



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**FERTİLİZASYON SONRASI FARKLI ZAMANLARDA YAPILAN GEN
ENJEKSİYONLARININ TRANSGENİK KOYUN EMBRİYOSU ÜRETİMİNE
ETKİSİ**

Nur ERSOY

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mithat EVECEN**

Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı

Dölerme ve Sun'i Tohumlama Programı

Nisan, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Bir öge seçin.





Beni maddi ve manevi olarak her zaman destekleyen annem Gülferen ERSOY ve anneannem
Müşerref BARCAN'a ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

FERTİLİZASYON SONRASI FARKLI ZAMANLARDA YAPILAN GEN ENJEKSİYONLARININ TRANSGENİK KOYUN EMBRİYOSU ÜRETİMİNE ETKİSİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon

Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 33352

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora yapabilmemi mümkün kılan ve desteklerini her zaman hissettiğim annem Gülferen ERSOY ve babam Muhammet ERSOY'a, annemin okumasını destekleyen ve onun aracılığıyla ailemizin bütün kadınlarının okumasının önünü açan sevgili anneannem Müşerref BARCAN ve rahmetli dedem İsmail BARCAN'a, yine rahmetli dedem İlyas ERSOY'a ve benim yetişmemi sağlayan ailemin diğer üyeleri ve geçmişteki öğretmenlerime;

Başta doktora babam Prof. Dr. Mithat EVECEN'e, her daim beni destekleyen sevgili Prof. Dr. Sema BİRLER'e ve yaptığım tüm çalışmalarda her daim yol gösteren, her alanda yardıma koşan ve doktora çalışmalarımı fiilen yapabilmemi sağlayan Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU'na;

Mesleki olarak bildiğim neredeyse her şeyi bana öğreten ve desteklerine minnettar olduğum meslek büyüklerim; sevgili ağabeylerim Prof. Dr. Kamber DEMİR ve Dr. Ramazan ARICI ve ablam Dr. Selin YAĞCIOĞLU'na;

Çalışmalarımı eş zamanlı yürüttüğüm ve yükümü paylaşan Araş. Gör. Andaç KILIÇKAP'a, çalışmalarına yardımcı olan Vet. Hek. Mamet ÇEŞMECİ ve Vet. Hek. İsra FARIS'e, her çalışmamızda verdiği destek için laborantımız Ayşenur ÇAKIR'a, genetikle ilgili kısımlarda desteğini esirgemeyen Dr. Gökhan GÜN'e, bütün laboratuvar malzemelerimizi istediğimiz gibi hazırlayarak işimizi kolaylaştıran teknisyenimiz Ercan KETENCİ'ye, Gülizar ÇINAR'a, hayvan bakıcılarımız Muzaffer BORA ve İsmail DİNÇER'e;

Kendimi geliştirmek istediğim her alanda destekleyen ve sorularım olduğunda beni asla geri çevirmeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Kemal AK olmak üzere, Prof. Dr. Serhat ALKAN, Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ, Prof. Dr. Alper BARAN, Doç. Dr. Asiye İzem SANDAL, Dr. Ayşe CAN, Vet. Hek. Hatice ŞENLİKÇİ ve Vet. Hek. Georgios PETROVAS'a; Uzakta olsalar da her daim maddi-manevi desteklerini yanımda hissettiğim sevgili doktora kuzenlerim Dr. Ahmet ESER, Vet. Hek. Nilhan COŞKUN ve Vet. Hek. İdil ORUÇ'a, doktora kardeşim ve arkadaşım Vet. Hek. Büşra ÖNDEŞ'e;

Teşekkürü borç bilirim.

Nisan 2022

Nur ERSOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	3
2.1. REPRODÜKSİYON.....	3
2.1.1. Koyunlarda Reprodüksiyon	3
2.1.2. Koçlarda Reprodüksiyon.....	3
2.2. FERTİLİZASYON	4
2.2.1. Fertilizasyonun Aşamaları.....	4
2.2.2. Koyunlarda Fertilizasyonun Ardından Gerçekleşen Olayların Zamanlaması.....	13
2.3. TRANSGENESİS	14
2.3.1. Transgenesisin Kullanım Alanları.....	15
2.3.2. Transgenesis Yöntemleri.....	21
2.3.3. Gen Entegrasyonu Öncesi, Sırası ve Sonrası	27
2.3.4. Transgenesiste İlerlemeler.....	29
2.3.5. Transgenik Canlı Üretiminde Karşılaşılan Problemler	30
3. YÖNTEM	32
3.1. İN VİTRO FERTİLİZASYON PROTOKOLÜ.....	32
3.1.1. Oositlerin Kazanılması ve Olgunlaştırılması (İVM).....	32
3.1.2. Spermanın Hazırlanması ve İn Vitro Fertilizasyon (İVF).....	33

3.2. GENİN HAZIRLANMASI.....	34
3.2.1. Bakterilerin Hazırlanması	34
3.2.2. Gen İzolasyonu.....	35
3.3. GEN ENJEKSİYONLARI	35
3.3.1. Oositlerin Hazırlanması.....	35
3.3.2. Gen Enjeksiyonu	35
3.4. EMBRİYOLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	37
3.5. İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME	37
3.6. KULLANILAN MEDYUMLARIN HAZIRLIĞI.....	38
4. BULGULAR	45
4.1. GELİŞME AŞAMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	45
4.1.1. Üçüncü Saat Gen Enjeksiyonu	45
4.1.2. Beşinci Saat Gen Enjeksiyonu	48
4.1.3. Yedinci Saat Gen Enjeksiyonu.....	51
4.1.4. Dokuzuncu Saat Enjeksiyonu.....	54
4.1.5. Gen Enjeksiyonu Gruplarının Karşılaştırması	59
4.2. FLÖRESAN PARLAMA DURUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ	61
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR.....	72
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	84
ETİK KURUL İZİN YAZISI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2-1: Değişik sistemler tarafından üretilen rekombinant proteinlerin glikolizasyonunun karşılaştırılması (Houdebine 2009)	19
Şekil 2-2: Transgenik hayvan üretiminde kullanılan değişik yöntemler.....	21
Şekil 3-1: Enjeksiyon petrisi, 60'lık petri kapağına hazırlanan şema.....	36
Şekil 3-2: Zigotlara yapılan gen enjeksiyonu örneği.....	37
Şekil 4-1: Üçüncü saat enjeksiyon grubundan hücreler.....	48
Şekil 4-2: Beşinci saat enjeksiyon grubundan hücreler.....	51
Şekil 4-3: Beşinci saat enjeksiyon grubundan hücreler.....	54
Şekil 4-4: Dokuzuncu saat enjeksiyon grubundan hücreler.....	57
Şekil 4-5: Fertilizasyonun ardından 9. saatte yapılan sham enjeksiyon grubunda gelişen hatched blastosist embriyolar.....	58
Şekil 4-6: Negatif kontrol grubunda gelişen hatching ve hatched blastosist embriyolar.....	58

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2-1: Koyunlarda fertilizasyon aşamalarının zamanlaması.....	11
Tablo 2-2: Koyunlarda fertilizasyonun ardından gerçekleşen olaylar.....	14
Tablo 3-1: PBS (Fosfat Buffer Saline).....	38
Tablo 3-2: OWM (Oocyte Washing Medium).....	39
Tablo 3-3: HSOF (HEPES Tamponlu Sentetik Ovidukt Sıvısı).....	40
Tablo 3-4: %90 Percoll SOF.....	42
Tablo 3-5: LB Medyum.....	43
Tablo 3-6: CaCl ₂ Stok.....	43
Tablo 3-7: MgCl ₂ Stok.....	44
Tablo 3-8: Hiyaluronidaz Stok.....	44
Tablo 4-1: Üçüncü saat gruplarındaki hücrelerin yarıklanma durumları.....	46
Tablo 4-2: Üçüncü saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları.....	47
Tablo 4-3: Beşinci saat gruplarındaki hücrelerin yarıklanma durumları.....	49
Tablo 4-4: Beşinci saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları.....	50
Tablo 4-5: Yedinci saat gruplarındaki hücrelerin yarıklanma durumları.....	52
Tablo 4-6: Yedinci saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları.....	53
Tablo 4-7: Dokuzuncu saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin yarıklanma durumları.....	55
Tablo 4-8: Dokuzuncu saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları.....	56
Tablo 4-9: Enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları.....	59
Tablo 4-10: Çalışma gruplarında elde edilen hücrelerin gelişme aşamalarına göre sayısal değerleri.....	60
Tablo 4-11: Enjeksiyon gruplarında yeşil parlama gösteren embriyo sayıları.....	61

Tablo 4-12: Parlayan hücrelerde ortalama değer aralıkları ve ortalamalarının karşılaştırması.....	62
Tablo 4-13: Çalışma gruplarında elde edilen hücrelerin gelişme aşamalarına göre sayısal değerleri ve parlama yüzdeleri (Subjektif bakı).....	63



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
g	: Gram
L	: Litre

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

LH	: Luteinizan Hormon
SOF	: Sentetik Ovidukt Solüsyonu
HsoF	: Hepes’li Sentetik Ovidukt Solüsyonu
PBS	: Fosfat Tamponlu Solüsyon
PVP	: Polivinil Prolidon
OWM	: Oosit Yıkama Medyumu
BSA	: Bovine (Sığır) Serum Albumin
LB	: Luria-Bertani
E.coli	: Escherichia coli
COCs	: Oosit Kumulus Kompleksi
IVF-ET	: İn Vitro Fertilizasyon- Embriyo Transferi
GFP	: Yeşil Flöresan Protein (Green Fleurescent Protein)
pEGFN1	: Plazmid ismi
ZP	: Zona Protein
YAC	: Maya Kaynaklı Yapay Kromozomlar
BAC	: Bakteri Kaynaklı Yapay Kromozomlar
PAC	: Bakteriofaj Kaynaklı Yapay Kromozomlar
ZFN	: Çinko Tetiği (Zinc Finger)
TALEN	: Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleazlar (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)

CRISPR	: Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
SMGT	: Sperm Aracılıklı Gen Transferi (Sperm Mediated Gene Transfer)
ICSI	: İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Intra Cytoplazmic Sperm Injection)
IVM	: İn Vitro Maturasyon
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
IVC	: İn Vitro Kültür



ÖZET

[DOKTORA TEZİ]

[FERTİLİZASYON SONRASI FARKLI ZAMANLARDA YAPILAN GEN ENJEKSİYONLARININ TRANSGENİK KOYUN EMBRİYOSU ÜRETİMİNE ETKİSİ]

[Nur ERSOY]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı

Dölerme ve Sun'i Tohumlama Programı

[Danışman : Prof. Dr. Mithat EVECEN]

[Transgenezis çalışmalarında en başarılı yöntemler uygulansa dahi, embriyoya verilen genin sitoplazmada yıkılma ve genoma entegre olmama ihtimali her zaman vardır ve bu durum hücre içi biyolojik süreçlere bağlı olarak zamanlamadan etkilenmektedir. Çalışmada, transgenik koyun embriyosu üretimi esnasında farklı saatlerde elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak, en uygun gen enjeksiyon saatini bulmak amaçlanmıştır. Bu amaçla, fertilizasyonun ardından pronüklear gelişimin ve DNA singami mekanizmalarının farklı gelişim evreleri hedeflenerek; 3., 5., 7. ve 9. saatlerde koyun zigotlarına intrasitoplazmik mikroenjeksiyon yöntemiyle, 10 µg/µL dozunda ayarlanmış Green Flöresans Protein gen (pEGFPN1) enjeksiyonu yapılmış ve hücreler in vitro kültüre edilmiştir. Kültürün 8. gününde subjektif olarak mikroskop altında kontrol edilen hücreler; gelişim aşaması ve parlama oranları üzerinden farklı saatlerde yapılan gen enjeksiyonlarının etkinliği değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, flöresans parlama gösteren hücre (transgenik embriyo) oranları yönünden gruplar arasında istatistiki bir fark bulunmamıştır ($P>0,01$). Enjeksiyon gruplarındaki embriyoların parlama oranı ortalamaları karşılaştırıldığında; 7. Saat enjeksiyon grubunun parlama oranı ortalaması diğer gruplardan istatistiki olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($P<0,05$). En yüksek yarıklanma oranları 3. saat enjeksiyon grubunda bulunmuş ($P>0,01$), bununla birlikte en yüksek dejenerasyon ve lize hücre oranı da yine 3. saat grubunda gözlenmiştir ($P<0,01$). Bunun yanı sıra, blastosiste ulaşma açısından gruplar arasında istatistiki bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Sonuç olarak; koyunlarda embriyolarında gerçekleştirilecek gen enjeksiyonu çalışmalarında erken saatlerin kullanılabilecek olmasıyla beraber, fertilizasyon

sonrası 3. ila 9. saatler arasında, zaman kısıtlaması olmaksızın enjeksiyonlara güvenle devam edilebileceği söylenebilir. |

Nisan 2022 , |105| sayfa.

Anahtar kelimeler: | Koyun, Transgenik, Sitoplazmik Gen Enjeksiyonu, Mikroenjeksiyon, Yeşil Flöresan Protein (GFP) |



ABSTRACT

Ph.D. THESIS

Effect of Gene Injection at Different Timing After Fertilization on Transgenic Sheep Embryo Production

Nur ERSOY

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Reproduction and Artificial Insemination

Department of Reproduction and Artificial Insemination Programme

Supervisor : Prof. Dr. Mithat EVECEN

Even if the most successful methods are applied in transgenesis studies, there is always the possibility that the gene given to the embryo will be destroyed in the cytoplasm and not integrated into the genome, and this situation is affected by timing depending on intracellular biological processes. In the study, it was aimed to find the most appropriate intracytoplasmic gene injection time by comparing the results obtained at different times after fertilization in the production of transgenic sheep embryos. For this purpose, by targeting different developmental stages of pronuclear development and DNA syngamy mechanisms; 10 µg/µL of Green Fluorescence Protein gene (pEGFPN1) was injected into sheep zygotes at 3rd, 5th, 7th and 9th hours after fertilization by intracytoplasmic microinjection method and the development of embryos was evaluated in vitro. Embryos were checked under the invert microscope subjectively on day 8 of culture; the effectiveness of gene injections made at different times were evaluated over the developmental stage and glow rates under fluorescent light. According to the results obtained, there was no statistical difference between the groups in terms of the rates of cells showing glowing (transgenic embryos) ($P>0.01$). When the mean glow rate of the groups were compared, the mean glow rate of the 7th hour injection group was statistically significantly lower than the other groups ($P<0.05$). The highest cleavage rates were found in the 3rd hour injection group ($P>0.01$), while the highest rate of degeneration and lysed cells were also observed in the 3rd hour group ($P<0.01$). In addition, there was no statistical difference between the groups in terms of reaching the blastocyst stage ($P>0.05$). As a result; it was concluded that the gene injection procedure can be started as early as 3rd hours after fertilization in sheep embryos and injections can be usefully continued from 3rd to 9th hours without time restrictions.

April 2022, [105] pages.

Keywords: [Sheep, Cytoplasmic Gene Injection, Microinjection, Green Fluorescent Protein (GFP)]



1. GİRİŞ

Transgenik hayvanlar kendi genomunda başka bir organizmaya ait rekombinant bir geni taşıyan hayvanlardır (Bağış 2002). Transgenik hayvanların başlıca üretim amaçları; model hayvan üretimi, hayvansal ürünlere yeni özellikler kazandırılması, ksenotransplantasyon, hastalıklara dirençli hayvan üretimi ve biyofarmasötik üretimidir (Carter ve Shieh 2015, Denli 2012, Houdebine 2009, Wheeler 2007).

İstenilen ürün ve amaca göre, transgenik üretim için seçilecek hayvan değiştirilebilmekle beraber, fare, sıçan, tavşan gibi laboratuvar hayvanları; kedi ve köpek gibi pet hayvanları ve tavuk, koyun, keçi, sığır, domuz gibi çiftlik hayvanları da kullanılabilmektedir (Bağış 2002, Carter ve Shieh 2015, Houdebine 2009, Keefer 2004).

Laboratuvar hayvanları, kediler ve köpekler daha çok hastalık modelleri oluşturmak (Hatzioannou ve Evans 2012, Wagner 1995); domuzlar ise daha çok ksenotransplantasyon (Klymiuk ve ark. 2010) amacı ile kullanılmaktadır. Çiftlik hayvanlarında ise çeşitli hastalıklara dirençli hayvanlar (Liu ve ark. 2014) üretmek, verim özellikleri bakımından çeşitli yeni özellikler kazandırmak (Powell 1994) ve değerli biyofarmasötiklerin üretilmesi (biyoreaktör) (Bağış 2002, Castro ve ark. 2010) amaçlanmaktadır.

Transgenik hayvanlardan insan ve hayvanların kullanımı için hormonlar, kan faktörleri, aşılar, büyüme faktörleri, sitokinler, enzimler, süt proteinleri, fibrinojen ve kollajen gibi farmasötik bileşikler elde edilebilmektedir. Bu bileşikler başta süt, kan ve yumurta akı olmak üzere, seminal plazma, idrar, ipek bezleri ve böcek larvaları gibi ürünlerden elde edilmektedir (Bağış 2002).

Bu teknoloji; elde edilen ürünlerin yapılarının insanlardakine yakın olması nedeni ile peptid yapıdaki ürünlerin üretebilmesi, ürünlerin hayvanların çeşitli ürünlerinden izole edilmesinin kolaylığı, elde edilen ürün miktarının fazla olması, biyofarmasötiklerin elde edilen ürün içindeki yoğunluklarının fazla olması ve ekonomik olmaları nedeniyle, insan sağlığı için ilaç üretiminde uygun ve tercih edilebilecek bir yöntem olarak görülmektedir (Bağış 2002).

