücreli embriyo ile kontrol grubunda kullanılan 63 adet sekiz hücreli embriyo *in vitro* kültür medyumuna aktarıldı ve 48 saat süreyle %5 CO₂, %5 O₂, 37°C ve yüksek rutubet koşullarına sahip inkübatörde kültür edildi. *İn vitro* kültür sonrasında (Şekil 9-10), deney grubunda 121 (%81,02±13,61) ve kontrol grubunda 62 adet (%96,37±3,17) blastosist gelişimi gözlemlendi (Tablo-1). Blastomer biyopsi *in vitro* kültür gelişim oranları kontrolle arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (P>0,05). Blastomer aspirasyon biyopsi grubunda toplam ortalama hücre sayısı ortalama 50±6,00 bulunurken, kontrol grubunda toplam hücre sayısı ortalama 50±10,39 olarak belirlendi (Tablo 1) ve yapılan istatistiksel değerlendirmede gruplar arasında fark saptanmadı (P>0,05). Blastomer biyopsi ve kontrol gruplarında gelişen blastosistlerin, floresan boyanma sonrası görüntüsü Şekil-13 ve Şekil-14'te görülmektedir.

Tablo-1: Blastomer Biyopsi ve Kontrol Gruplarında *İn Vitro* Gelişim Değerlendirme

Grup	Embriyo Sayısı (n)	<i>İn Vitro</i> Gelişen Embriyo Sayısı (%)	Ortalama Hücre Sayısı
Blastomer Biyopsi	152	121 ^a (%81,02±13,61)	50±6,00 ^a
Kontrol	63	62 ^a (%96,37±3,17)	50±10,39 ^a

^{ab} Aynı kolonda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0.05)

Trofektoderm kesim biyopsisi grubunda kullanılan 79 blastosist ile kontrol grubunda kullanılan 28 blastosist *in vitro* kültür medyumuna aktarıldı ve 24 saat süreyle %5 CO₂, %5 O₂, 37°C koşullarına sahip inkübatörde kültür edildi. *İn vitro* kültür sonrasında (Şekil 11-12), deney grubunda 69 (%86,96±2,39) ve kontrol grubunda 23 (%93,33±11,54) blastosist gelişimi gözlemlendi (Tablo-2). Trofektoderm biyopsi *in vitro* kültür oranları kontrolle arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (P>0,05) Trofektoderm biyopsi grubunda toplam hücre sayısı ortalama 26,66±5,770 iken kontrol grubunda toplam ortalama hücre sayısı 55,33±11,015 olarak belirlendi (Tablo 2) ve yapılan istatistiksel değerlendirmede gruplar arasında fark önemli bulundu (P<0,05). Blastomer biyopsi ve kontrol gruplarında gelişen blastosistlerin, floresan boyanma sonrası görüntüsü Şekil-15 ve Şekil-16'da görülmektedir.

Tablo-2: Trofektoderm Biyopsi ve Kontrol Gruplarında *İn Vitro* Gelişim Değerlendirme

Grup	Embriyo Sayısı (n)	<i>İn Vitro</i> Gelişim Embriyo Sayısı (%)	Ortalama Hücre Sayısı
Trofektoderm Biyopsi	79	69 ^a (%86,96±2,39)	26,66±5,770 ^b
Kontrol	28	23 ^a (%93,3±11,54)	55,33±11,015 ^a

^{ab} Aynı kolonda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0.05)

Blastomer biyopsi ve kontrol gruplarında gelişen ve transfer için seçilen sırasıyla 36 ve 30 adet blastosist, grup başına 3'er adet vajinal plak saptanmış alıcı CD1 farelerin uteruslarına 4. günde transfer edildi. *İn vivo* gelişim oranlarının değerlendirilmesi için 13-15. günlerde alıcı fareler sakrifiye edildi. Daha sonra implantasyon alanlarının değerlendirilmesi yapıldı. Blastomer biyopsi grubunda uterusu embriyo transferi sonucunda 9 adet (%25,00) implantasyon bölgesi saptanırken, bu bölgelerden sadece 7 (%19,44) adedinde fetal gelişim gözlemlendi. Kontrol grubunda ise 8 adet (%26,66) implantasyon bölgesi gözlemlenirken, bu bölgelerden sadece 6 (%20,00) adedinde fetal gelişim saptandı (Tablo-3). *İn vivo* gelişimi değerlendirmek için yapılan embriyo transferi sonuçları olarak, implantasyon alanları kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilemedi (P>0,05). Fetal gelişim oranları kontrolle karşılaştırıldığında benzer sonuçlar bulundu (P>0,05).

Tablo-3: Blastomer Biyopsi ve Kontrol Gruplarında *İn Vivo* Gelişim Değerlendirme

Grup	Transfer Edilen Blastosist Sayısı	İmplantasyon Bölge Sayısı (%)	Fetal Gelişim Bölge Sayısı (%)
Blastomer Biyopsi	36	9 (%25,00) ^a	7 (%19,44) ^a
Kontrol	30	8 (%26,66) ^a	6 (%20,00) ^a

^{ab} Aynı kolonda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0.05)



Şekil-9: Blastomer biyopsi grubundan gelişen blastosistler



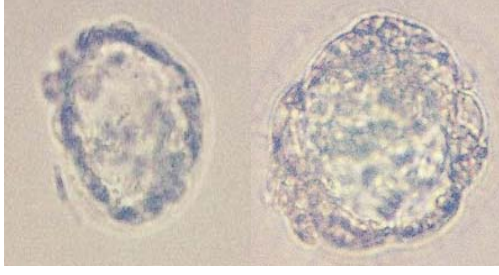
Şekil-10: Kontrol grubundan gelişen blastosistler