Transgenik hayvan üretimi için uygulanacak gen aktarımında; kimyasal yöntemler, fiziksel yöntemler, virüsler ve bunların kombinasyonları kullanılabilir (Denli 2012). Gen transferinde; pronükleusa veya oosit sitoplazmasına DNA mikroenjeksiyonu, retrovirüsler (lentiviral vektörler) veya transpozonların kullanımı, DNA'yla spermatozoonların inkübasyonu ve ardından İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) kullanarak in vitro fertilizasyon, elektroporasyon, pluripotent hücrelere (embriyonik kök hücre ve primordial germ hücreleri) yabancı genin aktarılması ve gen aktarımı yapılmış somatik hücrelerin klonlanmada kullanılması yöntemleri uygulanan tekniklerdendir (Arslan ve Akyüz 2009, Houdebine 2009, Pinkert 2014).

Yapılan çalışmalarda en yüksek başarı oranları, viral vektörler kullanılarak perivitellin aralığa gen mikroenjeksiyonu yöntemlerinde elde edilmiştir (Keefer 2004, Overbeek 2014, Polites 2014). Ancak viral vektörlerin hastalık oluşturma riski, immünolojik reaksiyonlara neden olabilmesi ve sadece çok küçük gen parçalarını taşıyabilmesi (en çok Adenovirüslerde 36 kb kadar) (Howarth 2009) nedeniyle, mikroenjeksiyon yöntemi daha çok tercih edilmektedir (Koo 2014, Menchaca ve ark. 2016, Overbeek 2014, Polites 2014, Pursel 1993).

Fertilizasyonun ardından çeşitli aşamalarda, zigot içerisindeki bazı maddelerin sitoplazmadaki enzimler aracılığı ile lize edildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, transgenik çalışmalarda kullanılan yöntemler başarı ile uygulansa dahi, embriyoya verilen genin hücre dışına atılma ya da genoma entegre olamama ihtimali her zaman bulunmaktadır (Alizadeh ve ark. 2005, Crosby ve ark. 1988, Mayer 2000).

Bu çalışmada pronüklear gelişim ve singami süreci göz önünde bulundurularak, koyun zigotlarına farklı saatlerde yapılan intrasitoplazmik gen enjeksiyonlarının transgenik verimliliği karşılaştırılmıştır. İn vitro fertilizasyon sonrasındaki farklı saatlerde (3., 5., 7. ve 9. saat), floresan ışık altında yeşil renkte parlayan dolayısıyla da, genoma entegre olup olmadığı rahatça gözlenebilen “Yeşil Floresan Protein (GFP) geni” içeren pEGFPN1 plazmidi sitoplazma içine enjekte edilmiştir. Böylece, farklı saatlerde elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak, transgenik koyun embriyosu üretiminin başarısının artırılması; yani aktarılan genin genoma entegre olma şansının yükseltilmesi amaçlanmıştır. Koyunlarda daha önce araştırılmamış olan, “transgenik embriyo üretimi için en uygun intrasitoplazmik gen enjeksiyon zamanı” bulunmaya çalışılmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. REPRODÜKSİYON

2.1.1. Koyunlarda Reprodüksiyon

Koyunlarda üreme aktivitesi melatonin hormonuna bağlı olarak gerçekleşir ve dolayısıyla da mevsime bağlı poliöstrus görülür (Steinlechner ve Niklowitz 1992; Kalkan ve Horoz 1997). Kuzey yarım kürede, koyunların seksüel olarak en yoğun aktif oldukları dönem Temmuz-Ekim ayları arasındadır. Puberte ise, mevsime (doğum mevsimi) ve beslenmeye bağlı olarak (canlı ağırlığın %60-70'ine ulaşma durumu) değişmekle birlikte, yaklaşık olarak 8-12 aylık yaşta görülmektedir (Yılmaz 1999; Ak 2002).

Seksüel siklus ortalama 16-17 gün sürer ve proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus ile mevsimsel anöstrus evrelerinden oluşur (Kalkan ve Horoz 1997; Ak 2002). Östrus, 20-36 saat sürer ve ovulasyon östrusun bitimine yakın olarak, östrus başlangıcından 24-27 ve LH pikinden 14 saat sonra gerçekleşir (Ak 2002). Gebelik ise 148 gün kadar sürer. Irklara göre değişmekle birlikte ikizlik, üçüzlük ve dördüzlük görülebilir (Yılmaz 1999; Tarım ve Orman Bakanlığı 2019).

2.1.2. Koçlarda Reprodüksiyon

Doğum mevsimi, beslenme koşulları, bölgenin iklimi ve diğer hayvanlarla bir arada bulunup bulunmama durumlarına göre değişmekle birlikte, erkeklerde spermatogenezisin başlama yaşı ortalama 4 ay, damızlıkta kullanılma yaşı ise 9-16. aydır (Ak 2002).

Koçlardan ejakülat başına 0,6-2 mL arasında değişmekle birlikte, ortalama 1 mL kadar sperma alınabilmektedir. Yoğunluk 2-3 milyar/mL ve motilite %80-90 civarındadır. Sperma pH'ı ortalama 6,7'dir (Ak 2002). Bu değerler sperma alma yöntemi, mevsimsel farklılıklar, hayvanın ırkı ve yaşı gibi parametrelere göre değişiklik gösterebilir (Brady ve Gildow 1939).

2.2. FERTİLİZASYON

Fertilizasyon, dişi üreme hücresi oosit ve erkek üreme hücresi olan spermatozoonun bir araya gelerek yeni bir canlıyı oluşturabilecek olan zigotu oluşturması ile sonuçlanan olaylar dizisi olarak tanımlanmaktadır (İleri 1999, Wassarman 1999).

Fertilizasyon, normal şartlarda in vivo olarak gerçekleşse de çeşitli araştırmalar ve uygulamalar için sıklıkla in vitro fertilizasyon tekniklerine başvurulmaktadır.

Fertilizasyonun gerçekleştirebilmesi için oositin olgunlaşması, spermatozoonun ise ikinci olgunlaşma dönemi olan kapasitasyonunu tamamlamış olması gerekir. İn vivo ortamda iki hücre, dişi genital sisteminin ovidukt bölümünün ampullasında karşı karşıya gelmekte ve döllenme burada gerçekleşmektedir (Wassarman 1999, Ak 1999).

İn vitro ortamda ise, in vivo olgunlaşmış oositler toplanır (Cognie ve ark. 2003) veya uygun ortamlarda olgunlaştırılan oositler (De Smetd ve ark. 1992, Cognie ve ark. 2003) fertilizasyon medyumuna içerisine alınır ve üzerlerine seçilmiş hiperaktif spermatozonlar gerekli yoğunlukta eklenerek, fertilizasyonun gerçekleşmesi sağlanır (De Smetd ve ark. 1992, Wani 2002, Cognie ve ark. 2003).

2.2.1. Fertilizasyonun Aşamaları

Olgunlaşmanın son aşamaları, oosit ve spermatozoonu fertilizasyona hazırlamaktadır. Oosit için bu birinci polar cisimciğin perivitellin boşluğa atılması iken, spermatozoon içinse ejakülasyonun ardından dişi genital kanalında gerçekleşen kapasitasyon sürecidir (Chang M.C. 1951). Böylece, birinci mayoz bölünmesini tamamlamış bir oosit ve kapasitasyonunu tamamlamış olgun bir spermatozoon birleşebilecek duruma gelmiş olur (Austin C.R. ve Bishop M.W.H. 1958, Wassarman 1999).

Fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için kapasite olan spermatozoonun oosit etrafını saran kumulus hücrelerini geçebilmesi, oositin etrafını saran zona pellusida katmanına bağlanması ve onu geçebilmesi, ardından oositin plazma membranına bağlanabilmesi gerekmektedir (Wassarman 1987).

2.2.1.1. Kapasitasyon

Kapasitasyon terimi ilk defa C.R. Austin tarafından ortaya atılmıştır (Austin 1952, Wasserman 1987). Aynı yıl, M.C. Chang tarafından da spermatozoonların fertil hale gelebilmek için belirli bir değişiklikten geçmesi gerektiği ortaya koyulmuştur (Chang 1951).

Kapasitasyon, spermatozoonların üzerinde bulunan bir kılıfın ortadan kalkması olarak tanımlanabilecek bir dizi geri dönüşebilir kimyasal reaksiyondan ibarettir. Mekanizması tam olarak bilinmese de genel olarak, spermatozoonların üzerinde etrafını saran koruyucu ve stabilizatör bir örtü olduğu ve kapasitasyonun da bu örtünün kalkması şeklinde olduğu düşünülmektedir (Yanagimachi 1994). Bu örtünün dekapasitasyon faktörlerini içerdiği düşünülmektedir. Bu süreçte, spermatozoonun fiziksel yapısında belirgin bir değişiklik olmazken, kimyasal yapısı değişmekte (Bedford 1970, Yanagimachi 1994, Gadella 2008) ve çeşitli iyon değişimleri, farklı bölgelerde iyon yoğunlaşmaları gibi durumlar görülmektedir (Yanagimachi 1994).

Kapasitasyonun ardından spermatozoonda hiperaktivite (Zhu ve ark. 1994), zona pellusidıyla etkileşime geçme yeteneğinin gelişmesi (Yanagimachi 1994) ve membrandan kolesterolün uzaklaştırılmasına bağlı olarak, membranların akışkanlığında artış (Yanagimachi 1994, Cross 1998) gerçekleşmektedir. Hiperaktivasyon, spermatozoonun oosite ulaşmasını sağlarken, kolesterolün dışarı çıkmasıyla membranların yumuşaması da akrozom reaksiyonunun meydana gelebilmesini sağlamaktadır. Spermatozoon hiperaktivasyonu ile birlikte, akrozomun zona penetrasyonunu sağladığı ve bunun sonucunda akrozom reaksiyonunun tamamlanmasıyla spermatozoon ve oosit füzyonunun gerçekleştiği düşünülmektedir (Yanagimachi 1994).

İn vitro ortamda kapasitasyon, sentetik ovidukt sıvılarında (SOF), özellikle heparinin indüklemesiyle gerçekleşmektedir (Handrow 1986). Ayrıca, ovidukt ortamını taklit etmek amacıyla medyum içerisinde bikarbonat, kalsiyum, HEPES ve serum albümini de bulunmaktadır (De Lamirande ve ark. 1997). Kullanılan medyumlarda Ca^{++} varlığı önemlidir. Medyumlarda bu iyonun eksik veya az olması durumunda, hiperaktivasyon gerçekleşmemektedir (Yanagimachi 1994). Ayrıca, ortamda enerji sağlayan maddelerin (piruvat, laktat vb.) de bulunması gereklidir.

Memeli türlerinin büyük çoğunluğunda, in vitro kapasitasyonun tamamlanması en çok 5 dakika sürmektedir (maymunlarda 1 dakika içerisinde tamamlanmaktadır). Bu süre ortalama 2 dakika olarak kabul edilmektedir (Yanagimachi 1994).

2.2.1.2. *Kumulus Ooforus ve Spermatozoon*

Ovule olduktan sonra oosit, kumulus ooforus adı verilen kumulus hücreleri ve bunların arasındaki hyaluronik asit matriksten oluşan bir yapıyla çevrilidir. Fertilizasyon için, spermatozoonların bu yapıyı geçmeleri gerekmektedir. Bunun, birçok spermatozoonun aynı anda oosit etrafında toplanması ve mekanik olarak kumulus ooforusu dağıtması ile gerçekleştiği düşünülmekteyken, in vitro olarak bir anda çok fazla spermatozoon oosit etrafına gelebilse de aslında in vivo olarak oosit etrafına gelebilen spermatozoon sayısının çok olmadığı (çoğu memelide 1:1 oranında) (Cummins ve Yanagimachi 1982) görülmüştür.

Bu nedenle, spermatozoonların erkek genital sistemde olgunlaşırken yüzeylerine akrozin, hyaluronidaz, beta-galaktosidaz ve arilsülfataz gibi enzimlerin tutunduğu ve penetre olduğu belirlenmiştir. Bu sayede akrozomal kap içerisindeki enzimler açığa çıkmaya da bu enzimler etki göstererek kumulus ooforusun geçilmesini sağlamaktadır (O'Rand ve Metz 1974, Metz ve ark. 1972).

Kumulus ooforusun, fertilizasyon esnasında değişik türlerde bulunmaması veya neredeyse tamamen dağılmış olmasından ötürü, gerekli olup olmadığı tartışılmıştır. Kumulus ooforusun uzaklaştırıldığı bazı in vitro çalışmalarda, fertilite oranlarında düşüş görülmüştür (Yanagimachi 1994). Yapılan çalışmalar sonucunda bu yapının, spermatozoon yoğunluğunun fazla olduğu durumlarda bir bariyer etkisi gösterdiği (Florman ve Ducibella 2006) ve ortamdaki albümin miktarı düşük olduğu takdirde bunu dengeleme şeklinde destek sağladığı sonucuna ulaşılmıştır (Yanagimachi 1994).

Oosit etrafındaki spermatozoon miktarının fazla olduğu durumlarda, kumulus ooforusun bunların tutulmasını sağladığı, kemotaksis ile spermatozoonların oositi bulmasını kolaylaştırdığı (Sun ve ark. 2005), yüzeyinin yapışkan yapıda olması sayesinde de spermatozoonların tutunmasını kolaylaştırdığı ve içerisinden geçerken spermatozoonların üzerlerindeki bazı maddeleri bırakarak zona pellusidaya bağlanabilecek hale gelmelerini sağladığı (Yanagimachi 1994) bildirilmiştir. Ayrıca, bu yapının ancak yeterince kuvvetli olan spermatozoonlar geçebildiği için, seleksiyonu sağladığı (Cummins ve Yanagimachi 1986, Cardullo ve Thaler 2002), yine yapışkan yapısı sayesinde zonaya ulaşan spermatozoonların oosit etrafından ayrılmasını engellediği ve zona pellusidayla yapışık olduğu için spermatozoonların hareketiyle oositin dönmesini engellediği, bu sayede de spermatozoonların

boşa enerji harcamadan direkt olarak oosite girmek için hareket etmelerini sağladığı düşünülmektedir (Yanagimachi 1994).

Kumulus ooforusun geçilmesi işleminin birkaç dakika ile 15 dakika arasında değişen bir sürede tamamlandığı bildirilmiştir (Florman ve Ducibella 2006).

2.2.1.3. Zona Pellusida ve Spermatozoon

Zona pellusida, oosit ve embriyonun etrafını saran koruyucu bir kılıftır. Mekanik koruma sağlayarak dağılmaları engeller. Ayrıca, fertilizasyon sırasında polisperminin engellenmesinde de görev alır (Yanagimachi 1994, Cardullo ve Thaler 2002, Florman ve Ducibella 2006, Gadella 2008). Türlerle göre değişmekle birlikte, 1-2 μm 'den 16 μm 'ye kadar kalınlıklarda olabilmektedir. En az iki tabaka halindedir ve iç tabaka dış tabakaya göre daha yoğun ve daha düzgün bir yüzeye sahiptir. Dış tabaka, girintili çıkıntılı süngerimsi bir yapıya sahiptir ve bunun görülmesi, spermatozoon penetrasyonu için zonanın uygun olduğunu göstermektedir (Bleil ve Wassarman 1980, Yanagimachi 1994).

Zona pellusidanın üretimi, oosit tarafından gerçekleştirilmektedir. Follikül içerisindeki oositin gelişimiyle birlikte değişik aşamalarda çeşitli glikoprotein, protein ve nükleotid grupları salgılanmakta ve zona pellusidanın yapısına katılmaktadır. Zona proteinlerinin sentezinin kaynağını araştırmak için yapılan araştırmalarda bu sentezin sadece oosit kaynaklı olduğu ileri sürülmüştür (Sinowatz ve ark. 2001, Bogner ve ark 2004). Ancak, bu araştırmaların sadece farelerde yapılmış olmasının fark edilmesi üzerine diğer evcil ((tavşan (Dunbar ve ark. 1994, Grootenhuis ve ark. 1996), köpek (Tresoriero 1981), inek (Kölle ve ark. 1998) ve domuz (Sinowatz ve ark. 1995, Kölle ve ark. 1996) ve evcil olmayan (marmoset maymunları (Bogner ve ark 2004)) memelilerde yapılan araştırmalarda oosite birlikte folikül hücrelerinin de bu proteinlerin sentezinde rol oynadığını göstermiştir. Burada, spermatozoonun oosit içerisine girmesini sağlayan Zona Pellusida proteinleri (ZP1, ZP2 ve ZP3 bulunmaktadır) kritik önem taşımaktadır (Bleil ve Wassarman 1980, Yanagimachi 1994, Gerton 2002, Louros ve ark. 2013).

Spermatozoonlar kumulus ooforusu geçtikten sonra zona pellusidaya ulaşır ve buraya yapışırlar. Bunun, hem spermatozoon üzerinde bulunan moleküller hem de zona pellusida yüzeyinde bulunan bu molekülleri bağlayan reseptörler sayesinde olduğu düşünülmektedir. ZP3 proteini dış akrozomal membran için, ZP2 proteini ise iç akrozomal membran için birer

reseptördür (Yanagimachi 1994, Cardullo ve Thaler 2002). ZP3 sayesinde akrozom reaksiyonu uyarılırken, ZP2 spermatozoonu bağlayan sekonder sperm reseptörü olarak işlev görür (Prasad ve ark. 2000, Gedikli ve ark. 2013).

2.2.1.4. Akrozom Reaksiyonu

Akrozom, önceleri lizozomun analogu olarak görülen (Allison ve Hartre 1970), daha sonraları düzenlenmiş salgı organeli olarak adlandırılan (Burgess ve Kelly 1987) ve spermatozoonların baş kısmının ucunu ekvatoryal segmente kadar kapatan bir kısımdır (Wassarman 1987). Akrozom, nükleus tarafında olan iç akrozomal zar ile plazma membranı tarafında olan dış akrozomal zar arasında yer almakta ve farklı düzen ve yoğunluklarda enzimler içermektedir (Gerton 2002). Akrozomda bulunan enzimler, hidrolize edici enzimlerdir. En çok akrosin, proakrosin ve hyaluronidaz ve daha az miktarda bulunan diğer enzimler dışında, az miktarda karbonhidrat da bulunmaktadır (Austin ve Bishop 1958, Piko ve Tyler 1964, Yanagimachi 1994). Özellikle akrozomal kabın dış akrozom membranının iç yüzeyini kaplayan ve bu sayede membranlar arası açıklığı oluşturduğu düşünülen bir glikoprotein tabakası bulunmaktadır (Gerton 2002).