Trofektoderm biyopsi ve kontrol gruplarında gelişen ve transfer için seçilen sırasıyla 32 ve 22 adet blastosist grup başına 3'er adet vajinal plak saptanan alıcı CD1 farelerin uteruslarına 4. günde transfer edildi. *İn vivo* gelişim oranlarının değerlendirilmesi için 13-15. günlerde sakrifiye edilen alıcı farelerde implantasyon alanlarının değerlendirilmesi yapıldı. Trofektoderm biyopsi grubunda uterusu embriyo transfer sonucunda 7 adet (%21,88) implantasyon bölgesi saptanan ve bu bölgelerin fetal gelişim meydana gelmemiştir (%0,00) gözlemlendi. Kontrol grubunda ise 13 adet (%59,09) implantasyon bölgesi gözlenirken, bu bölgelerden sadece 4 (%18,18) adedinde fetal gelişim saptandı (Tablo-4). *İn vivo* gelişimi değerlendirmek için yapılan embriyo transferi sonuçları olarak, implantasyon alanları kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0,05$). Fakat fetal gelişim oranları anlamlı bir fark tespit edildi ve biyopsi grubunda hiç fetal gelişim meydana gelmediği gözlemlendi ($P<0,05$).

Tablo-4: Trofektoderm Biyopsi ve Kontrol Gruplarında *İn Vivo* Gelişim Değerlendirme

Grup	Transfer Edilen Blastosist Sayısı	İmplantasyon Bölge Sayısı (%)	Fetal Gelişim Bölge Sayısı (%)
Trofektoderm Biyopsi	32	7 (%21,88) ^a	0 (%0,00) ^b
Kontrol	22	13 (%59,09) ^a	4 (%18,18) ^a

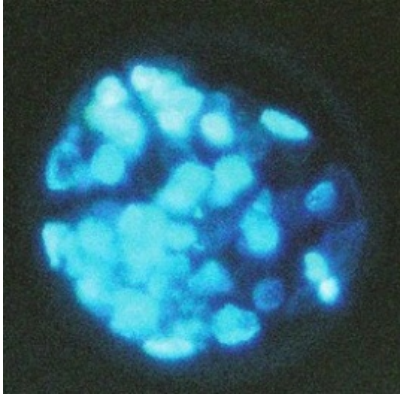
^{ab} Aynı kolonda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$)



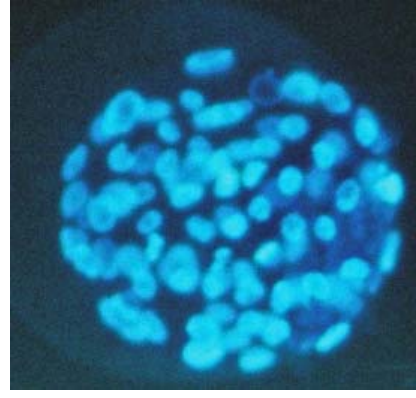
Şekil-11: Trofektoderm biyopsi grubundan gelişen blastosistler



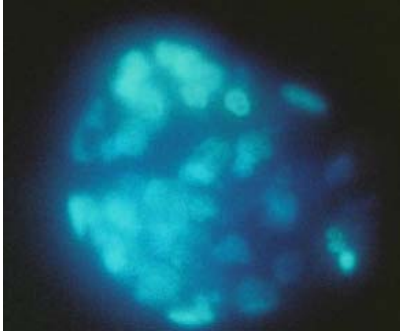
Şekil-12: Kontrol grubundan gelişen blastosistler



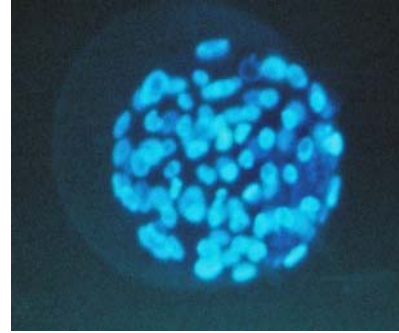
Şekil-13: Blastomer biyopsi grubundan gelişen blastosistin floresan boyama sonrası toplam hücre sayımı



Şekil-14: Kontrol grubundan gelişen blastosistin floresan boyama sonrası toplam hücre sayımı



Şekil-15: Trofektoderm biyopsi grubundan gelişen blastosistin floresan boyama sonrası toplam hücre sayımı



Şekil-16: Kontrol grubundan gelişen blastosistin floresan boyama sonrası toplam hücre sayımı

TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda üreme biyoteknolojisi alanındaki çalışmalar özellikle, IVF sistemlerinden elde edilen embriyoların genetik tanısına olanak sağlanmış ve buradan elde edilen bilgiler ışığında, yavru elde edilecek embriyo transfer yöntemleri uygulanmıştır. Yardımcı üreme teknolojisinde özellikle mikroenjeksiyon, ICSI ve embriyo disseksiyonunda mikromanipülasyon teknikleri, insan tüp bebek çalışmalarında ve hayvan üreme biyoteknolojisi alanlarında geniş çapta kullanılmıştır.

Sunulan çalışmada, fiziksel yöntemlerden, sekiz blastomerli embriyolara aspirasyon biyopsisi ve blastosistlere uygulanan trofektoderm biyopsisi ile örneğin alınması sonrası, *in vitro* gelişim oranları, kalitesi ve alıcı farelere embriyo transferleri sonrası *in vivo* implantasyon bölgeleri ve fetal gelişim oranları araştırılmıştır.

Embriyolarda biyopsi uygulamalarının farklı dönemlerde ve farklı teknikler uygulanarak yapılmasının fetüsün doğum oranları üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Bu etkilerin nedenleri arasında yer alan; kullanılan tekniklerin birbirine avantaj ve dezavantajlarının ortaya konması, bu konudaki çalışmalara katkıda bulunacaktır. Yapılan bazı çalışmalarda, biyopsi yapılmış embriyoların transferi sonrası kontrol gruplarından daha düşük sonuçlar elde edilmiştir (18, 75).

Bu çalışmada, fare embriyolarında, sekiz hücreli aşamada blastomer biyopsi ve kontrol (biyopsi yapılmamış) gruplarında ve blastosist aşamasındaki embriyolarda trofektoderm biyopsi ve kontrol (biyopsi yapılmamış) gruplarında *in vitro* gelişim oranları sırasıyla %81,02, %96,37, %86,96 ve %93,33 bulunurken, gelişen embriyolardaki toplam hücre sayıları 50, 50, 26,66 ve 55,33 bulunmuştur. Yine aynı sırayla transfer sonrası implantasyon oranı %25,00, %26,66, %21,88 ve %59,09 olarak saptanırken, fetal gelişim oranı %19,44, %20,00, %0,00 ve %18,18 olarak elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan biyopsi tekniklerinin *in vitro* gelişim oranlarını etkilediği gözlenmesine karşın, blastomer aspirasyon tekniğinin toplam hücre sayısı ve implantasyon oranları açısından kontrol grubuyla benzer olduğu, trofektoderm biyopsi tekniğinin ise toplam hücre sayısı ve *in vivo* fetal gelişim oranları açısından kontrol grubundan daha düşük sonuç verdiği saptanmıştır.

Memeli embriyolarında biyopsi işlemi ilk kez fare embriyolarında uygulanmıştır (4, 78). Bu konuyla ilgili olarak Monk ve Handyside (12), sekiz hücreli fare embriyolarında blastomer aspirasyonu yaptıktan sonra blastosist gelişimi elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Blastomer biyopsisinde canlılığı sürdürmedeki temel zorluk, blastomerler arası artan hücresel bağlantılar ile blastomerlerin birbirlerine tutunarak kompakt bir yapı oluşturmalarıdır. Bunun sonucunda embriyo biyopsi süresi uzamakta ve elde edilen blastomerlerin büyük çoğunluğu yıkılmaktadır (79). Bu durumu dikkate alan bazı araştırmacılar hücreler arası bağı gevşetmek ve manipülasyonları kolaylaştırmak amacıyla Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen biyopsi medyumunu kullanımını gündeme getirmişlerdir (20, 44, 54, 73, 74). Biyopsi prosedüründe Ca^{2+} içeren biyopsi medyumları da kullanılmaktadır (34). Sunulan çalışmada kullanılan Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen biyopsi medyumunu hücreler arası bağı temel unsuru olan tight junctionların bütünlüğünü bozduğu için hücreler arası bağlantılar zayıflamış ve 2-3 dakika gibi kısa bir sürede blastomerler kolaylıkla elde edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen medyumların biyopsi işleminde kullanılmasının *in vitro* gelişimi olumsuz etkilenmediğini ortaya koymuştur.

Yardımcı üreme tekniklerinde, farelerde PGT'i amaçlı blastomer aspirasyon biyopsi tekniklerinin kullanıldığı çalışmalardan (6, 9, 75, 79) elde edilen aspire embriyoların *in vitro* canlılık oranları sunulan çalışmadan elde edilen oranlarla benzer bulunmuştur.

Wilton ve Trounson (75), dört hücreli fare embriyolarından tek bir blastomeri aspirasyon biyopsi tekniğiyle almanın *in vitro* gelişim üzerine olumsuz etki yapmadığını gözlemlemişler ve 48 saatlik kültür sonrasında *in vitro* gelişim oranlarının biyopsi grubunda %94, kontrol grubunda %98 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, alıcı farelere transfer edildikten sonra biyopsi yapılmış embriyoların *in vivo* gelişim oranı kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (sırasıyla %53,1 ve %81,8).

Bodo ve arkadaşları (47), sekiz hücreli fare embriyolarında uyguladıkları biyopsi çalışmasında, biyopsi ve kontrol gruplarından gelişen blastosist oranları arasında istatistiksel olarak fark bulunmadıklarını bildirmişlerdir. Biyopsi grubundaki hücre sayıları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, daha az olmasından dolayı biyopsi grubunda geç gelişim gözlenmiştir. Aynı şekilde, implantasyon oranlarında farklılık bulunmamasına karşın,

gebeliğin 9. gününde uterusu biyopsi yapılmış embriyoların gelişiminin 12-24 saat geciktiği görülmüştür. Bu çalışmada yer alan blastomer biyopsi grubu ve kontrol grubu arasında, *in vitro* blastosist gelişimi, toplam hücre sayısı ve *in vivo* gelişim açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P<0,05$). Takeuchi ve arkadaşları (80), üç farklı teknik olan enükleasyon, aspirasyon ve çıkarma (PZD) teknikleri kullanarak, bu tekniklerin dört ve sekiz hücreli aşamadaki biyopsi sonrası gelişim üzerine etkilerini araştırmışlar ve %94,6, %96,7 (kontrol); %80,7, %89,1 (enükleasyon pipeti); %90,1, %91,7 (asid tirod ile aspirasyon); %83,1, %91,5 (PZD yapılması sonrası pipet ile çıkarma). Dört ve sekiz hücreli dönemde biyopsi sonrası gelişim farklılıkları gözlememişlerdir. Enükleasyon grubunda diğer iki tekniğe göre daha düşük gelişim meydana gelmiştir.

Krzyminska ve arkadaşları (6), dört, sekiz ve morula aşamasındaki fare embriyolarında biyopsi sonrası *in vitro* ve *in vivo* gelişimi araştırmışlardır. Biyopsi medyumunu olarak 5-7,5 µg/ml sitohalazin B + 3 mg/ml BSA ile takviye edilmiş Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen HEPES tamponlu HTF medyumunu kullanılmıştır. Biyopsi uygulaması öncesi embriyolar blastomerler arası bağların zayıflatılması ve kompaktlaşmanın önlenmesi için 20-30 dakika süreyle biyopsi medyumunda bekletilmiştir. Çalışma sonucunda sekiz hücreli aşamada yapılan uygulamanın en az zarar verdiği bildirilmiştir. Sekiz hücreli aşamada biyopsi grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *in vitro* gelişim ve implantasyon oranları sırasıyla %95 ve %99 ile %71 ve %71 olarak birbirinden farksız bulunmuştur. Çalışmamızda anılan çalışmaya benzer şekilde 5 µg/ml sitohalazin B + 3 mg/ml BSA ile takviye edilmiş Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen HEPES tamponlu HTF medyumunu biyopsi medyumunu olarak kullanılmıştır. Yine benzer şekilde biyopsi uygulaması öncesi embriyolar blastomerler arası bağların zayıflatılması ve kompaktlaşmanın önlenmesi için 30 dakika süreyle biyopsi medyumunda bekletilmiştir. Sunulan çalışmada sekiz hücreli aşamada uyguladığımız aspirasyon tekniğinden elde edilen embriyo gelişim oranları ile Krzyminska ve arkadaşlarının (6) çalışmasındaki gelişim oranları ile benzer bulunmuştur.