Normal ve gerçek bir akrozom reaksiyonunda, dış akrozomal membran ve plazma membranı arasında yaygın ve yoğun yapışmalar meydana gelmekte, bunun sayesinde oluşan kanallar ile de akrozom içerisindeki enzimlerin dışarı ulaşması sağlanabilmektedir (Yanagimachi 1994).

Akrozomun iç ve dış membranları arasındaki füzyonlar, hayvan türüne göre değişiklik göstermektedir. Tavşanlarda akrozomal kabın ön kısmı veya bunun çevresinden başlarken, hamster ve koyunlarda akrozomun bitimine denk gelen ekvatoryal birleşme noktasından başlamaktadır. Bu bölgelerin, hücre membranların en az stabil olduğu noktalar olması nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir (Yanagimachi 1994).

Fertilizasyonu sağlayan spermatozoonların, zona pellusida ile etkileşime girdikten sonra akrozom reaksiyonu gösteren spermatozoonlar olduğu tespit edilmiştir. Zona pellusidayla karşılaşmadan önce reaksiyon gösteren spermatozoonlar ise zona pellusidayı geçememektedir (Wassarman 1987, Yanagimachi 1994).

İn vivo olarak bakıldığında, akrozom reaksiyonunun bazen 3 güne kadar gerçekleşmeyebildiği görülmüştür. Ancak in vitro ortamda yapılan çalışmalarda, kapasitasyon

indüklendikten (örneğin yoğun Ca^{++} iyonu içeren ortamdan az yoğun ortama geçirmek gibi) sonra membranlar arası füzyonun en geç 1 dakika içerisinde meydana geldiği (en düşük olarak insan spermasında 5-10 saniye) tespit edilmiştir (Bleil ve Wasserman 1983, Yanagimachi 1994).

Akrozom reaksiyonunun, spermatozoonun oositin zona pellusidasıyla temasa geçmesi sonucunda buradaki yüzey reseptör glikoproteinlerinden ZP2 ve özellikle ZP3 ile temas ettikten sonra başladığı, ZP'lerin burada ligant görevi gördüğü ve spermatozoonlarda zincirleme bir reaksiyonu başlattığı bildirilmiştir (Bleil and Wasserman 1983, Ward ve Kopf 1993).

Akrozomdan içeriye Ca^{++} iyonlarının girişiyle birlikte hem enzimlerin aktivasyonu gerçekleşir hem de membran depolarizasyonu ile füzyon etkisi görülür. Aktive olan G proteini fosfolipaz A'yı stimule eder, bu da fosfatidil kolin'in yıkılmasını ve lizofosfadil kolin ve araşidonik asitin oluşmasını sağlar. Bunlar da membranların füzyonunu sağlayan maddelerdir (Yanagimachi 1994). Bu reaksiyon zincirlerinin önemli olduğu düşünülmektedir, ancak koyunlarda aktif protein kinaz C bulunmaması nedeniyle önemlerinden şüphe edilmektedir.

Bu yüzden daha basit bir sistem öne sürülmüştür. Bu sistemde, ligantlar tarafından aktive edilen spermatozoon reseptörlerinin Ca^{++} kanallarını açtığı, hücre içi Ca^{++} oranının artmasıyla birlikte önceki zincirin yürüdüğü düşünülmüştür (Wassermann 1987, Yanagimachi 1994).

2.2.1.5. Zona Penetrasyonu

Zona penetrasyonu hakkında iki adet hipotez bulunmaktadır. Bunlar mekanik ve mekanik olmayan hipotezlerdir. Zona penetrasyonu, spermatozoonun zonaya bağlanmasıyla ardından 5-20 dakika içerisinde tamamlanmaktadır (Yanagimachi 1994).

Mekanik hipoteze göre, zona pellusidanın geçilmesi tamamen mekaniktir. Akrozomal kap içerisinde bulunan enzimlerin tek işlevi zona pellusidada yer yer yırtılmalarıdır. Bu yırtılmaların ardından spermatozoon kuyruk hareketleriyle oosit içerisine ilerlemektedir. Spermatozoonun geçirdiği değişikliklerle birlikte sahip olduğu hiperaktivasyon özelliği, bu aşamada yardımcı olmaktadır (Yanagimachi 1994, Gadella 2008).

Bu hipoteze kanıt olarak, kuyruk hareketinin güç ve frekansının zona pellusidadaki kovalent bağları kırmakta yeterli bir güç oluşturuyor olması, spermatozoonun zona pellusidayı geçerken gerisinde enzimatikten çok fiziksel bir iz bırakması, akrozom reaksiyonunun ardından bakıldığında ortamda akrozin miktarının çok düşük olması, gösterilmektedir (Yanagimachi 1994).

Mekanik olmayan hipotezler; spermatozoon kaynaklı enzimatik olan ve olmayan maddelerle ilgilidir. Enzimlerle ilgili olmayan hipotezde, zona üzerinde bölgesel hasarlanmalar görülür. Bu hasarlanma, enzim olmayan bazı faktörler ve flagellar hareket sonucu oluşmaktadır (Vacquier ve ark. 1990, Kresge ve ark. 2001).

Enzimatik hipotezde ise akrozomal kap içerisinde bulunan enzimler önemliyen, mekanik hareket ikinci plandadır. Akrozomal preteazların etkisiyle zona pellusidanın lize edildiği düşünülmektedir (Honda ve ark. 2002). Özellikle akrozin enziminin zona-lizin olarak hareket ettiği öne sürülmüştür (Yanagimachi 1994).

2.2.1.6. Zona Reaksiyonu

Polispermi, bir oosit içerisinde birden fazla spermatozoonun girmesi durumudur (Dale ve DeFelice 2011). Bu durum, kanatlılarla sürüngenlerde sık görülse de memelilerde de nadiren görülmektedir. Koyunlarda yapılan bir araştırmada ise, östrus başlangıcından 36-48 saat sonra, yani geç yapılan tohumlamalarda %40'a kadar polispermi görülmektedir (Yanagimachi 1994).

Spermatozoonun içeri girmesiyle birlikte, polispermiyi engellemek adına kortikal reaksiyon veya zona reaksiyonu olarak adlandırılan bir tepkime gerçekleşir. Zona reaksiyonu ve kortikal reaksiyon farklı olarak da görülebilmektedir (Yanagimachi 1994). Spermatozoonun oosite girişiyle, öncelikli olarak giriş noktasından başlayarak oosit membranının tamamında saniyeler içerisinde bir elektriksel iletim ve tepkime gerçekleşir (Dale 1985, Florman ve Ducibella 2006). Bu tepki, kortikal reaksiyondur ve oosit membranı yüzeyindeki polarizasyonun bozulmasıyla geçiş engellenmeye başlar (Yanagimachi 1994). Ardından, önceden oositin içerisinde bulunan ve spermatozoonun içeri girmesiyle perivitellin aralığa açılan kortikal granüller, zona pellusidanın yapısında ani bir değişiklik meydana getirir ve ZP3 reseptörlerinin ortadan kalkması ve zonanın sertleşmesi ile geçirgenlik son bulur (Vacquier ve ark. 1973, Monroy ve Moscona 1979, Yanagimachi 1994).

2.2.1.7. *Gamet Füzyonu*

Spermatozoon, zona pellusidayı geçmesinin ardından vitellin membran ile karşı karşıya gelir. Vitellin membranın yüzeyi mikrovilluslarla kaplıdır. Spermatozoon, yüzeydeki bu mikrovilluslarla akrozomal başlığın sınırı olan ekvatoryal bölgeden temas eder ve bu bölgeden yatay pozisyonda yapışma olur (Yanagimachi 1994, Myles ve ark. 1999, Gadella 2008).

Villuslar aracılığıyla spermatozoonun başının ekvatoryal bölgenin altında kalan post akrozomal bölgesi vitellin membrandan içeri girer. Bununla birlikte bazı araştırmacılarca spermatozoonun geri kalan kısmı dışarda kaldığı (Yanagimachi 1994) bildirilse de farklı türlerde spermatozoonun tamamının oosit içerisine girdiği bildirilmiştir. Örneğin tavşanlarda yaklaşık 20 dakika içerisinde kuyruk kısmın oosit sitoplazmasına girdiği (Longo ve ark 1987), füzyon işlemi tamamlandıktan hemen sonra kuyruk hareketinin durduğu ve içeride bulunan bu kuyruğun komponentlerinin fertilizasyonun diğer aşamalarında (örneğin pronükleusların vitellus içindeki göçü erkek sentrozomun oluşturduğu aster yapısının kontrolündedir (Shatten 1994, Hewitson ve ark. 2002)) katkı sağladığı bildirilmiştir (Florman ve Ducibella 2006).

2.2.1.8. *Pronükleusların Oluşması ve Singami*

Memelilerde döllenme, oositin Metafaz-II aşamasında gerçekleşmektedir. Spermatozoonun oosit içerisine girmesiyle birlikte hücre içine giren kalsiyum artışıyla oosit uyarılır ve aktif hale geçer. Aktive olan oosit, mayoz bölünmesine devam eder ve ikinci polar cisimciğini atar. Kalan haploid DNA zinciri paketlenir ve küçük bir dişi pronükleus oluşmuş olur (Johnson ve ark. 1998, Ducibella ve ark. 2002, Chang ve ark. 2004).

Spermatozoonlardaki DNA paketlenmesi oosittekinden farklıdır. Spermatozoonlarda histonlar yerine, daha sıkı ve güçlü bağlar yaratan protaminler bulunur (Wouters-Tyrou 1998). Spermatozoon oosite girince, önce genetik materyal (çekirdek) etrafındaki kılıf yıkımlanır ve ardından dekonduzasyon gerçekleşir. Dekonduzasyon için gerekli maddeler (protaminler yerine histonlar geçmekte, Zn bağları kırılmaktadır) oosit sitoplazmasında bulunur (Wright ve Longo 1988, Adenot ve ark. 1991). Oosit dekonduzasyonla aynı anda, metafaz evresinden telofaz evresine geçer ve dekonduzasyon telofaz evresinde tamamlanır (McLay ve Clarke 2003). Oosit sitoplazmasındaki maddeler kullanılarak protaminler açılır ve histonlar bunların yerini alır (Ecklund ve Levine 1975). Bu sayede, spermatozoonun dişi pronükleus ile birleşebilecek erkek pronükleusu oluşmuş olur. Erkek ve dişi pronükleuslar aynı anda olgunlaşır (Yanagimachi 1994, Florman ve Ducibella 2006).

Bir sonraki aşamada, aktivasyonla birlikte oosit iskeletinin yeniden düzenlenmesi (Scholey ve ark. 1989, Payne ve ark. 2003) sonucunda bu iki pronükleus, oositin ortasına doğru ilerler ve karşı karşıya gelir. Bunu sağlayan, erkek sentrozomun oluşturduğu aster yapısıdır (Shatten 1994, Hewitson ve ark. 2002). Hücre iskeletine bağlanan boyalarla yapılan incelemelerde, polar cisimcik altındaki kortikal bölgede yoğunlaşma görülmüştür. Ayrıca sitoplazma içerisinde yarıklanmadan (klivaj) önce, pronükleuslar üzerinde yoğunlaşan aster odakları oluşturan sentrozomal odaklar da görülmüştür. Zigotun profaz evresinde sentrozom yapısı duplike olur. Karşı karşıya gelen pronükleusların etrafındaki zarlar erir ve yoğunlaşan genetik materyal zigotun metafaz evresini sağlayacak şekilde dizilir. Ardından ilk mitoz bölünme devam eder ve duplike olan sentrozom yapıları ile telofaz evresine geçilir. Bu işlemin olabilmesi için gamet füzyonunun ardından en az 12 saat geçmiş olması gerekmektedir (Yanagimachi 1994, Florman ve Ducibella 2006).

Spermatozoonla birlikte içeri giriş yapan hücre zarı veya yapısal elementlerin başına ne geldiği halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak, zigotun sentriollerinden birinin spermatozoondaki proksimal sentriol kaynaklı olduğu bulunmuştur (Yanagimachi 1994).

Tablo 2-1: Koyunlarda fertilizasyon aşamalarının zamanlaması.

Embriyo Geliştirme Ortamu	Kapasitasyon	Kumulus Penetrasyonu	Zona Penetrasyonu	Akrozom Reaksiyonu
İn Vivo	1-1,5 saat	5 dakika	5-15 dakika	3 güne kadar
İn Vitro	5-15 dakika	5 dakika	1 dakika	İndüklendikten 1 dakika sonra

2.2.2. Koyunlarda Fertilizasyonun Ardından Gerçekleşen Olayların Zamanlaması

Fertilizasyon, spermatozoonların oositleri fertilize etmesi için bırakıldıktan yaklaşık iki saat sonra başlamaktadır. Spermatozoon oosit içerisine girdikten hemen sonra dekonenzasyona başlamakta, fakat zigot gelişiminde rolü olduğu düşünülen fertilizasyon konisinin oluşumu spermatozoonun içeri girişinden yaklaşık 1 saat kadar sonra gerçekleşmektedir. Bu yapı, erkek pronükleus oluşana kadar varlığını sürdüren bir geçiş yapısıdır (Crozet 1988a, Crozet 1988b).

Oosit açısından bakıldığında, spermatozoonun içeri girmesiyle birlikte artan kalsiyum miktarının da uyarmasıyla mayoz bölünme tamamlanmakta (Johnson ve ark. 1998, Ducibella ve ark. 2002, Chang ve ark. 2004) ve fertilizasyonun ardından 3.- 4. saatler içerisinde 2. polar cisimciğin atılımı gerçekleşmektedir. Dördüncü saat sonunda, mayoz bölünmenin devamıyla kortikal granüller ile oosit içerisinden madde atılımı gerçekleşmektedir (Crozet 1988b).

Fertilizasyonun ardından 5. saatte, neredeyse eş zamanlı olarak dişi ve erkek pronükleus gelişimi olmaktadır. Ancak, pronükleuslar yeni şekillendiğinden, etraflarında bir zar bulunmayıp, genişleme ve karşı karşıya gelme aşamalarına henüz geçmemişlerdir (Crozet 1988a, Crozet 1988b).

Pronükleus oluşumunun 1 saat sonrasında (fertilizasyondan 6 saat sonra), iki pronükleus da nükleer zarfla kaplanmış hale gelmiştir. Bunun ardından, her ikisinin de boyutu artar ve sperm asteri aracılığıyla olduğu düşünülen hareketle, hücrenin ortasına doğru ilerlerler (Crozet 1988a). Bu olayın tamamlanması yaklaşık 7. saate denk gelmektedir.

Tablo 2-2: Koyunlarda fertilizasyonun ardından gerçekleşen olaylar.

SAATLER	ÖNCESİNDE GERÇEKLEŞEN OLAYLAR
2. SAAT	Spermatozoonun oosit içerisine girmesi Dekondenzasyonun başlaması Oosit aktivasyonu
3. SAAT	Fertilizasyon konisinin oluşumu
4. SAAT	2. polar cisimciğin atılımı Kortikal granüller ile oosit dışına madde atılımı
5. SAAT	Dişi ve erkek pronükleus gelişimi
6. SAAT	Pronükleusların zarfla çevrilmesi
7. SAAT	Pronükleusların boyutunun artması ve singaminin gerçekleşeceği yere gitmeleri Yarıklandmanın başlaması
9. SAAT	Yarıklandmanın devamı
22. SAAT	Yarıklandmayı bitiren ilk hücreler

2.3. TRANSGENESİS

Transgenesis, bir canlıya kendi genomunda olmayan bir gen parçasığının aktarılması işlemidir. Bu yöntemle elde edilen canlılara transgenik canlı denmektedir. Bu teknoloji, canlıların genomuna dışarıdan başka bir canlının bir gen parçasını sokmak için kullanıldığı gibi,

genomun bir parçasının saf dışı bırakılması ve susturulması veya istenildiği anda aktive edilmesi için de kullanılabilmektedir (Niemann ve Kues 2003, Gama Sosa ve ark. 2010) .

1950'lerin başında Watson ve Crick (Watson ve Crick 1953) tarafından DNA'nın yapısının keşfedilmesiyle, canlıların genlerinin kontrol edilmesi ihtimali doğmuştur. Stanley Cohen ve Herbert Boyer (Cohen ve ark. 1973) ilk transgenik canlıyı 1973 yılında bir bakteri olan *Escherichia coli*'den ürettir. Bundan 10 yıl sonra tütünden, ilk transgenik bitki üretildi (Barton ve ark. 1983). Özellikle bakteri üretiminin ardından, transgenesisin dünyaya zararlı olabileceği düşünülmüş olsa da, transgenik çalışmalar bu gün hızla devam etmektedir. Transgenik ürünlerin kullanımına ise bazı ülkelerde onay verilmiştir. İlk transgenik hayvanlar meyve sineği ve fare olurken, insan tüketimine onayı verilen ilk transgenik hayvan ise somon balığı olmuştur.

2.3.1. Transgenesisin Kullanım Alanları

Transgenik hayvanlar, genel olarak biyomedikal ürünlerin kullanımı ve tarımsal özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla üretilmektedir. Biyomedikal ürünler için; model hayvan üretimi, hücre, doku ve organ ksenotransplantasyonu ve biyoreaktör üretimi sayılabilirken, tarımsal özelliklerin iyileştirilmesine; yün, süt, et gibi hayvansal ürünlere yeni özellikler kazandırılması ve çeşitli hastalıklara dirençli hayvanların üretimi, sayılabilir.

2.3.1.1. Tarımsal Özelliklerin İyileştirilmesi

Üretilen transgenik çiftlik hayvanlarında birçok farklı amaç hedeflenebilmektedir. Bunların başlıcaları; karkas formasyonu, süt özelliklerinin değiştirilmesi, yün kalitesinin değiştirilmesi, çevreye daha az zararlı atık bırakan hayvanların üretilmesi, çeşitli yaygın hastalıklara dirençli hayvanların üretilmesidir (Niemann ve Kues 2003).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, domuzlara transfer edilen insan genleri sayesinde büyüme hızı arttırılmış, yemden faydalanma oranı arttırılmış ve vücuttaki yağ/kas oranı iyileştirilmiş domuzlar elde edilmiştir (Pursel ve ark. 1989, Nottle ve ark. 1999). Bunun üzerine farklı çalışmalar yürüten gruplar, ıspanaktan alınan *desaturaz* üretim genini domuzlara naklederek doymuş yağ oranı azaltılmış, doymamış yağ oranı yüksek karkas eldesi sağlamışlardır (Niemann 2004, Saeki ve ark. 2004).