Agca ve arkadaşları (81), *in vitro* üretilmiş sığır embriyolarına biyopsi, yapmış ve biyopsi sonrası embriyoları (cinsiyet tayini) vitrifikasyon ile dondurmuş-çözündürülmüş ve çözündürülen embriyoların *in vivo* kültür gelişimlerini araştırmışlardır. Biyopsi için 5 günlük ileri gelişim dönemindeki morulalar kullanılmıştır. Embriyolar biyopsi uygulaması öncesi %0,1-0,3 koyun serum albümini içeren steril medyum ile 3 kez yıkanmıştır. DNA

kontaminasyonu olmaması için medyum içerisinde farklı türün BSA'sı kullanılmamıştır. Tutucu pipet ile sabitlenen embriyonun zona pellusidasına cam pipet ile kesik atılmış ve iç çapı 50-60 µm'lik aspirayon pipeti ile kesik zona pellusida içerisinde 2 veya 3 blastomer izole edilmiştir. Bu blastomerlerden cinsiyet tayini yapılmıştır. Embriyolar vitrikasyon tekniği ile dondurularak saklanmıştır. Vitrikiye biyopsi embriyolardan çözündürme sonrası %85 (70/82) canlılık oranı elde edilmiştir. *In vitro* üretim sonucu 3 farklı manipülasyon gören embriyoların gebelik oranları vitrikiye biyopsi grubu için %44, kontrol grubu için %50 ve vitrikiye grubu grubu için %23 olarak bulunmuştur.

Park ve arkadaşları (82), sekiz hücreli sığır embriyolarında blastomer biyopsi uygulamasının blastosist gelişimini olumsuz etkilemediğini bildirmişlerdir. Çalışma ile blastomer aspirasyon grubu ve kontrol grubu blastosist gelişim oranları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır ve araştırmacılar bu tekniğinin sığır embriyolarında da kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde sekiz hücreli fare embriyolarında blastomer biyopsisinin blastosist gelişimini olumsuz etkilemediği görülmüştür.

Trofektoderm biyopsisi farklı yollarla uygulanmıştır. Summers ve arkadaşları (7), marmoset maymun embriyolarında trofektoderm biyopsisi sonrası *in vivo* embriyo gelişimini araştırmışlardır. Araştırmacılar, mikromanipülasyon teknikleri kullanılarak iç hücre kitlesinin zıt yönünde zona pellusidada bir yırtık oluşturmuşlardır. Manipülasyondan 24 saat sonra, embriyoların %20'sinde; 48 saat sonrasındaysa %50'sinde yapılan yırtıktan fitikleşme olmuştur. Fitikleşen trofektoderm hücreleri fitik boynundan kesilmiş ve embriyolar alıcılara transfer edilmiştir. Sunulan tez çalışmasında bu yöntemi kullanılmamıştır. Çalışmamızda fitik oluşturmada iç hücre kitlesinin zıt yönündeki trofektoderm hücrelerinin direkt kesilmesi şeklinde uygulama yapılmıştır.

Wang ve arkadaşları (18), fare morula ve blastosistlerinde mikro bıçakla iki eşit parçaya böldükleri embriyoların gelişim kapasitelerini araştırmışlar ve *in vitro* gelişim oranını blastosist aşamasında yapılan biyopsi grubunda morula aşamasında yapılan biyopsi grubuna göre daha yüksek bulmuşlardır. İkiye ayrılmış embriyolardan gelişen blastosistlerden elde edilen hücre sayısı kontrol olarak kullanılan bütün embriyodaki hücre sayısının yarısı olarak saptanmıştır. Bildirilen çalışmada, implantasyon oranı ikiye

bölünmüş embriyolarda kontrol grubuna oranla biraz düşükken, fetüs gelişiminde bu düşüş ciddi anlamda oluşmuştur.

Ayrıca De Boer ve arkadaşları (83), insan embriyolarında 5. ve 6. gün blastosistlerde biyopsi uygulaması sonrası, embriyoların dondurularak bankalarda saklanması sırasında, genetik testlerinin yapılabileceğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, bu dönemde çalışmanın avantajı olarak, bölünme aşamasından gebeliğe kadar geçen aşamadaki değişimlerin elimine edilebilmesi olanağının olduğunu bildirmişlerdir.

Bredbacka ve arkadaşları (21), IVF ile üretilmiş sığır blastosistlerinde trofektoderm mikro bıçak biyopsi protokolünü uygulamışlardır. Biyopsi çalışma damlaları 100-200 µl'lik PBS'ten oluşturulmuş ve içerisine yapışmayı önlemek amacıyla 6 mg/ml polivinilpirrolidon (PVP) eklenmiştir. Çalışmamızda olduğu gibi embriyoların hareketini sınırlamak ve kontrol altına almak için mikro bıçak ile petri yüzeyine 4-8 adet paralel çizik yapılmış ve bu bölgeye blastositler yerleştirilmiştir. Biyopsi, blastosistin 30 µm'lik bölgesinde yapılmıştır. Mikro bıçak ile blastosistin orta bölgesinden yavaş hareket ile aşağıya doğru baskı sonrası, iç hücre kitlesinin zıt yönüne doğru trofektodermden biyopsi parçası ayrılmıştır. Alınan biyopsi parçası embriyonun %15'inden daha küçük olmuştur. Biyopsi uygulaması alınan parçadan cinsiyet saptanmış ve canlı kalan embriyolar ile embriyo transferi yapılmıştır. Biyopsi yapılan 24 blastosistten transfer sonrası 14 adet (%58) yavru elde edilmiştir.

Huhtinen ve arkadaşları (84), biyopsi yapılmış at embriyolarının transferi üzerinde araştırma yapmışlar, 6 ve 7 günlük 14 adet blastositine mikro bıçak biyopsisi uyguladıktan sonra, cerrahi olmayan yöntem ile embriyoları alıcılara transfer etmişlerdir. Biyopsi materyali cinsiyetin saptanması amacıyla PZR'da yapılmıştır. Biyopsi grubunda 14 transferden 3 gebelik ve kontrol grubunda 8 transferden 6 gebelik elde edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, sığır blastosistlerini ikiye ayırma veya trofektoderm biyopsi yöntemleri kullanılarak %50-60 oranında kontrole benzer *in vitro* gelişim sonuçları elde edildiği bildirilmiştir (85). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar tez çalışmasındaki trofektoderm biyopsi grubunda elde edilen *in vitro* gelişim oranı ile benzer bulunmuştur.

Peippo ve arkadaşları (86), mikro bıçak kullanarak 7. ve 8. gün sığır embriyolarında trofektoderm biyopsisi yapmışlardır. Biyopsi öncesi her embriyonun 150 µl'lik damlalarda en az 5 kez yıkanarak petri yüzeyine yapışması sağlanmış ve mikro bıçağın vertikal hareketi ile trofektodermden bir parça alınmıştır. Çalışmada embriyolar, alınan parçanın embriyo çapının oranına göre $<20\%$ ve $\geq 20\%$ olmak üzere iki gruba ayrılarak değerlendirilmiştir. Biyopsi yapılan 74 embriyodan 24 saat süren kültür sonrasında toplam 70 adet blastosist (% 94,6) canlılıklarını sürdürmüştür. Biyopsi çapına göre değerlendirildiğinde $<20\%$ az olan grupta % 97,6 ve $\geq 20\%$ olan grupta % 90,6 gelişim oranı elde edilmiştir. Söz konusu çalışma sonucunda, biyopsi yapılan kısmın tüm blastosiste oranına bağlı olarak canlılık oranının etkilenebileceği kanısına varılmıştır.

Dokras ve arkadaşları (87), insan ve fare embriyolarının mikro manipülasyon uygulama kolaylığı ve canlılık oranları açısından, zona pellusidaları karşılaştırıldığında, insan blastositlerinin kesiklere karşı daha dirençli olduğu bilgisini vermiştir. McArthur ve arkadaşları (88), 1050 insan blastosistine uyguladıkları trofektoderm biyopsi sonrasında, 974 adet blastosistin (%93) canlılıklarını sürdürdüklerini saptamışlardır.

Sunulan çalışmada, blastosist aşamasındaki embriyolara yapılan trofektoderm biyopsisi sonrası *in vitro* kültür oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P>0,05$). Ancak, gelişen blastosistlerin ortalama toplam hücre sayıları kontrolle karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). *In vivo* gelişimi değerlendirmek için yapılan embriyo transferi sonuçlarına göre, trofektoderm biyopsi grubundaki implantasyon alanları kontrolle karşılatıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Fakat, biyopsi grubunda hiçbir fetal gelişim meydana gelmemiş ve fetal gelişim oranları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. ($P<0,05$). Trofektoderm biyopsi grubunda fazla sayıda hücre kaybı nedeni ile fetal gelişimin oluşmadığı düşünülmektedir. Blastomer biyopsi grubunda, *in vitro* kültür sonrası gelişim oranları kontrolle karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($P<0,05$). Gelişen blastosistlerin toplam hücre sayıları kontrolle karşılaştırıldığında benzer sonuçlar bulunmuştur ($P<0,05$). *In vivo* gelişimi değerlendirmek için yapılan embriyo transferi sonuçlarında da, benzer şekilde, blastomer biyopsi grubunun implantasyon oranı ve fetal gelişim oranı kontrol grubundakilerle karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı fark bulunmamıştır ($P<0,05$).

Sonuç olarak, implantasyon öncesi genetik analiz için verilecek biyopsi materyali alınacak embriyonun uygulama aşaması ve embriyo transferi yapılmadan hızlı ve doğru bir şekilde sonuçların elde edilmesi amaçlanmalıdır. Blastosist aşamasındaki fare embriyolarında yapılan trofektoderm biyopsisinde, çok sayıda hücre ile moleküler analizlerin yapılması, testin doğruluğunu ve güvenilirliğini artırsa da, *in vitro* gelişim sorunları nedeniyle ortaya çıkabilecek komplikasyonlar göz ardı edilmemelidir.