Benzer şekilde, süt üretimi üzerine yapılan çalışmalarda kazein üretimi için gerekli olan genin (beta ve kappa casein) fazladan ifade edilmesiyle, kazein oranı yüksek süt eldesi (Brophy

ve ark. 2003), β -laktoglobülin geninin susturulmasıyla hipoalerjenik süt eldesi veya alfa-laktalbümin geninin susturulması ile laktozsuz süt eldesi sağlanabileceği düşünülmektedir (Niemann ve ark. 2005). Farelerde yapılan çalışmalarda, heterozigot annelerdeki süt laktoz oranları %50-85 oranında azaltılmıştır (Jost ve ark. 1999). Domuzlara transfer edilen inek alfa *laktalbümin* geni sayesinde ise dişi domuzlarda daha yüksek laktoz oranlı ve besleyicilik açısından daha iyi özelliklere sahip süt salgısı sağlanabilmiş, bu sayede domuz yavrularının hayatta kalma oranı arttırılmıştır (Wheeler ve ark. 2001).

Keratin geni modifiye edilmiş koyunlarda, deride bu genin ifade edilişi görülmüş ve %6,2 oranında daha kaliteli yün eldesi sağlanmıştır (Damak ve ark 1996a, 1996b).

Yine domuzlarda yapılan bir çalışmada, yüksek fosfor içeren dışkılama yapan hayvanlarda yapılan genetik modifikasyon sonucunda, tükürük bezlerinde ifade edilecek şekilde yerleştirilen genetik değişiklik, domuzların ağız bölgesinde fosforun sindirilmesini sağlayacak bakteriyel enzimlerin salgılanmasını sağlamış, bu sayede dışkıyla atılan çevreye zararlı fosfor miktarı %75 oranında azaltılmıştır (Golovan ve ark. 2001).

Prion proteininin susturulması yöntemiyle, Scrapie gibi prion kaynaklı hastalıklara dirençli hayvanların oluşturulmuş ve ardından bu sığırların klonlama yöntemiyle üretimi başarılmıştır (Cyranosky 2003). İnsanlarda diğer memelilere göre yüksek oranda bulunan lizozom ve laktoferrinin, enfeksiyona karşı dirençle ilgili olduğu bilinmektedir (Niemann 2005). İnsan lizozom geninin farelerde ifade edilmesi sonucu bakteri yükünde ve meme enfeksiyonlarında azalma görülmüştür (Maga ve ark. 1995a, 1995b). Ayrıca sığırlarda yapılan çalışmalarda da laktoferrin miktarının arttığı görülmüş, bu maddenin bakterisidal etkisi sebebiyle, bu durum hastalıklara dirençle ilişkilendirilmiştir (Krimpenfort 1991, Platenburg 1994, Van Berkel 2002). Bu gibi çeşitli hastalıklara dirençli hayvanların üretimi üzerine çalışmalar devam etmektedir.

2.3.1.2. Biyomedikal Üretim

Terapötik amaçlı rekombinant protein üretimi, organ ve doku transplantasyonu ve hastalık araştırmaları için deney hayvanı modeli oluşturmak, biyomedikal üretim alanlarıdır.

2.3.1.3. *Terapötik Amaçlı Rekombinant Protein Üretimi*

Bitkilerden elde edilen farmasötiklerin kullanımı, uzun süre önce başlamıştır. Ancak protein yapıdaki bu farmasötikler ya elde etme aşamasında ya da oral yolla alındıkları için, sindirim sisteminde bozunmaktadır. Diğer canlılar ve sistemlerden gereksinim duyulan farmasötiklerin alınamaması sonucu, hayvanlara yönelim olmuş ve ilk defa domuz pankreasından insülin elde edilmiştir (Houdebine 2009).

Yapılarında değişiklik yapılmadan ilaç elde edilmeye çalışılan bu canlıların ardından, ilk kez 1980'li yılların başında transgenik bakterilerden insülin elde edilmiştir (Houdebine 2009). Elde edilen bu insülinin, diğer genetiğiyle oynanmamış canlılardan elde edilen insülinlere göre daha etkili olduğu ortaya koyulmuştur. İnsülinin ardından insan büyüme hormonu da bu bakterilerden elde edilmiştir. Bakterilerin ürettiği bu hormonların, insan prionuyla enfekte olmaması, tercih edilme sebebi olmuştur. Ancak kısa bir süre sonra bakterilerin karmaşık yapıdaki bileşikler sentezleyemedikleri, maddeleri her zaman aktif halde üretemedikleri, bu yapıların bazen başarıyla izole edilemedikleri izolasyon aşamasında denatüre oldukları, proteinlerin glikozilasyon (**Şekil 2-1**), γ karboksilasyon, fosforilasyon ve karboksilasyon gibi post translasyonel modifikasyonlarını yapamadıkları ve bununla birlikte çok az miktarda bileşik üretebildikleri keşfedilmiştir (Houdebine 2009).

Mayaların ökaryot olmaları sebebiyle, daha iyi bir seçenek olduğu düşünülmüş ve denendiklerinde daha fazla miktarda sentez yapabildikleri, bununla birlikte sentezlerinde bazen glikozilasyon işlemini gerçekleştiremedikleri (**Şekil 2-1**), monoklonal antikoları sentezleyemedikleri ve insanlardaki yapıda bulunmayan bazı şeker gruplarını da bileşiğe ekledikleri görülmüştür. Transgenik mayalarda insana daha yakın sonuçlar elde edilse de bazı bağları kuramadıkları ve ana yapıda olması gereken bazı şekerleri de ekleyemedikleri görülmüştür (Hamilton ve ark. 2003).

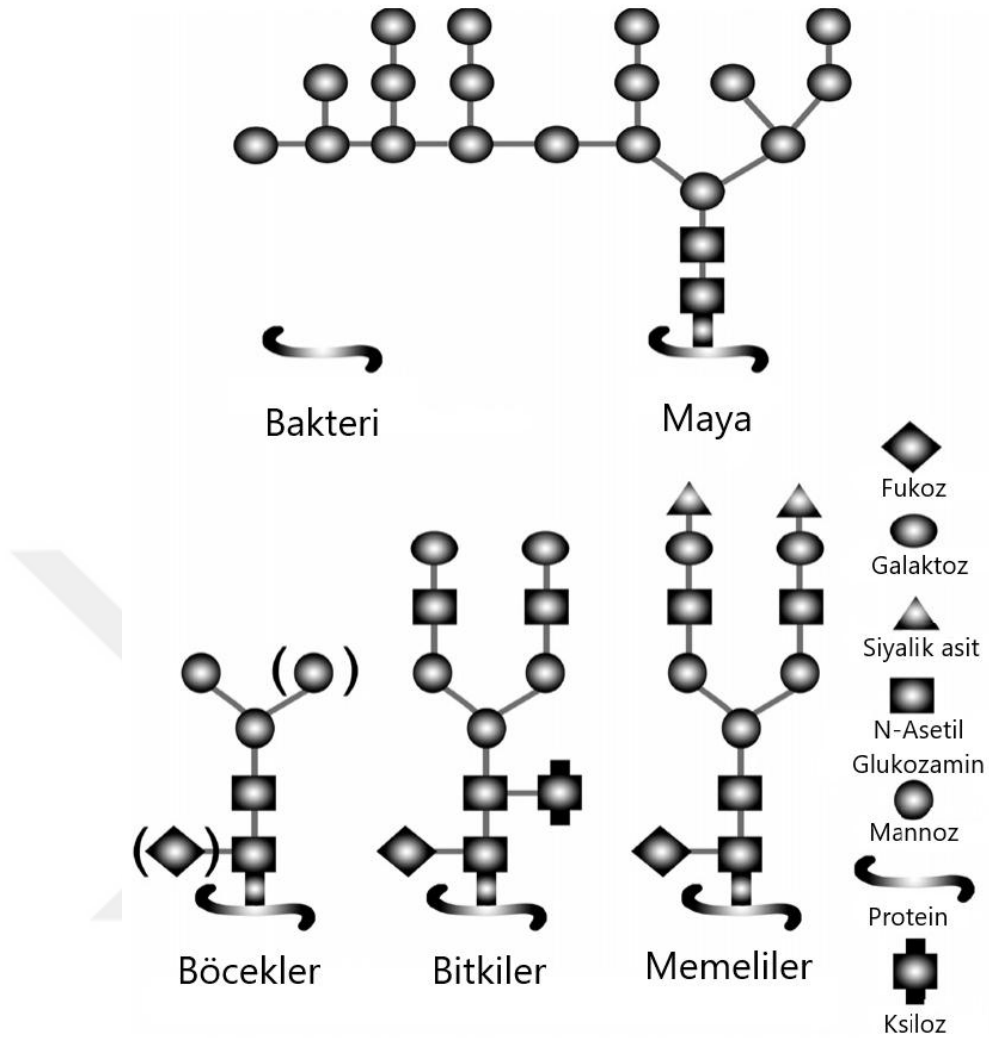
Mayaların ardından insan ve hayvan hücre örnekleri denenmiş, bu hücrelerin etkin olduğu ancak, çok az sentez yapabildikleri ve yine glikoprotein molekülünün yapısı için gerekli bazı şekerleri ekleyemedikleri görülmüştür (**Şekil 2-1**). Bu yöntemin ayrıca pahalı bir yöntem olmakla birlikte, ürünlerin stabilitelerinin de güvenilir olmadığı belirlenmiştir (Houdebine 2009).

Bitkilerde yapılan denemelerde, bazı proteaz veya polifenol gibi maddelerin de sentezi yüzünden ilacın eldesi daha zor olsa da, sentezlenen miktarın çokluğu ve maliyetin düşüklüğü, ayrıca çeşitlilik ve saklama kolaylığı gibi nedenler bitkiler için tercih sebebi olmuştur. Ancak elde edilen bileşiklerde terminal sialik asidin olmadığı ve *ksiloz* adı verilen ve insanlarda immun yanıt oluşturabilecek bir maddenin de bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer canlılara göre patojen etkenlerin insanlara geçme tehlikesinin daha az olmasına rağmen, açık arazide yetiştirmede kontrolsüz yayılım sonucu hem tolerans oluşumu hem de çevrede bulunan popülasyonda bilinçsiz melezleme riski olmasından ötürü, bitki konusuna tereddütle yaklaşılmaktadır (Kirk ve ark. 2005). Yetiştiricilik problemi için seracılık gibi çözümler üretilirken, maliyetin artmasından ötürü transgenik bitkilerden ilaç eldesinin tercih edilebilirliği cazibesini yitirmiştir (Gomord ve ark. 2005, Houdebine 2009).

Transgenik hayvanlardan ilaç eldesinde; elde etme kolaylığı, hayvanlardan elde edilen ürünlerin yapı olarak insana en yakın yapıda olması, ürünü elde etme süresinin kısa olması, elde edilen ürünün yoğunluğunun yüksek olması ve ekonomik olması gibi nedenlerle bu seçeneğe olan olumlu yaklaşımı artırmaktayken; ekolojik ve etik olarak doğan tartışmalar, özellikle spongiform ensefalopati yaratabilecek etkenlerle birlikte, insanlara geçmesi olası zoonoz hastalıkların fazlalığı ve insanların değer yargılarına göre bu ürünlere bakış açısı olumsuz yaklaşımlar doğurabilmektedir (Houdebine 2009).

Bu alanda şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda, insanlarda kullanıma sunulmak üzere iki adet rekombinant protein elde edilmiştir. Transgenik hayvanlardan elde edilen ilk onaylı rekombinant protein ürünü, transgenik keçilerin sütünden elde edilen rekombinant antitrombin (antitrombin alfa) olan "*Atryn*" isimli ilaçtır. Öncelikle 2006 yılında Avrupa'da, ardından 2009 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanım onayı almıştır (Bertolini ve ark. 2016).

Bu başarının ardından 2012 yılında Avrupa'da, 2014 yılında ise Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanım onayı alan ve tavşanların sütünden elde edilen rekombinant insan C1 esterase inhibitör proteinini "*Ruconest*" kullanıma sürülmüştür (Bertolini ve ark. 2016).



Şekil 2-1: Değişik sistemler tarafından üretilen rekombinant proteinlerin glikolizasyonunun karşılaştırılması (Houdebine 2009).

2.3.1.4. Doku ve Organ Ksenotransplantasyonu

Ksenotransplantasyon, farklı memeli türler arası gerçekleştirilen doku ve organ nakillerine verilen addır. Özellikle vücut ve organ büyüklüklerinin benzer olması sebebiyle domuzlar, insanlara nakil amacıyla yapılan bu tür çalışmalar için uygun görülmüştür (Platt ve Lin 1998, Kues ve Nieman 2004). Tek batında çok yavru elde edilebilmesi, yavru gelişiminin hızlı olması, domuzların çiftlik hayvanı olması ve gebelik süresinin nispeten kısa olması, domuzların tercih edilmesine neden olmaktadır (Niemann ve Kuess 2003).

Doku transplantasyonu için kan üzerine çalışılmış ve insan hemoglobini transgenik domuzlardan elde edilmeye başlanmış, ancak kan hücrelerinin tamamında elde edilememesi sebebiyle çalışmalara devam edilmemiştir (Swanson ve ark. 1992).

Organ ksenotransplantasyonunda, zaman zaman çeşitli problemler görülebilmektedir (Nieman ve Kuess 2003, Nieman ve ark. 2005). Akut organ reddi, kronik organ reddi, aşırı alerjik reaksiyon gibi durumların önüne geçebilmek için transgenik domuzlar üretilmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda, primatlara nakledildiğinde ani red ve anafilaktik şok sebebiyle ölüme sebep olan organların, transgenik müdahale yapıldığında bireylerin 23-135 gün daha fazla yaşadıkları bildirilmiştir (Bach 1998). Yapılan diğer çalışmalarda ise, gen susturma yöntemiyle elde edilen transgenik domuzlardan organ nakli yapılan babunlar 6 aya kadar yaşamışlardır (Yamada ve ark. 2005, Kuwaki ve ark. 2005).

2.3.1.5. Deney Hayvanı Modelleri

Gerek insan sağlığı için gerekse hayvan sağlığı için geliştirilen ilaç ve diğer tedavi yöntemleri, aşamalı olarak deney hayvanlarında denenmektedir. Bu deneyler yapılırken, doğru hayvan türlerinin seçilmesi çok önemlidir.

Hayvan seçilirken öncelikle elde edilmek istenen ürün dikkate alınmaktadır. Hedeflenen ürüne göre, tavşanların yavrulama süresinin kısa olması, domuzların çok sayıda yavrulması, ruminantların süt veriminin yüksek olması gibi faktörler göz önünde bulundurulmaktadır.

Hayvanın soyundaki ve kendisindeki hastalıklar incelenerek hastalıklara, özellikle de spongiform ensefalopati yaratabilecek hastalıklara yatkınlık ve prionların yol açtığı hastalıkların olup olmadığı belirlenerek hasta olmayan, hastalığın taşıyıcısı ve hastalığın açığa çıkma riski az olan hayvanlar seçilmektedir. Örneğin; Scrapie rezistans koyun ırkları, çalışmalarda özellikle tercih edilmektedir (Niemann ve ark. 2005).

Transgenesis uygulamalarının bu durumdaki kullanımında ise öncelikle uygun hayvan modellerinin üretilmesi gerekmektedir. Bazı hastalık modelleri üzerinde yapılacak çalışmalarda, öncelikle hastalığın oluşturulması gerekmektedir. Genetik hastalıkların ortaya çıkarılması ise ancak transgenesis ile mümkündür. Örneğin dolaşım sistemi hastalıklarından aterosklerozisin incelenmesi için domuz modellerinin üretilmesi (Rapacz ve Hasler-Rapacz 1989, Grunwald ve ark. 1999); kanser veya albinoluk gibi hastalıkların çalışılabilmesi için fare ve sıçan modellerinin üretilmesi, sıklıkla görülen uygulamalardır.

aktarılması, transgenik klonlar oluşturulabilmesi için bu hücrelerin çekirdekleri çıkartılmış oositlere aktarılması. 4, 5 ve 6. yöntemler, gen atılması ve koyulmasını içeren gen eklenmesi ve çıkarılması için rastgele gen eklenmesinin ve homolog rekombinasyonlarla hedeflenmiş gen kaynaştırmasının mümkün olduğu yöntemlerdir (Houdebine, 2009).

DNA ve hücre membranlarının aynı elektrik yükünde yani anyonik yapıda olmasından ötürü ya hücre membranlarının üzerinde oluşturulan porlar aracılığı ile veya endositoz mekanizmaları kullanılarak genin hücre membranından geçerek hücre içine girişi sağlanmalıdır (Tosti ve ark. 2004, Ma ve ark. 2017). Hücrelerin yarı iletken bir ortamda, doğru akım kullanılarak belirli bir seviyede elektrik akımına maruz bırakılması sonucu, hücre membranı ve çekirdek membranında açılmalar (porlar) şekillenmekte ve bu açıklıklardan transfer edilecek olan gen hücre içine oradan da çekirdeğe kadar girebilme imkânı bulabilmektedir. Bu yöntem elektroporasyon yöntemi olarak adlandırılır (Inoue ve ark. 1990). Hücrelerin endositoz mekanizmalarından yararlanıldığında ise, kimyasal olarak DNA'da yapılacak modifikasyon sonrası veya bir taşıyıcı sistem kullanılarak genin hücre membranına dolaylı olarak bağlanması ve oradan da endositoz ile hücre içine taşınması sağlanır. Son yıllarda, kullanımında hücreler için hem güvenilir olması hem de alınan başarının oldukça yüksek olması nedeniyle, gen taşıyıcı sistemler tercih edilir hale gelmiştir. Taşıyıcı sistemler katyonik yapıda olup, anyonik yapıdaki geni elektrik yüklerinin farklılığından dolayı iyonik etkileşimle bağlamakta ve poliplex yapılar oluşturmaktadır. Taşıyıcı sistemin katyonik yapısı ve bazılarının bunun yanında lipofilik veya hidrofobik özellikleri nedeniyle lipoprotein yapıdaki hücre membranına afiniteleri olduğundan bağlanabilmektedir. Gerek iyonik etkileşim ve gerekse de kimyasal seçicilik nedeniyle, hücre membranı ile bağlantılar kurulduktan sonra hücrenin endositoz mekanizmaları ile içeriye giren taşıyıcı sistemler çekirdeğe kadar taşınabilmekte sonrasında hücredeki enzimatik mekanizmalar ile yıkılmalarak gen serbest kamakta ve hücre transfekte edilmektedir. Gen taşıyıcı sistemlerin bir kısmı lipofilik yapıdayken, birçok gen taşıyıcı sistem ise nanopartiküler sistemler olarak işlev yapmaktadır (Gök ve ark 2019, Chuan ve ark. 2019). Bunun dışında, yine DNA'nın negatif elektrik yükünden faydalanarak özellikle kanatlı yumurtalarında, gen bileşiğinin hücre içine sokulması mümkündür (Lu ve ark. 2017). Elde edilen transfekte hücrelerin klonlama yöntemiyle kullanılmasında hücre membranlarının kaynaşabilmesi için de elektrik akımından yararlanılmaktadır (Potter ve Heller 2018).

2.3.2.1. Transpozonlar ve Lentiviral Vektörler

Transpozonlar ve lentiviral vektörler, yapıları gereği oosit ve zigotların içerisine kendi başlarına girebilmekte ve hedef DNA'ya bağlanabilmektedirler. Bu sebeple kullanıcılara kolaylık sağlamaktadırlar. Ancak bununla birlikte sığırlarda bu yöntemin gerçekleştirilmesi için, perivitellin aralığa mikroenjeksiyon yapılması gerektiği belirtilmiştir (Hoffman ve ark. 2004).

Viral vektör veya transpozon kullanıldığı takdirde, transpozon ve virüslerin boyutlarına bağlı olarak sadece küçük gen parçaları kullanılabilmekte, bununla birlikte rastgele entegrasyon ve bilinmeyen sayıda bağlanma görüldüğü için tam kontrol sağlanamamaktadır. Kullanılan deney hayvanına göre patojen olmayan viral vektörler seçilse dahi, virüslerin hastalık potansiyeli olması da kullanım açısından sıkıntı yaratmaktadır (Niemann ve ark. 2005, Wiznerowicz ve Trono 2005).

2.3.2.2. SMGT ve ICSI

Spermatozoonların hücre içerisine sokulmak istenen gen parçacıklarıyla inkübe edilmesi sonucunda, bu parçacıkların spermatozoon membranına yapıştığı, bununla birlikte oosit içerisine enjekte edilen spermatozoonlar ile transgenesis sağlanabildiği bildirilmiştir (Lavitrano ve ark. 2002).

Seminal plazmada bulunan enzimlerin, genin spermatozoon üzerine yapışmasını engelleyebileceği belirtilmiştir (Spadafora 2002). Bu teknik in vitro fertilizasyon ile yapılabileceği gibi başarı oranını arttırmak için, intrasitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu yöntemiyle birlikte kullanılmaktadır. Bu, daha yüksek başarı oranı sağlamakla birlikte (Yong ve ark. 2006), iş yükünü arttırmaktadır.

2.3.2.3. Somatik Hücre Nükleer Transfer Yöntemi

Bu yöntem, transgenesis ve klonlamayı birleştiren bir yöntemdir. Çeşitli yöntemlerle transgenik hale getirilen hücrelerin, genetik materyali çıkarılmış oositlere aktarılması ile gerçekleştirilmektedir.

Bu yöntemde, somatik hücrelerin transfeksiyon ve senkronizasyonu, oositlerin enükleasyonu, somatik hücrelerin transferi gibi çok fazla aşama bulunmakta ve iş yükü artmaktadır. Ancak klonlama çalışmalarının birçok hayvanda gerçekleştirilebilmiş olması,

transgenesis uygulamalarının gelişmesi için oldukça uygun bir alan yaratmaktadır (Houdebine 2002).

2.3.2.4. Embriyonik Kök Hücre Enjeksiyonu

Bu yöntemde, morula veya blastosist aşamasındaki embriyolar içerisine mikroenjeksiyon yöntemiyle transfekte blastomerler bırakılır ve bunun sonucunda kimerik yavrular elde edilmesi hedeflenir. Ardından, bu hayvanlardan yavru elde edilmesiyle de istenilen gene sahip hayvanların üretilmesi sağlanmaya çalışılır (Houdebine 2009).

2.3.2.5. Gen Enjeksiyonu

Gen enjeksiyonu, ilk kullanılmaya başlanan ve başarı elde edilen transgenesis yöntemidir. 1980'li yıllardan beri kullanılmakta ve geliştirilmektedir (Gordon ve ark. 1980). İşlem, mikromanipülatörler aracılığıyla tutucu ve enjeksiyon olmak üzere iki mikropipet ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde gerek pronükleuslara ve gerekse de sitoplazmaya olmak üzere hücrenin istenen bölgesine enjeksiyon yapılabilir.

Tutucu pipetin vakumlanmasıyla sabitlenen oosit veya embriyo içerisine, enjeksiyon pipeti ile gen verilebilmektedir. Bu yöntem, öncelikle farelerde (Gordon ve ark. 1980) kullanılan bir yöntem olmakla birlikte, daha sonra tavşan, domuz ve koyun gibi diğer hayvanlarda kullanılmaya başlanmıştır (Houdebine 2002).

Pronüklear enjeksiyon yöntemi, pronükleusları net olarak görünen ve ayırt edilebilen fare gibi hayvanlarda sıklıkla tercih edilmektedir. Çiftlik hayvanlarında ise, sitoplazmanın granüllü opak yapısından ötürü çok tercih edilmemekle birlikte, bu yöntem kullanılarak inek (Krimpenfort ve ark. 1991), koyun (Wright ve ark. 1991), keçi (Ebert ve ark. 1991), domuz (Velandar ve ark. 1992) ve tavşan (Voss ve ark. 1990) gibi hayvanların üretimi de sağlanmıştır.

İntrasitoplazmik enjeksiyon yönteminde ise pronükleuslara göre daha fazla miktarda genin hücre içine verilme imkânı olmakla birlikte, pronükleusu arama ve bulma zorunluluğu da bulunmamaktadır. Bu nedenle inek, koyun gibi pronükleusların görülmesi zor olan hayvanlarda daha avantajlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Yapılmış az sayıda çalışma olmasına rağmen, bu yöntemle transgenik domuz (Li ve ark 2014) elde edilmiştir.

Bu yöntem diğerlerine göre pahalı görünmekle beraber, öteki yöntemlerde sağlanan başarının benzerini tek başına gösterebilmesi ve yerleşik düzende kullanımının daha kolay olması, tercih sebebi olmuştur.

Çiftlik hayvanlarında, in vivo ortamda az sayıda oosit elde edilebilmesi nedeniyle bu yöntem başlangıçta pek tercih edilmemiştir. Ancak son yıllarda in vitro oosit elde etme ve olgunlaştırma çalışmalarının gelişmesiyle birlikte, bu problemin önüne geçilmiştir (Gordon 2004).

Hücre membranının geçilerek, istenilen büyüklükteki gen parçalarının oosit veya embriyo içerisine verilebilmesi, ayrıca işlemin hızlı ve kolay olması da bu yöntem için tercih sebebi olmuştur.

2.3.2.6. İntrasitoplazmik ve Pronükleer Gen Enjeksiyonu Yöntemlerinin Karşılaştırılması, Karşılaşılan Problemler

Embriyo ve oositlerde transgenesis uygulamasının birçok amacı bulunmaktadır. Amaçlanan hedefe göre farklı bileşik ve yöntemler kullanılabilir. Hedef spesifik bir bölgedeki küçük bir bölgeyi değiştirmek veya elimine etmek olduğunda, nokta atışı olarak küçük gen bileşikleri kullanılabilir. Büyük değişiklikler hedeflendiğinde, bazı tetik genler yerleştirilmek veya bazı genler susturulmak istendiğinde ise daha yüksek hacimde enjeksiyonlar kullanılmaktadır (Bishop 1996; Würtele 2003; Sumiyama ve ark. 2010).

Pronükleer enjeksiyon yönteminin, pronükleusların tespit edilebildiği fare, sıçan gibi hayvanlarda, küçük hacimdeki bileşikler için çok uygun olduğu ve etkinliğinin de yüksek olduğu bildirilmiştir (Würtele 2003; Sumiyama ve ark. 2010). İntrasitoplazmik gen enjeksiyonunun genel olarak büyük miktarda gen bileşiklerinin hücre içerisine verilmesine olanak sağlaması ve pronükleer enjeksiyona göre daha geniş bir alana enjeksiyon yapma kolaylığı sağlaması gibi avantajları bulunsada bu yöntemin bazı dezavantajları da bulunmaktadır (Krisher ve ark. 1994; Iqbal ve ark. 2009; Horii ve Hatada 2017; Sumiyama ve ark. 2010).

Bazı araştırmacılar, pronükleus enjeksiyonu sırasında nükleer membranın elastikiyetinin plazma membranından düşük olması (Horii ve Hatada 2017) ve sitoplazma içerisinde pronükleusların görülmesinin zor olduğu türlerde yanlışlıkla pronükleus içerisine enjeksiyon yapılabilmesi ihtimali sebebiyle, pronükleer enjeksiyonun intrasitoplazmik

enjeksiyondan daha kolay olduğunu iddia etmektedir (Horii ve Hatada 2017; Sumiyama ve ark. 2010) .

Bununla birlikte, intrasitoplazmik enjeksiyon yönteminde pronükleer enjeksiyon yöntemine göre daha fazla embriyo gelişimi ve daha fazla sayıda blastosist aşamasına ulaşan embriyo görülmesi sebebiyle, hücreye daha az zarar verildiği düşünülmektedir (Iqbal ve ark. 2009, Sumiyama ve ark. 2010). Ancak intrasitoplazmik gen enjeksiyonunda elde edilen transgenik hücre sayı ve oranları pronükleer enjeksiyona göre daha düşüktür (Iqbal ve ark. 2009).

İntrasitoplazmik enjeksiyon yöntemi, küçük hacimde dahi toksik etki görülebilen pronükleer enjeksiyon yöntemine kıyasla, büyük hacimde ve yoğunlukta gen bileşiğinin hücre içerisine verilmesi için uygun bir yöntemdir (Krisher ve ark. 1994; Sumiyama ve ark. 2010). Aynı şekilde, düşük yoğunluklu ve düşük hacimdeki gen süspansiyonları intrasitoplazmik yöntemle hücre içine verildiğinde, transgenik embriyo elde etme ihtimali düşmektedir (Iqbal ve ark. 2009; Sumiyama ve ark. 2010; Abe ve ark. 2020). Bu nedenle yüksek hacim ve yüksek yoğunluk kullanılması, aynı zamanda bir gereklilik haline gelmiştir. Her ne kadar yüksek gen konsantrasyonu ile daha yüksek integrasyon oranları sağlanabilse de yüksek hacim ve özellikle yüksek yoğunlukta lineer gen süspansiyonları kullanıldığında kendi içerisinde birleşerek başkalaşmaya daha açık oldukları da bildirilmiştir (Bishop 1996; Würtele 2003).

Plazmidin tek başına pronükleuslara enjeksiyonu sonrasında etkinlik görülebilmemesine karşın, plazmidin intrasitoplazmik enjeksiyonu sonrasında aynı etkinliği göstermediği bildirilmiştir. İntrasitoplazmik enjeksiyonda istenmeyen etkiler görülebilmemesi ve plazmid etkinliğinin düşük olması sebebiyle başarı şansının artırılması için, daha düşük hacim ve yoğunlukta daha yüksek transgenesis sağlamak amacıyla, intrasitoplazmik yöntemle hücre içerisine verilecek gen bileşiklerine transpozonlar ve transpozazlar eklenmiş ve bunun daha etkili olduğu görülmüştür (Shinohara ve ark. 2007; Sumiyama ve ark. 2010).

Transgenesis uygulamalarında görülen en büyük problemler; ekspresyon görülmemesi, ekspresyon miktarında görülen çeşitlilik ve değişik doku ve zamanlarda (gelişim evresi) ekspresyondur (Bishop 1996).

Birçok araştırmacı, transfer edilen transgenik embriyoların sayısı ile doğan transgenik yavru sayısının birbirini tutmadığını belirtmişlerdir (Krisher ve ark. 1994; Bondioli ve ark. 1988; Canseco ve ark. 1994). Buna neden olarak da, mozaizm ve genin hem enjeksiyondan hemen sonra sitoplazmanın dışına atılması veya mozaik yapıdaki transgenik hale gelen

hücrelerin embriyo oluşumunun dışında bırakılması gibi problemleri gösterilmiştir (Krisher ve ark. 1994).

Bu durum, özellikle intrasitoplazmik gen enjeksiyonlarında görülmektedir. Bu yöntemde, gen bileşiği sitoplazmaya yayılmış halde bol miktarda bulunmaktadır. Genin entegrasyon süresi hayvandan hayvana değişmekle birlikte, genellikle uzun bir süreye yayılmaktadır (Burdon ve Wall 1992; Canseco 1994; Powell 1992). Bu durum transgenik embriyo sayısını arttırmaktadır (Burdon and Wall 1992) ancak, bununla beraber mozaizm de artmaktadır (Krisher ve ark. 1994; Horii ve Hatada 2017). Mozaizm, farklı hayvanların farklı dokularında farklı yoğunluklarda gen ekspresyonu görülmesine sebebiyet vermektedir (Iqbal ve ark. 2009).

Embriyonik ve daha sonrasındaki fetal gelişimde bu mozaizm içerisinde hangi hücrelerin transfekte olduğunun çok büyük önemi vardır (Krisher ve ark. 1994). Sığırlarda (Bondioli ve ark. 1988) ve farelerde (Canseco ve ark. 1994) yapılan çalışmalarda, transgenik embriyo ve yavru sayısının birbirini tutmaması sonucunda yapılan incelemelerde, bu hayvanlarda transgeni içeren hücrelerin önce embriyonun dış kısmına, ardından da plasentaya yoğunlaştığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda, transgenik olduğu düşünülen embriyoların transgenik kısımları plasentada kalmış ve gen ekspresyonu olmayan yavrular dünyaya gelmiştir.

2.3.3. Gen Entegrasyonu Öncesi, Sırası ve Sonrası

Bir genin hücrenin genomuna girmesi yapay olarak gerçekleşebildiği gibi, doğal olarak da gerçekleşebilmektedir. Hücre içerisindeki apoptotik cisimciklerden, hücre genomunun hasarlı bölgelerinin onarılması için mitokondriyal DNA'dan giriş olabilmekte veya giriş olmadan translokasyon gerçekleşebilmektedir (Würtele 2003).

Araştırmacılar, yabancı genlerin embriyonun genomuna nasıl dahil olduğuyla ilgili birçok araştırma yürütmüşlerdir. Özellikle tek hücreli aşamada dahi gen enjeksiyonu yapılan embriyoların gelişiminde de mozaizm görülmesi, yabancı genin embriyo genomuna DNA replikasyonu sırasında dahil olduğunu düşündürmektedir (Krisher ve ark. 1994, Bishop 1996, Würtele 2003).

Gen bileşiklerinin embriyonun kendi genetik materyaline bağlanma yöntemlerinin iki şekilde olduğu düşünülmektedir. Bunlar; hücre onarım mekanizmalarına bağlı rastgele integrasyon, sonuna bağlanma (end joining) ve homolog rekombinasyon yöntemleriyle olduğu düşünülmektedir. Bu yöntemlerden rastgele bağlanma, ağırlıklı olarak gerçekleşen durumdur.

Homolog rekombinasyon, hücrenin G2 ve S fazlarında aktivite gösterirken, rastgele yerleşim her dönemde olabilmektedir (Würtele 2003).

Gen bileşiğinin hücre içerisine verilmesinden sonraki süreçte yapılan analizlerde, bu iki olayın ve özellikle homolog rekombinasyonun etkisiyle gen bileşiklerinde kromozomlara bağlanmadan önce değişiklik olabildiği gözlemlenmiştir (Bishop 1996; Würtele 2003). Sona bağlanma etkisiyle lineer yapıdaki gen bileşiklerinin sirküler yapıya dönebildiği ve dahi sirküler yapıdaki gen bileşiklerinin sitoplazmada bulunan endonükleazların etkisiyle kısa lineer parçacıklar haline gelebildiği bulunmuştur. Lineer halde verilen veya daha sonradan lineer hale gelen parçacıkların homolog rekombinasyon ile kendilerini çoğaltması ve bunların embriyo genomunda rastgele bölgelere bağlanma ihtimaliyle birlikte, öngörülemeyen ve çoğunlukla istenmeyen gen modifikasyonları oluşabilmektedir (Bishop 1996; Würtele 2003).

Gen bileşiklerinin hücre genomuna bağlanması genellikle birden fazla noktadan ve birden fazla kopyayla olmaktadır (Krisher ve ark. 1994; Bishop 1996; Würtele 2003; Sumiyama ve ark. 2010). Entegrasyon sonrasında, entegre olan gen bileşiği dışında başka bir değişiklik görülmediği durumlar da olabilmektedir. Ancak, çoğunlukla bu entegrasyonlar sonucunda embriyo için letal değişiklikler meydana gelebilmekte, bu da erken embriyonik ölümle sonuçlanmaktadır (Bishop 1996; Würtele 2003). Yukarıda anlatılan beklenmedik gen parçacıklarının etkisiyle bağlanma sonucunda da aynı şekilde ölümler görülebilmektedir (Krisher ve ark. 1994; Bishop 1996; Würtele 2003). Hücre ölümü dışında, gen kodlamasının bozulması ve buna bağlı gen susması, fonksiyon bozukluğu, önemli fenotip değişiklikleri gibi durumlar da görülebilmektedir. Özellikle aşırı miktarda gen kopyasının aynı bölgeden bağlanması durumunda genin sustuğu gözlemlenmiştir (Würtele 2003).