Fetal gelişimin sağlıklı olması bakımından embriyo üzerinde yapılan manipülasyonlarda en az zararın verilmesi ana kuraldır. En çok kullanılan ve çalışmamızda karşılaştırılan, blastomer ve trofektoderm biyopsi yöntemlerinden, uygulama kolaylığı ve sonuçlarının üstünlüğü nedeniyle farelerde blastomer aspirasyon tekniği ön plana çıkmaktadır. Çalışmanın sonucunda, bu tekniğin özellikle *in vitro* embriyo üretimi yapılan durumlarda, uygulama kolaylığı ve *in vitro/in vivo* gelişim oranlarının kontrole göre benzer sonuçlar vermesi nedeniyle, diğer çiftlik hayvanları ve insan embriyolarının biyopsi çalışmalarında da kullanılabilir olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. CHANG MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, 466–467, 1959.
2. PINCUS G, ENZMANN EV. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. *Journal Morphology*, 351-383, 1937.
3. YANAGIMACHI R, CHANG MC. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature*, 200:281-282, 1963.
4. TARKOWSKI AK. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature*, 184: 1286 –1287, 1959.
5. GARDNER RL, EDWARDS RG. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature*, 218: 346-348, 1968.
6. KRZYMINSKA UB, LUTJEN JO, NEIL C. Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. *Human Reproduction*, 5: 203–208, 1990.
7. SUMMERS PM, CAMPBELL JM, MILLER MW. Normal in-vivo development of marmoset monkey embryos after trophectoderm biopsy. *Human Reproduction*, 3: 389-393, 1988.
8. HARDY K, MARTIN KL, LEESE HJ, WINSTON RM, HANDYSIDE AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Human Reproduction*, 5(6): 708-714, 1990.
9. WILLADSEN SM. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *Journal Of Reproduction And Fertility*, 59: 57–62, 1980.
10. ILLMENSEE K, KASKAR K, ZAVOS P. In-vitro blastocyst development from serially split mouse embryos and future implications for human ART. *Fertility Sterility*, 86: 1112–1120, 2006.
11. HANDYSIDE AH, DELHANTY JDA. Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. *Trends Genetics*, 13: 270-275, 1997.
12. MONK M, HANDYSIDE AH. Sexing of pre-implantation mouse embryos by measurement of x-linked gene dosage in a single blastomere. *Journal Reproduction Fertility*, 82: 365-368, 1987.
13. KUNIEDA T, XIAN M, KOBAYASHI E, IMAMICHI T, MORIWAKI K, TOYODA Y. Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome-specific sequences using polymerase chain reaction. *Biology Reproduction*, 46(4): 692-697, 1992.
14. KOLA I, WILTON L. Preimplantation embryo biopsy:detection of trisomy in a single cell biopsied from a four cell embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 1: 16-21, 1990.
15. YU Y, WU J, FAN Y, LV Z, GUO X, ZHAO C, ZHOU R, ZHANG Z, WANG F, XIAO M, CHEN L, ZHU H, CHEN W, LIN M, LIU J, ZHOU Z, WANG L, HUO R, ZHOU Q, SHA J. Evaluation of blastomere biopsy using a mouse model indicates the potential high risk of neurodegenerative disorders in the offspring. *Molecular Cell Proteomics*, 8(7): 1490-1500, 2009.
16. TUDDENHAM EG, GOLDMAN E, MCGRAW A, KERNOFF PB. Haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis by linkage analysis using DNA polymorphism. *Journal of Clinical Pathology*, September; 40(9): 971–977, 1987.

17. UBAGAI T, KATAYAMA S. DNA analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using pERT87 genomic probes and dystrophin cDNA probes establishing the optimum strategy for carrier diagnosis in the Japanese population. *Jinrui Idengaku Zasshi*, 36(3): 211-212, 1991.
18. WANG ZJ, TROUNSON A, DZIADEK M. Developmental capacity of mechanically bisected mouse morulae and blastocysts. *Reproduction Fertility Development*, 2(6): 683-691, 1990.
19. WILMUT I, HALEY CS, SIMONS JP, WEBB R. The potential role of molecular genetic manipulation in the improvement of reproductive performance. *Journal of Reproduction and Fertility*, 45: 157-173, 1992.
20. BREDBACKA P, BREDBACKA K AND PEIPPO J. Experiences of using PCR for sexing. *Reproduction in Domestic Animals*, 26: 275-77, 1991.
21. BREDBACKA P, KANKAANPÄÄ A, PEIPPO J. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. *Theriogenology*, 15;44(2): 167-176, 1995.
22. İDE T, MÜLAZIMOĞLU B. Deneysel hayvanlarında üreme. 2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu, İzmir, sayfa 122-125, 2010.
23. HARKNESS JE, WAGNER JE. The biology and medicine of rabbits and rodents. Baltimore Williams and Wilkins, page 62-63, 1995.
24. HOGAN B, BEDDINGTON R, COSTANTINI F, AND LACY E. Manipulating the Mouse Embryo (2nd) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Tennessee, page 217-252, 1994.
25. SCHWIEBERT R. The Laboratory Mouse. Laboratory Animals Centre National University of Singapore, page 10-11, 2007.
26. BAGIS H, AKKOC T, TASKIN C, ARAT S. Comparison of different cryopreservation techniques: higher survival and implantation rate of frozen-thawed mouse pronuclear embryos in the presence of beta-mercaptoethanol in post-thaw culture. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6): 332-337, 2010
27. BAGIS H, AKTOPRAKLIGIL D, GUNES C, ARAT S, AKKOC T, CETINKAYA G, KANKAVI O, TASKIN AC, ARSLAN K, DUNDAR M, TSONCHEVA VL, IVANOV IG. Expression of biologically active human interferon gamma in the milk of transgenic mice under the control of the murine whey acidic protein gene promoter. *Biochemical Genetics*, 49(3-4): 251-257, 2010.
28. BAGIS H, ARAT S, TAS AC, AKKOC T, CETINKAYA G, TASKIN AC, TURGUT G, SEKMEN S. ‘‘Yardımcı üreme teknikleri ve transgenik hayvan üretiminde kullanılan yöntemler ‘’uygulamalı eğitim kursu. TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Gebze, sayfa 1-50, 2009.
29. BAGIS H, ODAMAN H, SAGIRKAYA H, DINNYÉS A. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 61(2): 173-179, 2002.
30. BAGIS H, ODAMAN MERCAN H, DINNYES A. Exposure to warmer postoperative temperatures reduces hypothermia caused by anaesthesia and significantly increases the implantation rate of transferred embryos in the Mouse. *Laboratory Animals Journal*. 38(1): 50-54, 2004.
31. BAGIS H, ODAMAN MERCAN H. Effect of chemically defined culture medium supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids on implantation and development of different stage in vivo or in vitro-derived mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 69(1): 52-59, 2004.

32. KILIÇOĞLU C. The in vitro cultivation of mouse ova from one cell to blastocyst. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 32: 301-310, 1995.
33. GARDNER DK, LANE M, WATSON AJ. A Laboratory Guide to The Mammalian Embryo, Oxford, Oxford University Press, page 24-125, 2004.
34. QUINN P, HARLOW GM. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. Journal Experimental Zoology, 206: 73-80, 1978.
35. UMAOKA Y, NODA Y, NARIMOTO K, MORI T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. Molecular Reproduction and Development, 31: 28-33, 1992.
36. BIGGERS JG. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. International Journal of Developmental Biology, 42: 879-884, 1998.
37. BRAS M, LENS JW, PIEDERIJT MH, RIJNDERS, VERVELD M, ZEILMAKER GH. IVF LAB; Laboratory aspects of in-vitro fertilization, Organon Press, Holland, page 111-229 1996.
38. EDWARDS RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. Lancet, 2: 413-926, 1965.
39. EGOZCUE J, SANTALO J, GIMENEZ C, PEREZ N, VIDAL F. Preimplantation genetic diagnosis. Molecular and Cellular Endocrinology, 77: 21-22, 2000.
40. HANDYSIDE AH, LESKO JG, TARIN JJ, WINSTON RM, HUGHES MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. N England Journal Medicine. 24;327(13): 905-909, 1992.
41. LIU J, LISSENS W, SILBER SJ VD. Birth after preimplantation diagnosis of the cystic fibrosis delta F508 mutation by polymerase chain reaction in human embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection with epididymal sperm. Journal American Medicine, 21;272(23): 1858-1860, 1994.
42. PIERCE KE, MICHALOPOULOS J, KIESSLING AA, SEIBEL MM, ZILBERSTEIN M. Preimplantation development of mouse and human embryos biopsied at cleavage stages using a modified displacement technique. Human Reproduction, 12(2): 351-356, 1997.
43. HARE WCD, MITCHELL D, BETTERIDGE KJ, EAGLESOME MD, RANDALL GCB. Sexing two week old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer: preliminary methods and results. Theriogenology, 5: 243-253, 1976.
44. SINGH EL, HARE WCD. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. Theriogenology, 14: 421-427, 1980.
45. WINTENBERGER-TORNES S, POPESCU CP. Transfer of cow blastocysts after sexing. Theriogenology, 14: 309-317, 1980.
46. PICARD L, KING WA, BETTERIDGE KJ. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. Veterinary Record, 117: 603-608, 1985.
47. BODO S, BARANYAI B, GOCZA E, DOHY J, MARKKULA M. Preimplantation genetic diagnosis in cattle: a review. Acta Veterinaria Hungarica, 49(1): 99-109, 2001.
48. SAIKI RK, GELFAND GD, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487-491, 1988.

49. GRIFFIN D, WILTON L, HANDYSIDE A. Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosomespecific probes for sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Human Genetics*, 89: 18–22, 1992.
50. HERR CM, MATTHAEI KI, STEEL T, REED KC. Rapid Y-chromosome assay sexing of peripheral blood lymphocytes from Bovidae of known phenotypic sex. *Theriogenology*, 33: 246, 1990.
51. GIMENES C, EGOZCUR J, VIDAL F. Sexing sibling mouse blastomeres by polymerase chain reaction and fluorescent in-situ hybridization. *Human Reproduction*, 9: 2145-2149, 1994.
52. HANDYSIDE AH, KONTOGIANNI EH, HARDY K, WINSTON RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344: 768-770, 1990.
53. HANDYSIDE AH, PENKETH RJA, WINSTON RML, PATTINSON JK, DELHANTY JDA, TUDDENHAM EGD. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet*, 1: 345-347, 1989.
54. LIU J, LISSENS W, DEVROEY P, STEIRTEGHEM AV, LIEBAERS I. Amplification of X- and Y chromosome- specific regions from single human blastomeres by polymerase chain reaction for sexing of preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 9: 716-720, 1994.
55. SCHRODER A, MILLER JR, THOMSEN PD, ROSCHLAU K, AVERY B, POULSEN PH, SCHMIDT M SCHWERIN M. Sex determination of bovine embryos using the polymerease chain reaction. *Animal Biotechnology*, 1: 121 123, 1990.
56. MULDER LC, SACCO MG, MANGIARINI L, BROWN J, COLLOTTA A, VILLA A, DE GIOVANNI AM, VEZZONI P, CLERICI L. Preimplantation embryo sexing by polymerase chain reaction amplification of the sry gene on single mouse blastomeres. *GATA*; 10: 147-149, 1993.
57. YANO T. Sexing of in vitro-fertilized preimplantation mouse embryos by the PCR method. *Japan Journal Human Genetic*, 38: 277-288, 1993.
58. JAFAR SI, FLINT A PF. Sex selection mammals:a review. *Theriogenology*, 46: 191-200, 1996.
59. APPA RAO KBC, PAWSHE CH, TOTEY SM. Sex determination of in vitro developed buffalo (*Bubalus bubalis*) embryo by DNA amplification. *Molecular Reproduction and Development*, 36: 291-296, 1993.
60. DİLEK TU, ÖKTEM M, YILDIZ A. Preimplantasyon genetik tanı. *T Klinik Jinekoloji Obst* , sayfa 498-503, 2002.
61. GRIFFIN D, WILTON L, HANDYSIDE A. Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosomespecific probes for sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Human Genetics*, 89: 18–22, 1992.
62. HARPER, J. World figures of preimplantation genetic diagnosis. Abstract. Pre-congress meeting of international working group on preimplantation genetic diagnosis. Edinburg, 1997.
63. WELLS D, DELHANTY JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Molecular Human Reproduction*, 6(11): 1055–1062, 2000.