Homolog rekombinasyon kullanılarak yapılan transgenesis, gen hedefleme teknolojilerini içermekte ve daha öngörülebilir sonuçlar vermektedir. Yine de entegrasyon öncesi sitoplazmada meydana gelen değişiklikler nedeniyle sonuçlar önceden tam olarak kestirilememektedir (Bishop 1996; Würtele 2003).

Rastgele bağlanma durumunda ise genlerin bağlanma bölgeleri ve nereden ne miktarda bağlanacağı ve sonucun ne olacağı öngörülememektedir. Yapılan çalışmalar, bazı bileşiklerin bazı bölgelere daha çok bağlanma yatkınlığında olabileceğini gösterse de mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Würtele 2003).

Sitoplazmanın sürekli hareket halinde olması sebebiyle, gen bileşiği ve hücrenin kendi genetik materyali de sürekli hareket halindedir. Erken dönem gen enjeksiyonlarında da pronükleer zarların yıkılması ve pronükleusların birleşimi aşamasında görülen görece

büyük pozisyon değişikliklerinin, gen bileşimini hücre dışına doğru hareketlendirebildiği, bu sebeple genin zamanla hücre dışına atılabildiği gözlemlenmiştir (Krisher ve ark. 1994; Abe ve ark. 2020).

2.3.4. Transgenesiste İlerlemeler

Transgenesis için ilk kullanılan yöntem olan mikroyeksiyonda, gen entegrasyonu genellikle rastgele olmakta, genin bağlandığı bölge ve ne kadar tekrarla bağlanacağı bilinmemektedir. Bu nedenle, transgenin susması veya başka genlerde susmaya yol açması görülebilmektedir. Bunun önüne geçebilmek için, yapay kromozomlar (bakteri, bakteriyofaj ve mayalardan elde edilen BAC, PAC ve YAC'lar) ve gen hedefleme teknolojileri kullanılmaya başlanmıştır (Shedl ve ark. 1992, Montolui ve ark. 1993).

2.3.4.1. Gen Hedefleme Teknolojileri

Bu teknolojiler içinde; yapay kromozomlar, ZFN, TALEN ve CRISPR yöntemleri sayılabilmektedir. İlk ikisiyle başlayan çalışmalar CRISPR yönteminin bulunmasıyla neredeyse tamamen bu yönetime yönelmiştir.

Bu yöntemlerle DNA'da istenilen bölgeye bağlanılabilmekte ve böylelikle genomda; genin kesilerek susturması, yeni gen sokulması ve gen değişikliği gibi istenilen değişiklikler yapılabilmektedir. Hepsinde, DNA'nın her iki zincirinde de kesim meydana gelmektedir. Kesilme gerçekleştikten sonra, bakterilerden model alınmış onarım sistemleri ile transfeksiyon sağlanmaktadır.

Yapay kromozomlar olan BAC ve PAC 350 kb; YAC ise 1MB boyuttan büyük genetik kodu içeren genlerin kullanılabilmesine ön ayak olmuştur (Gama Sosa ve ark. 2010). Bu genler, içlerinde barındırabildikleri ve henüz fonksiyonları bilinmeyen bazı bileşenlerinden ötürü, daha yüksek başarı gösterebilmiştir (Giraldo 1999, Giraldo ve Montolui 2001). Ancak bununla birlikte, yine bu bilinmeyen fazla gen dizisinin beklenmeyen fenotipik farklılıklara yol açabildiği bilinmektedir (Montolui 2002).

İstenen genin başarılı bir şekilde hedef canlıya aktarılıp aktarılmadığının izlenmesi amacıyla, BAC ve YAC'lara flöresan işaretleme bölgeleri eklenmeye başlanmıştır. Flöresan ışımaya tespiti, genin entegrasyonu için gözlem yapma fırsatı tanımıştır (Yang ve ark. 2006, 2009). Bu başarıya karşın negatif yön olarak sayılabilecek etki ise, sadece öngörülemeyen fenotip farklılığı olarak belirtilmiştir (Gama Sosa ve ark. 2010).

ZFN (Zinc-Finger Nükleaz) yöntemi, biri gen hedefleyen biri de gen kesmeyi sağlayan nükleaz olarak iki kısımdan oluşan bir yapıdır (Samanta ve ark. 2016). Nükleaz yapısı bakteri kaynaklıdır (Wah ve ark. 1998). Dizaynı kolaylaştıran birçok metot bulunmasına rağmen, istenilen her sekansın hedeflenememesi sınırlayıcı bir faktördür (Osakabe ve ark. 2015).

TALEN (Transcription Activator Like Effector Nucleases) yöntemi ZFN yöntemine benzerdir ancak bağlanmak için kullanılan bölgesi farklıdır (Samanta ve ark. 2016). Bu yöntem de bakteri kaynaklıdır. ZFN yöntemine alternatif olarak ortaya çıkmış ve kullanıma geçmiştir.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) yöntemi, bu yöntemler arasında en son çıkan ve şu anda en çok kullanılan yöntemdir. Çalışma prensibi, RNA aracılı nükleazlara dayanmaktadır (Bortesi ve ark. 2015). CRISPR doğal olarak, bakterilerin kendi DNA onarım sisteminin bir parçası olarak bulunmaktadır ve bununla genetik modifikasyon sağlanabileceğinin bulunmasıyla transgenik teknolojide kullanılmaya başlamıştır. CRISPR sistemi, Cas proteinleriyle birlikte kullanılmaktadır. En çok kullanılan CRISPR/Cas9'dur fakat, başka Cas proteinleri de kullanılmaktadır (Akbudak ve Kontbay 2017).

2.3.5. Transgenik Canlı Üretiminde Karşılaşılan Problemler

Başarı oranının düşüklüğünün yanı sıra, transgenik hayvanlar eğer tüketilecekse, bunları tüketen insanlar ve çevre üzerine etkisi hakkında çekinceler ve etik problemler bulunmaktadır.

Hücre içerisine verilen DNA parçacığının nereye bağlandığı, kaç kopya ile bağlandığı, hedeflenen bölge dışında başka yerlerde başka etkilerinin olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Genin verildiği bölgede bağlandığı yerdeki doğal kontrol sistemleri aracılığıyla susturulması ve istenenden farklı bölgelere bağlandığında beklenmeyen yan etkiler görülmesi, karşılaşılan başlıca problemlerdir (Bonifer ve ark 1996, Henikoff 1998). Kanser üzerine yapılan çalışmalar için hayvan modeli oluşturmaya yönelik gerçekleştirilen ilk çalışmalardan birinde, aktif onkogen transfer edilen farelerde ayrıca ekstremitelerde gelişimde problemler görülmüştür (Woychik ve ark. 1985). Yine istenmeyen bir yan etki olarak, antibiyotik direnci ile seçilen genlerin vücut içerisinde değişerek, antibiyotiğe dirençli mikroorganizma oluşturabileceği düşünülmektedir (Vandenbergh ve ark 2002).

Transgenik hayvanların insan tüketimine direkt olarak sunulması, pratikte gerçek olmasa dahi şu an için tüketilen transgenik bitkilerin ve gelecekte tüketime sunulması olası olan

transgenik hayvanların insanlar üzerinde oluşturabileceği etkiler de tartışma konusu olmuştur. Gıda sağlığı açısından yeterli veri olmaması sebebiyle, bu konudaki şüpheler devam etmektedir. Sadece gıda tüketimi olarak değil, organ ksenotransplantasyonu veya biyoreaktör eldesi gibi konularda da tüketim kaygısı bulunmaktadır. Bunlar; alerjik reaksiyon potansiyeli, biyoaktivite ve toksisite olarak sayılabilir (Vandenbergh ve ark. 2002).

Çevre üzerindeki problemler ise daha çok gen havuzu ve popülasyonun geneli hakkındaki endişelerden kaynaklanmaktadır. Doğal seleksiyonun engellenmesi veya ortadan kaldırılması, transgenin yayılımıyla popülasyonun geleceğinin ve transgenin nereye gideceği, değişik popülasyonların kontrolünün elden çıkması ve çevreye ve ekosisteme zararlı yeni canlıların ortaya çıkması ihtimalleri endişe yaratmaktadır (Ricklefs 1990, Muir ve Howard 1999).

Her türlü hayvan deneyinde bulunan etik problemler, kullanılan deney hayvanı sayısı, hayvanların yaşam koşulları, deneylerin hayvana yarattığı sorunların kontrolü gibi problemler, deney hayvanlarının kullanıldığı bu çalışmalarda da söz konusudur. Buna ek olarak, ksenotransplantasyon veya biyoreaktör eldesi gibi konularda hayvanın onayının veya gönüllülüğünün söz konusu olamaması da ayrıca tartışılmaktadır (Vandenbergh ve ark. 2002).

3. YÖNTEM

Doktora çalışmasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı'na ait Androloji Laboratuvarı ve IVF Laboratuvarı kullanılmıştır.

3.1. İN VİTRO FERTİLİZASYON PROTOKOLÜ

Fertilizasyonun ardından farklı saatlerde gen enjeksiyonu gerçekleştirmek üzere İn Vitro Maturasyon (Olgunlaştırılması) (IVM) ve İn Vitro Fertilizasyon (IVF) aşamaları ve enjeksiyonun ardından, embriyo gelişimlerinin izlenmesi için İn Vitro Kültür (IVC) aşamaları sırayla gerçekleştirildi.

3.1.1. Oositlerin Kazanılması ve Olgunlaştırılması (İVM)

Oositler mezbaha materyalinden doğrama (slicing) yöntemiyle elde edildi.

Maturasyon için 4 kuyucuklu maturasyon petrileri kullanıldı (Oosafe) ve her kuyucuğa 500 µL BO-IVM medyumunu koyularak maturasyon petrileri hazırlandı. Bununla birlikte, aktarma öncesi yıkama için 35 mm'lik hücre kültürü petrilere (Greiner) 50 µL'lik 4 damla hazırlandı ve mineral yağ ile kaplandı. Bu petriler, gazlanmak üzere bir gün önceden inkübatöre kaldırıldı (%5 CO₂, 38,5 °C, %99 nem).

Organ toplama günü sabahında, gün içerisinde kullanılacak tüm malzemeler buzdolabından 35-37 °C'lik benmariye alındı ve laboratuvarında kullanılacak aletler hazırlandı. Mezbahada kesilen koyunların ovaryumları toplanarak 30-35 °C'de fosfat tamponlu su çözeltisi (PBS) ile doldurulmuş termoslar içerisine toplandı ve 2 saat içerisinde hazırlık laboratuvarına getirildi.

Hazırlık laboratuvarında ovaryumlar ayrıldı ve 35 °C'ye ısıtılmış PBS çözeltisi ile yıkayıp yine PBS içerisinde beherlere aktararak en kısa süre içerisinde doğrama (slicing) işlemine başlandı.

Doğrama işleminde bistüri yardımıyla ovaryumlar üzerine yüzeysel kesiler atıldı ve bu kesilerin içi, Oosit Yıkama Medyumunu (OWM) ile yıkandı. Yıkama sıvısı saat camları içerisine toplandı ve hızlıca stereo mikroskop altında incelendi.

Bulunan oosit-kumulus kompleksleri (COCs), üzeri mineral yağla kaplanmış yıkama petrilere aktarıldı. Mezbahadan gelen bütün ovaryumların doğrama işlemi bitip bütün saat camları incelendikten sonra, biriken COCs incelenerek 1. kalitedeki oositler (oosit sitoplazması homojen ve koyu renkli, zona pellusidası sağlam ve etrafında en az 4-8 katman kumulus hücresi olanlar) seçildi. Ardından oositler, 3 kere OWM, 1 kez BO-IVM medyumlarında yıkandı ve her bir kuyucuğa 50 civarında hücre gelecek şekilde 4 kuyucuklu maturasyon petrilere akarıldı.

Petriler inkübatöre kaldırıldı ve oositler 22 saat boyunca in vitro maturasyona bırakıldı (%5 CO₂, 38,5 °C, %99 nem).

3.1.2. Spermanın Hazırlanması ve İn Vitro Fertilizasyon (İVF)

Oositlerin maturasyona konulduğu gün, ertesi güne hazır olması için BO-IVF medyumunu ve yıkamaları BO-IVM'le aynı şekilde hazırlandı ve aynı koşullardaki inkübatöre kaldırıldı (%5 CO₂, 38,5 °C, %99 nem).

Sperma, fertilizasyondan 2 saat önce Anabilim Dalı'na ait iki koçtan suni vajen ile alınarak androloji laboratuvarına getirildi. Muayeneleri yapıldı ve +++ ve ++++ mass aktivite değerindeki spermalar pooling yapılarak IVF-ET laboratuvarına taşındı. Burada Percoll-SOF yöntemi kullanılarak iyi kalitedeki hiperaktif spermatozoonlar ayrıldı.

Bunun için önceden Percoll ve Hapes tamponlu Sentetik Ovidukt Sıvısı (HSOF) medyumları oda sıcaklığına çıkarıldı ve ısıtıldı. Laboratuvara gelen sperma 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı 1:1 oranında HSOF ile sulandırılıp 600 G'de 5 dk santrifüj edilerek 2 kere yıkandı.

Daha iyi olan örneğin seçilebilmesi için, bu aşamadan sonra 2 adet örnekle çalışıldı. Aynı ayrı 2 tane 15'lik santrifüj tüpünün içerisine 2 mL %90'lık Percoll-SOF çözeltisi konuldu. Bunun üzerine, ayrı bir tüpte 1:1 oranında sulandırılarak hazırlanan %45'lik Percoll-SOF çözeltisi iki farklı yoğunluktaki medyum karıştırılmadan aynı hacimde eklendi. Üzerlerine yıkanan spermadan 200 µL eklenerek santrifüj edildi (600 G, 15 dk).

15 dakikalık santrifüj süresinde maturasyondaki oositler mikropipet yardımıyla BO-IVF medyumuna aktarıldı ve medyum değişikliğine adapte olmaları için fırsat tanındı.

Santrifüj sonucunda oluşan pelet dağıtılmadan, üstten 3 mL süpernatant uzaklaştırıldı ve kalan hacim kadar (2 mL) HSOF eklenerek tekrar santrifüj yapılarak percoll uzaklaştırıldı (600 G, 5 dk).

Süpernatant, en dipte 50 µL civarı pelet kalacak şekilde dikkatlice uzaklaştırıldı. Peletlerden örnek olarak ısıtma tablalı ışık mikroskobu altında motilite muayenesi yapıldı ve iki örnekten daha iyi olanı seçildi. Seçilen spermadan 995 µL formolsaline içerisine 5 µL örnek eklenerek fikse edildi ve yoğunluğu thoma lamı ile belirlendi.

Fertilizasyon petrisine, kuyucuk başına 400.000 spermatozoon ($8 \times 10^5/\text{mL}$) olacak şekilde doze edilerek eklendi. Sperma eklendikten sonra 4 kuyucuklu petri inkübatöre geri kaldırıldı ve hücrelerin gen enjeksiyonu saatlerine kadar inkübatörde kalması sağlandı.

3.2. GENİN HAZIRLANMASI

Genin üretilmesi için, önceden transforme edilmiş kompetent hücreler (*Escherichia coli*) kullanılmıştır.

3.2.1. Bakterilerin Hazırlanması

Bakterilerin üretilmesi için Luria Betrani (LB) medyumunu hazırlandı. Hazırlanan medyum mezürle 150 mL ölçülerek 250 mL'lik erlenmeyerlere aktarıldı, ağzı pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılıp otoklavlandı. Otoklavdan çıkan erlenmeyerlerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

Biyogüvenlik ve kontaminasyonlara karşı önlem olarak laminar flow kabini içerisinde back aleviyle çalışıldı. Kullanılacak olan kanamisin stok çözeltisi 45 mg/mL şeklinde hazırlandı. -80°C'de donmuş halde bulunan *E. coli* hücreleri oda sıcaklığında eritildi. Transforme bakterilerin çoğaltılması ve seleksiyonu için 10 µL/100 mL olacak şekilde *E.coli* ve 67 µL/100 mL olacak şekilde Kanamisin stok erlenmeyerlere eklendi ve ağızları yine pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılarak çalkalayıcıya koyuldu. Kontaminasyon kontrolü açısından kontroller hazırlandı (hiçbir şey eklenmemiş LB medyumunu ve sadece Kanamisin stok eklenmiş

LB medyumunu) ve diğerleri ile beraber çalkalayıcı inkübatöre yerleştirildi. Erlenler ve kontrol tüpleri 37,5 °C’de, 16-20 saat boyunca çalkalanmaya bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda kontrol grubunda üreme olup olmadığı kontrol edildikten sonra uygun olan erlenmayerlerin içerikleri 50 mL’lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 5 dakika süreyle santrifüj edilerek bakterilerin çökmesi sağlandı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve peletler daha sonra kullanılmak üzere -20 °C’ye kaldırıldı.

3.2.2. Gen İzolasyonu

Genin izole edilmesi için Machery-Nagel marka NucleoSpin Mini plazmid izolasyon kiti kullanıldı. Kitte belirtilen basamaklar kullanılarak gen izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen örneklerin ölçümü NanoDrop spektrofotometre cihazında yapıldı. Embriyoların enjeksiyonunda kullanım için 10 µg/µL olacak şekilde konsantrasyonlar ayarlandı ve porsiyonlanarak çalışma günü eritilip kullanılmak üzere -20 °C’ye kaldırıldı.