64. ŞENDAĞ S, AYDIN I, ÇELİK HA. İneklerde prenatal embriyonik/föetal cinsiyetin belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2(1) 39-44, 2005.
65. AGOSTONI E. Preimplantation development of the mammalian embryo. Ann. 1.st. Super Sanita, 15-25, 1993
66. GILBERT SF. Developmental Biology, 6th edition, Sinauer Associates, page 50-55, 2000.
67. VERLINSKY Y, GINSBERG N, LIFCHEZ A, VALLE J, MOISE J, STROM CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. , 5(7): 826-829, 1990.
68. MONTAG M, VAN DER VEN K, DELACRÉTAZ G, RINK K, VAN DER VEN H. Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. Fertility Sterility, 69(3): 539-542, 1998.
69. ISACHENKO V, MONTAG M, ISACHENKO E, VAN DER VEN H. Vitrification of mouse pronuclear embryos after polar body biopsy without direct contact with liquid nitrogen. Fertility Sterility, 84(4): 1011-1016, 2005.
70. GORDON JW, TALANSKY BE. Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. Journal of Experimental Zoology. 239(3): 347-354, 1986.
71. VAN DE VELDE H, DE VOS A, SERMON K, STAESSEN C, DE RYCKE M, VAN ASSCHE E, LISSENS W, VANDERVORST M, VAN RANST H, LIEBAERS I, VAN STEIRTEGHEM A. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. Prenatal Diagnosis, 20(13): 1030-1037, 2000.
72. CUI KH, PANNALL P, CATES G, MATTHEWS CD. Blood analysis of mice born following single-cell embryo biopsy. Human Reproduction, 8(11): 1906-1909, 1993.
73. LICCIARDI F, GONZALEZ A, TANG YX, GRIFO J, COHEN J, NEEV Y. Laser ablation of the mouse zona pellucida for blastomere biopsy. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 12(7): 462-466, 1995.
74. SANTALO ET, GROSSMANN M, EGOZCUE J. Does Ca²⁺/Mg²⁺-free medium have an effect on the survival of the preimplantation mouse embryo after biopsy?. Human Reproduction Update, 257-26, 1996.
75. WILTON LJ, TROUNSON AO. Biopsy of preimplantation mouse embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres in-vitro. Biology Reproduction, 40: 145-152, 1989.
76. PARKS JC, MCCALLIE BR, JANESCH AM, SCHOOLCRAFT WB, KATZ-JAFFE MG. Blastocyst gene expression correlates with implantation potential. Fertil Sterility, 15;95(4): 1367-72, 2010.
77. RALL WF. Factors affecting the survival of mouse embryos. Cryobiology, 24: 387-402, 1987.
78. TARKOWSKI AK, WROBLEWSKA J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. Embryology & Experimental Morphology, 18: 155- 80, 1967.
79. DUMOULIN JC, BRAS M, COONEN E, DREESEN J, GERAEDTS JP, EVERS JL. Effect of Ca²⁺/Mg²⁺-free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. Human Reproduction, 13: 2880-2883, 1998.

80. TAKEUCHI K, SANDOW BA, MORSY M, KAUFMANN RA, BEEBE SJ, HODGEN GD. Preclinical models for human pre-embryo biopsy and genetic diagnosis. I. Efficiency and normalcy of mouse pre-embryo development after different biopsy techniques. *Fertility Sterility*, 57: 425–430, 1992.
81. AGCA Y, MONSON RL, NORTHEY DL, PESCHEL DE, SCHAEFER DM, RUTLEDGE JJ. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology*, 1;50(1): 129-145, 1998.
82. PARK JH, LEE JH, CHOI KM, JOUNG SY, KIM JY, CHUNG GM, JIN DI, IM KS. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology*, 1;55(9): 1843-1853, 2001.
83. DE BOER KA, CATT JW, JANSEN RP, LEIGH D, MCARTHUR S. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 82(2): 295-298, 2004.
84. HUHTINEN M, PEIPPO J, BREDBACKA P. Successful transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology*, 48(3): 361-367, 1997.
85. LOPES RF, FORELL F, OLIVEIRA AT, RODRIGUES JL. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*, 1;56(9): 1383-1392, 2001.
86. PEIPPO J, VIITALA S, VIRTA J, RÄTY M, TAMMIRANTA N, LAMMINEN T, ARO J, MYLLYMÄKI H, VILKKI J. Birth of correctly genotyped calves after multiplex marker detection from bovine embryo microblade biopsies. *Molecular Reproduction Development*. 74(11): 1373-1378, 2007.
87. DOKRAS A, SARGENT IL ROSS, C GARDNER, RL. BARLOW, DH. Trophectoderm biopsy in human blastocysts. *Human Reproduction*, 5(7): 821–825, 1990.
88. MCARTHUR SJ, LEIGH D, MARSHALL JT, DE BOER KA, JANSEN RP. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertility and Sterility*, 84(6): 1628-1636, 2005.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın tüm aşamalarını titizlikle izleyen, bilimsel uyarı ve eleştirileriyle yönlendiren ve destek olan danışman hocalarım Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ ve Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Araştırmamda bilimsel önerilerini ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. M. Kemal SOYLU'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Sezen ARAT, Prof. Dr. İbrahim DOĞAN, Prof. Dr. Ülgen GÜnay ve Doç. Dr. Zekariya NUR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Komitesi Üyesi hocam Prof. Dr. Şahsene ANAR'a, TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Hayvan Genetiği ve Üreme Biyoloji personellerine ve manevi desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen eşim Arzu ÜSTÜNEL TAŞKIN'a ayrıca bugünlere erişmemi sağlayan aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1980 Tunceli doğumluyum. İlk ve orta öğrenimini Tunceli’de, lise öğrenimini İstanbul’da, Yüksek lisans eğitimimi 2004 yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde tamamladım. 2005-2008 Yılları arası Kocaeli üniversitesinde Öğretim görevlisi olarak çalıştım.

2009 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’nda doktora öğrencisi ve 2008 yılında TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsünde Araştırmacı olarak göreve başladım. Halen aynı kurumda görevimi sürdürmekteyim. Evliyim.