3.3. GEN ENJEKSİYONLARI

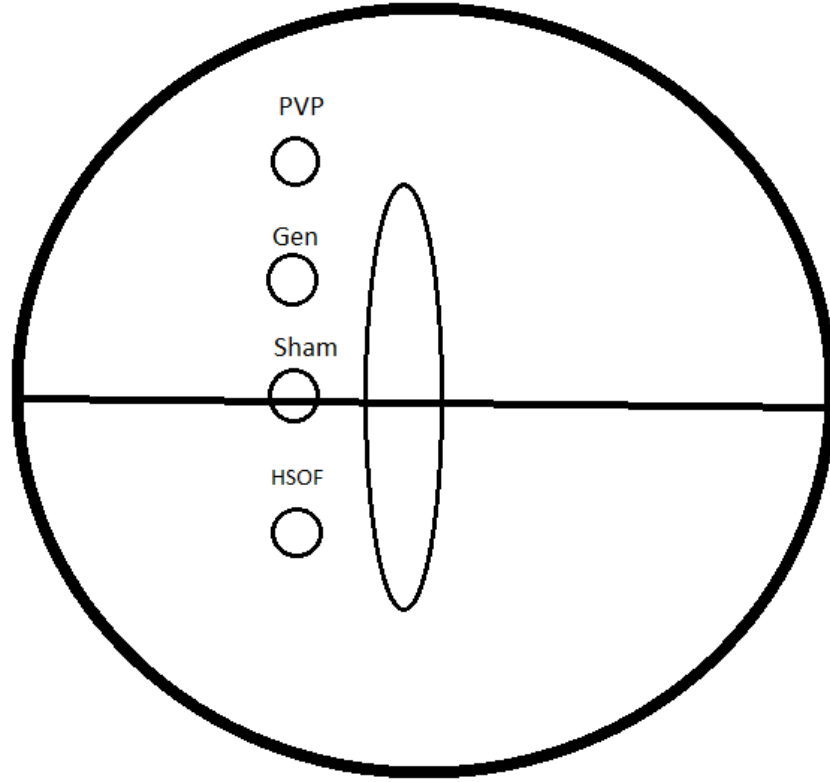
3.3.1. Oositlerin Hazırlanması

Oositler fertilizasyona konulurken, sayısal olarak rastgele 4’e bölündü ve 4’lü wellerin kuyucuklarına bırakıldı. Her saat için bir kuyucuktaki hücreler inkübatörden alındı. Fertilizasyonun ardından 3. saatte enjeksiyonlara başlayabilmek için işlemiden 15 dakika önce oosit hazırlığına başlandı.

Alınan hücrelerin kumuluslarını uzaklaştırmak için hiyaluronidaz içeren santrifüj tüplerine konuldu ve 1 dakika 15 saniye boyunca vortekslendi. Ardından, mikropipet yardımıyla toplanıp pipetleme yapılarak zona üzerinde kalan kumulus hücreleri olabildiğince uzaklaştırıldı. Bu işlemin sonunda çekilerek inceltilmiş cam pastör pipeti yardımıyla toplandı ve HSOF içerisine aktararak manipülasyona hazır hale getirildi.

3.3.2. Gen Enjeksiyonu

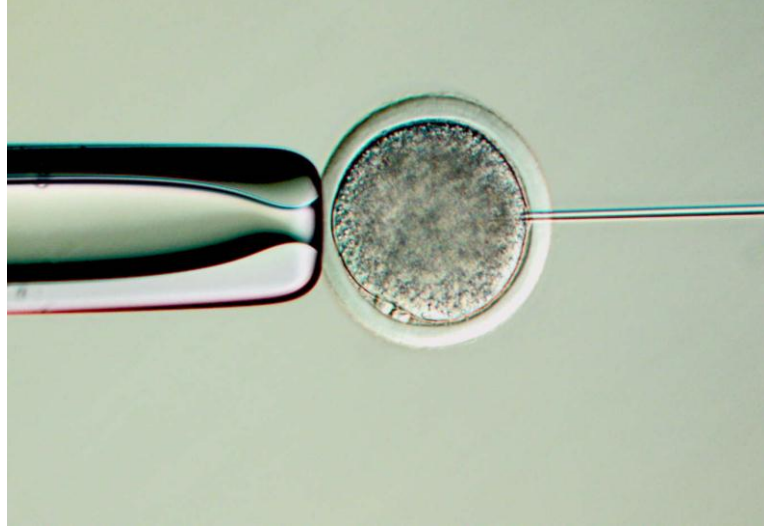
Enjeksiyon petrisi; enjeksiyon pipetinde kullanılmak üzere PVP, manipülasyon ve atılacak oositler için HSOF, sham enjeksiyonlar için genlerin hazırlığında sulandırıcı olarak kullanılan “elution buffer” ve gen enjeksiyonları için 10 µg/µL dozunda ayarlanmış gen konstraktı damlaları oluşturuldu. Her gen enjeksiyonu saati için petriler yeniden taze olarak hazırlandı.



Şekil 3-1: Enjeksiyon petrisi, 60'lık petri kapağına hazırlanan şema.

Mikroenjeksiyonlar, mikromanipülatörde Piezzo cihazı kullanılarak gerçekleştirildi (**Şekil 3-2**). Bütün gruplar için mümkün olduğunca kısa sürede (en fazla 30 dakika içerisinde) işlem tamamlandı. Üç, beş, yedi ve dokuzuncu saatlerde gen enjeksiyonu uygulandı. Çalışma gruplarının hepsi için aynı zamanda sham ve negatif kontrol grupları uygulandı. Her enjeksiyon deneme grubu için, hücre içerisine enjeksiyon pipetiyle girerek içinde gen bulunmayan elution buffer solüsyonu aynı hacimde enjekte edilerek sham grupları da çalışıldı. Enjeksiyon uygulamasının negatif etkisinin olup olmadığının gözlenebilmesi için ise bir grup hücre, hiçbir işlem uygulanmadan kültür protokolüne devam ettirildi (negatif kontrol).

Manipülasyonu tamamlanan hücreler tekrar HSOF içerisine aktarıldı. Burada yıkanan oositler, çalışma sabahında hazırlanıp gazlanması için inkübatöre kaldırılan embriyo kültür medyumunu (IVC) içerisine aktarıldı. Kültür için embriyolar 20 µL'lik damla içerisine 8-12 hücre olacak şekilde aktarıldı. İn vitro kültür, gaz kontrollü inkübatörde (%5 CO₂, %5 O₂, 38,5 °C, %99 nem), 8 gün boyunca devam ettirildi.



Şekil 3-2: Zigotlara yapılan gen enjeksiyonu örneği

3.4. EMBRİYOLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kültüre konulan embriyolar, yarıklanmaların kaydedilmesi ve bölünmemiş, fragmente veya dejenere olan hücrelerin ayrılması için 3. günde kontrol edildi. Bölünen ve bölünmeyen hücreler birbirinden ayrılarak farklı damlalara konuldu. Kültürün 8. günde gelişim ve parlama açısından değerlendirildi. Gelişim aşaması olarak fragmente, dejenere, lize, bölünmeyen, morula öncesi (2-4 hücre, 8-16 hücre), morula, kompakt morula, blastosist (erken blastosist, expanded blastosist, hatching blastosist ve hatched blastosist) gruplarında değerlendirme yapıldı.

GFP (green fluorescent protein) gen ekspresyonu değerlendirmesi için parlama kontrolleri ise flöresan ışık ve 486 nm'lik filtre kullanılarak yapıldı. Yeşil parlama gösterenler pozitif olarak kaydedilirken, embriyonun hücrelerinin ne kadarının transfekte olduğu incelendi ve yüzde olarak değerlendirildi.

3.5. İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME

Gelişme oranları ve parlama yüzdeleri için IBM SPSS Statistiks 21.0 programında Ki-Kare testi kullanıldı. Parlama oranı ortalaması karşılaştırmaları için One-Way Annova analizi kullanıldı.

3.6. KULLANILAN MEDYUMLARIN HAZIRLIĞI

Yapılan çalışmada PBS (Phosphate Buffer Saline), OWM (Oocyte Washing Medium), HSOF (HEPES Tamponlu Sentetik Ovidukt Sıvısı), Percoll, LB Medyum, CaCl_2 Stok, MgCl_2 Stok, Hyaluronidaz Stok ve PVP kullanılmıştır.

Kullanılan medyumların hepsi 270-295 mOsm ve 7,2-7,4 pH arasına sabitlenerek kullanıldı. Percoll hariç olmak üzere, tüm medyumlar 22 μm 'lik filtrelerden geçirildi ve hacmine göre otoklavlanmış cam shot şişeler veya 50 mL'lik falkon tüplerine konularak 4 °C'de buzdolabında uygun sürelerde saklandı.

Laboratuvarda hazırlanan medyumlar dışında, hazır olarak IVF Bioscience'in maturasyon, fertilizasyon ve kültür medyumları kullanıldı.

Tablo 3-1: PBS (Fosfat Buffer Saline)

Kimyasal	Miktar
Na_2HPO_4	2,16 g
KH_2PO_4	200 mg
KCl	200 mg
NaCl	8 g
Penisilin (İecilline)	250 IU
Distile Su	1 litreye tamamlandı

Tablo 3-2: OWM (Oocyte Washing Medium)

Kimyasal	Miktar
TCM 199	4950 mg
NaHCO ₃	168 mg
Heparin	5 mg
HEPES	1260 mg
Na-HEPES	1365 mg
BSA fraksiyon V	1500 mg
Penisilin	37,5 mg
Streptomisin	50 mg
Kanamisin	38 mg
Ultra saf su	500 ml'ye tamamlandı

Tablo 3-3: HSOF (HEPES Tamponlu Sentetik Ovidukt Sıvısı)

Kimyasal	Miktar
NaCl	314,7 mg
KCl	26,7 mg
NaH ₂ PO ₄	2,7 mg
NaHCO ₃	16,8 mg
CaCl ₂ stok	0,8 mL
MgCl ₂ stok	0,5 mL
Na laktat	23,5 µL
Na piruvat	1,8 mg
Glutamin	7,3 mg
Penisilin	3,75 mg

Tablo 3-3 (devam)

Streptomisin	2,5 mg
BSA fraction V	150 mg
Na-Hepes	137 mg
Hepes	126 mg
Phenol Red	0,5 mg
Embriyo test edilmiş ultra saf su (ETS)	50 mL'ye tamamlandı

Tablo 3-4: %90 Percoll SOF

Kimyasal	Miktar
NaCl	62,94 mg
KCl	5,34 mg
NaH ₂ PO ₄	0,54 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O-Stok	100 µL (2,52 mg)
MgCl ₂ .6H ₂ O- Stok	100 µL (1 mg)
Hepes	25,2 mg
Na-Hepes	27,4 mg
Percoll	10 mL'ye tamamlandı

Tablo: 3-5: LB Medyum

Kimyasal	Miktar
NaCl	5 gr
Pepton	10 gr
Yeast	5 gr
Distile su	1 L'ye tamamlandı

Tablo: 3-6: CaCl₂ Stok

Kimyasal	Miktar
CaCl ₂ .2H ₂ O	1260 mg
ETS	50 mL'ye tamamlandı

Tablo 3-7: MgCl₂ Stok

Kimyasal	Miktar
MgCl ₂ .6H ₂ O	500 mg
ETS	50 ml'ye tamamlandı

Tablo 3-8: Hiyaluronidaz Stok

Kimyasal	Miktar
Hiyaluronidaz	125 µg
HSOF	10 mL

4. BULGULAR

Çalışmada 4 tekrar yapılarak, enjeksiyon saati gruplarına göre sırasıyla; 123, 123, 125 ve 125'er zigot kullanıldı. Elde edilen embriyolar, gelişme aşaması ve parlama oranı açısından flöresan ataçmanlı ters mikroskop ile subjektif olarak değerlendirildi.

4.1. GELİŞME AŞAMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Ters Mikroskop altında gelişim aşamaları değerlendirilen hücrelerin toplam sayıları ve oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4-1). Gelişim aşamalarının istatistiki olarak hesaplanması için hücreler; yarıklanmış, morula öncesi, morula ve blastosist gelişim aşamalarına göre gruplandırılmıştır.

Her gen enjeksiyon saati grubu; gen bileşiğinin etkisinin araştırılması amacıyla, kendi sham grubuyla ve enjeksiyon işleminin etkisinin olup olmamasının anlaşılması için kontrol grubuyla karşılaştırılmış, yarıklanma ve gelişim aşaması sonuçları ayrı olarak değerlendirilmiştir.

4.1.1. Üçüncü Saat Gen Enjeksiyonu

Üçüncü saat için gen enjeksiyon grubunun, sham grubu ve negatif kontrolle karşılaştırmalı yarıklanma oranları Tablo 4-1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 3. saat enjeksiyonlarında, uygulamaya bağlı olarak istatistiksel olarak bir yarıklanma farklılığı görülmemekle beraber, gen bileşiği verilmeyen sham grubunda yarıklanma oranında istatistiki olarak önemli bir düşüş görülmüştür (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: 3. Saat gruplarındaki hücrelerin yarıklanma durumları.

Bölünme Durumu	Gen Enjeksiyonu	Sham Opere	Negatif Kontrol
	(%)		
Bölünmemiş	28 (22,8) ^a	15 (40,5) ^b	15 (25,9) ^{a,b}
Bölünmüş	95 (77,2) ^a	22 (59,5) ^b	43 (74,1) ^{a,b}

^{a,b}. Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır (P<0,05).

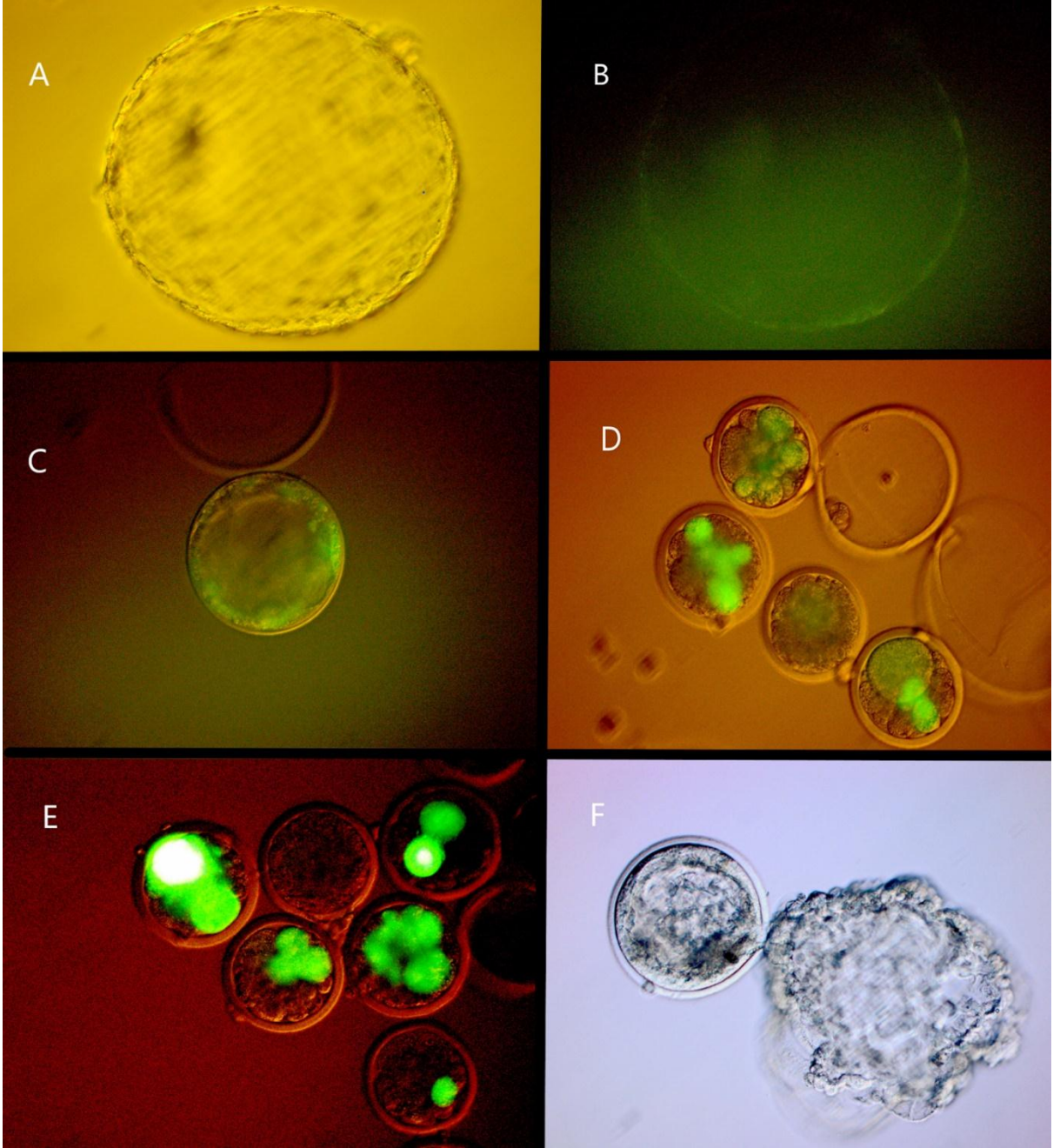
Çalışma grubunun in vitro kültürü sonrası sham grubu ve negatif kontrolle karşılaştırmalı gelişim aşaması değerleri Tablo 4-2’de verilmiştir. Gelişmemiş embriyo verisi; yarıklanmamış, fragmente, dejenere ve lize hücreleri kapsamaktadır.

Embriyonik gelişme aşamalarında gen enjeksiyon grubu, sham opere grubu ve kontrol grubu arasında istatistiki açıdan önemli bir fark görülmemiştir. Gelişemeyen embriyo oranlarının karşılaştırmasında ise sham opere grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek oranda (%48,6) gelişmeyen embriyo oranları görülmüştür (P<0,05) ancak, bu değerlendirme ölçütünde gen enjeksiyonu grubuyla kontrol grubu arasında bir fark görülmemiştir.

Tablo 4-2: 3. saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları.

Embriyo Gelişim Dönemi	Gen Enjeksiyonu	Sham Opere	Kontrol Grubu
	(%)		
Gelişmeyen Embriyo	50 (40,7) ^{a,b}	18 (48,6) ^b	15 (25,9) ^a
Morula Öncesi	8 (6,5) ^a	2 (5,4) ^a	9 (15,5) ^a
Morula	39 (31,7) ^a	11 (29,7) ^a	14 (24,1) ^a
Blastosist	26 (21,1) ^a	6 (16,2) ^a	20 (34,5) ^a

^{a,b}: Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır (P<0,05).



Şekil 4-1: Üçüncü saat enjeksiyon grubundan hücreler. A: Hatched Blastosist, B: A'daki Blastosist, parlama oranı%80, C: Ekspanded Blastosist, parlama oranı%80, D,E: Farklı gelişim aşamalarındaki farklı parlama oranı gözlenen hücreler, F: Hatching Blastosist.

4.1.2. Beşinci Saat Gen Enjeksiyonu

Beşinci saat için, sham opere grubu ve negatif kontrolle karşılaştırmalı yarıklanma oranları Tablo 4-3'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sham opere grubundaki yarıklanma oranı istatistiki açıdan önemli oranda gen enjeksiyon ve kontrol grubuna göre yüksektir (%92,3) ($P < 0,05$).

Tablo 4-3: 5. saat gruplarındaki hücrelerin yarıklanma durumları.

Bölünme Durumu	Gen Enjeksiyonu	Sham Opere	Negatif Kontrol
	(%)		
Bölünmemiş	45 (36,6) ^a	3 (7,7) ^b	15 (25,9) ^a
Bölünmüş	78 (63,4) ^a	36 (92,3) ^b	43 (74,1) ^a

^{a,b}: Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır ($P<0,05$).

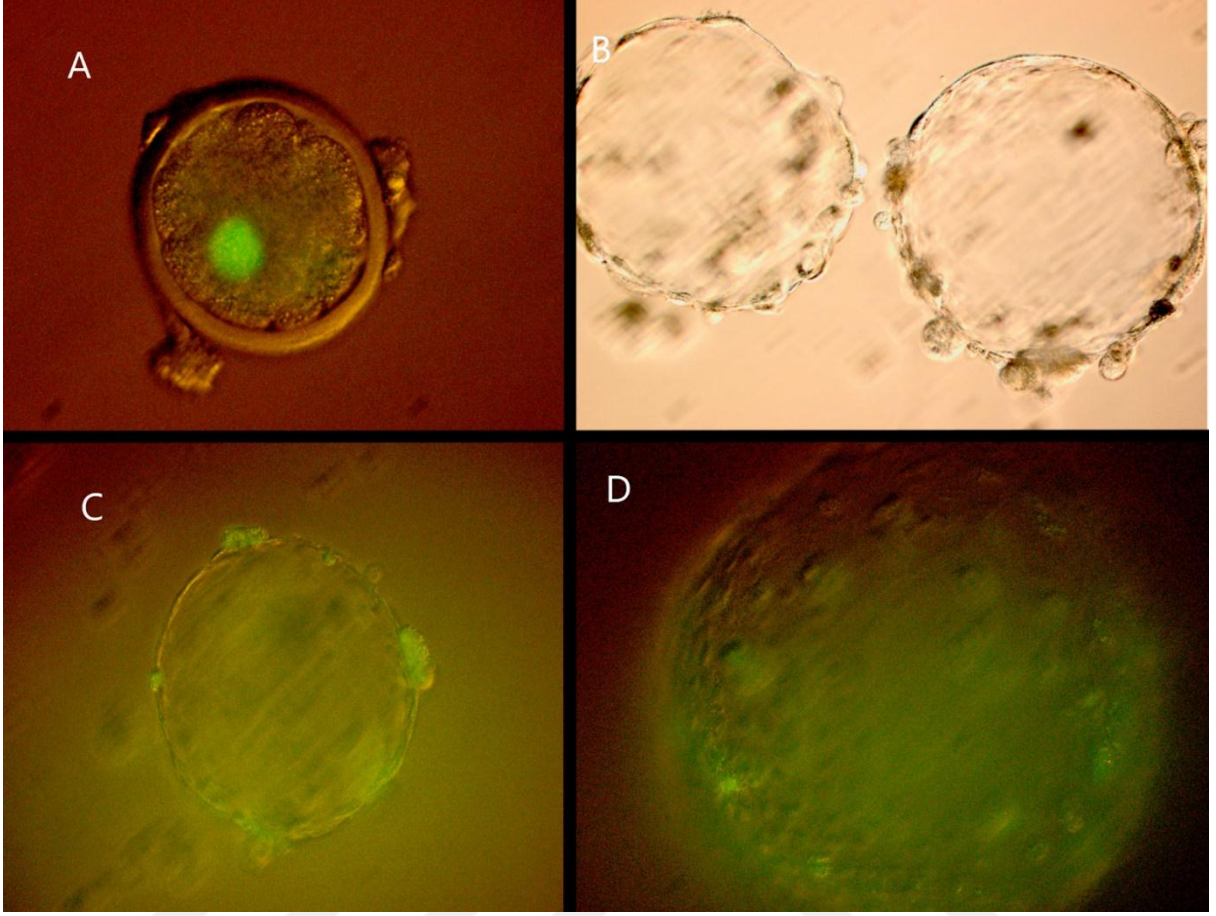
Gen enjeksiyonu uygulanan grubun in vitro kültürü sonrası, sham grubu ve negatif kontrolle karşılaştırmalı gelişim aşaması değerleri Tablo 4-4'te verilmiştir. Gelişmemiş grup, yarıklanmamış, fragmente, dejenere ve lize hücreleri kapsamaktadır. Gelişmemiş embriyoların oranı; gen enjeksiyonu grubunda, sham ve kontrol grubuna göre istatistiki olarak daha yüksek olarak görülmüştür (%41,5) ($P<0,05$). Morula öncesi aşamada kalarak gelişimine devam edemeyen embriyoların oranları bakımından; kontrol grubunda, diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli oranda daha yüksek olarak gözlenmiştir (%15,5) ($P<0,05$). Morula aşamasındaki hücre sayıları açısından ise; bu sefer sham opere grubun diğer gruplara göre istatistiki olarak daha yüksek bulunmuştur (%69,2) ($P<0,05$; Tablo 4-4).

Değerlendirilen son gelişim aşaması olan blastosist aşamasına erişen embriyo sayılarının ise gruplar arasında istatiki olarak önemli bir fark göstermediği tespit edilmiştir (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: 5. saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları.

Embriyo Gelişim Dönemleri	Gen Enjeksiyon Grubu	Sham Opere	Kontrol Grubu
	(%)		
Gelişmemiş	51 (41,5) ^a	5 (12,8) ^b	15 (25,9) ^b
Morula Öncesi	4 (3,3) ^a	0 ^a	9 (15,5) ^b
Morula	39 (31,7) ^a	27 (69,2) ^b	14 (24,1) ^a
Blastosist	29 (23,6) ^a	7 (17,9) ^a	20 (34,5) ^a

^{a,b}: Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır (P<0,05).



Şekil 4-2: Beşinci saat enjeksiyon grubundan hücreler. A: 8-16 Blastomer aşaması, 1 Blastomerde parlama, B: İki adet Ekspanded Blastosist, C: Hatched Blastosist, %80 parlama oranı, D: Hatched Blastosist, %90 parlama oranı

4.1.3. Yedinci Saat Gen Enjeksiyonu

Yedinci saat gen enjeksiyonu grubu için sham grubu ve negatif kontrolle karşılaştırmalı yarıklanma oranları Tablo 4-5'te verilmiştir. Yarıklanma oranları açısından, gruplar arasında istatistiki olarak bir fark bulunmadı (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Yedinci saat gruplarındaki hücrelerin yarıklanma durumları.

Bölünme Durumu	Gen Enjeksiyonu	Sham Opere	Negatif Kontrol
	(%)		
Bölünmemiş	41 (32,8) ^a	10 (26,3) ^a	15 (25,9) ^a
Bölünmüş	84 (67,2) ^a	28 (73,7) ^a	43 (74,1) ^a

^{a,b}: Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır ($P < 0,05$).

Çalışma grubunun in vitro kültürü sonrası sham grubu ve negatif kontrolle karşılaştırmalı gelişim aşaması değerleri Tablo 4-6'da verilmiştir. Gelişmemiş grup, yarıklanmamış, fragmente, dejenere ve lize hücreleri kapsamaktadır.

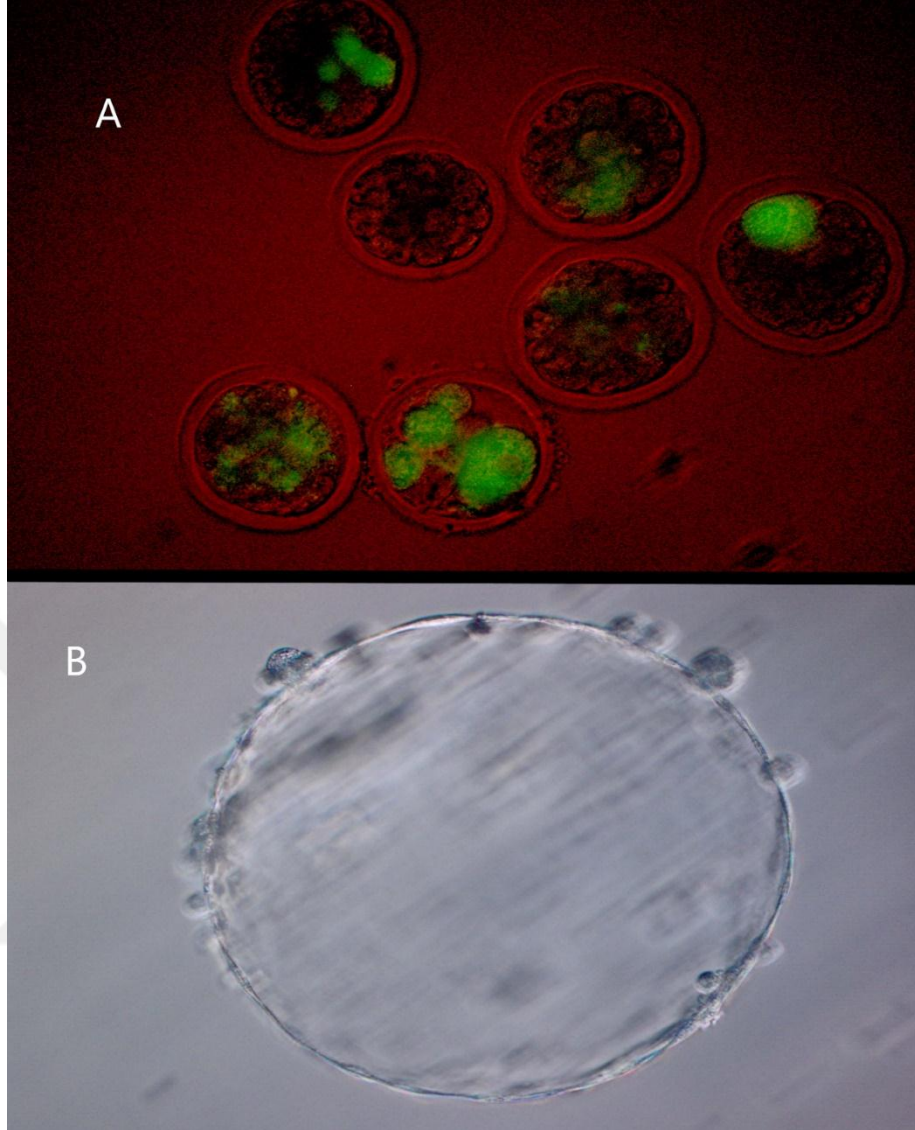
Gelişmemiş hücreler bakımından, gruplar arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmadı ($P > 0,05$). Morula öncesi aşamada kalma oranları, diğer iki gruba göre, kontrol grubunda istatistiksel olarak önemli derecede yüksek çıkmıştır ($P < 0,05$). Morula aşamasındaki embriyo oranları açısından sham grubuyla diğer gruplar arasında fark görülmemiş ancak, gen enjeksiyonu grubunda bu oran, kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli derecede daha yüksek olarak bulunmuştur ($P < 0,01$; Tablo 4-6).

Blastosist aşamasına gelişen embriyo oranları açısından, gen enjeksiyonu grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük olduğu görülmüştür ($P < 0,01$). Ancak sham grubu ile diğer iki grup arasında önemli bir istatistiki fark gözlenmemiştir (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Yedinci saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları.

Embriyo Gelişme Dönemi	Gen Enjeksiyon Grubu	Sham Opere	Kontrol Grubu
	(%)		
Gelişmemiş	44 (35,2) ^a	14 (36,8) ^a	15 (25,9) ^a
Morula Öncesi	5 (4) ^a	0 (0) ^a	9 (15,5) ^b
Morula	55 (44) ^a	15 (39,5) ^{a,b}	14 (24,1) ^b
Blastosist	21 (16,8) ^a	9 (23,7) ^{a,b}	20 (34,5) ^b

^{a,b}. Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır (P<0,01).



Şekil 4-3: Beşinci saat enjeksiyon grubundan hücreler. A: Farklı gelişim aşamalarındaki farklı parlama oranlarında hücreler, B: Hatched Blastosist, %80 parlama oranı.

4.1.4. Dokuzuncu Saat Enjeksiyonu

Bu saat grubu için sham grubu ve negatif kontrolle karşılaştırmalı yarıklanma oranları Tablo 4-7’de verilmiştir. Yarıklanma oranları bakımından, negatif kontrol grubu ile diğer iki grup arasında, benzerlik bulunmuştur; Ancak gen enjeksiyonu grubun sham opere grubuna göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde daha az yarıklanma olduğu gözlenmiştir ($P<0,01$; Tablo 4-7).

Tablo 4-7: Dokuzuncu saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin yarıklanma durumları.

Bölünme Durumu	Gen Enjeksiyonu	Sham Opere	Negatif Kontrol
	(%)		
Bölünmemiş	50 (40) ^a	5 (11,4) ^b	15 (25,9) ^{a,b}
Bölünmüş	75 (60) ^a	39 (88,6) ^b	43 (74,1) ^{a,b}

^{a,b}: Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır ($P<0,01$)

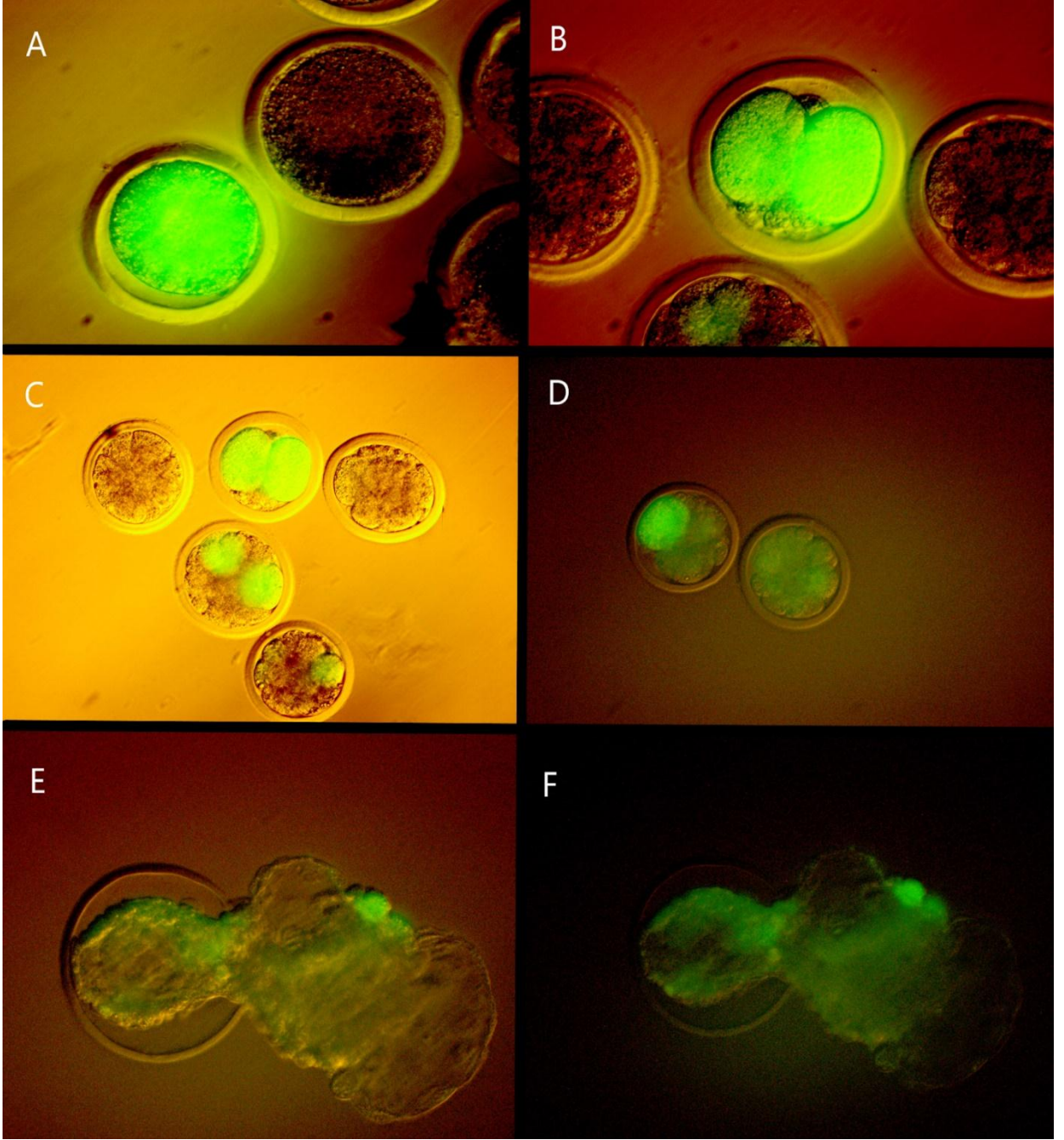
Çalışma grubunun in vitro kültürü sonrası sham grubu ve negatif kontrolle karşılaştırmalı gelişim aşaması değerleri Tablo 4-8’de verilmiştir. Gelişmemiş grup, yarıklanmamış, fragmente, dejenere ve lize hücreleri kapsamaktadır (Tablo 4-8).

Gelişme oranı en yüksek olan grup, gen enjeksiyonu grubu olarak bulunmuştur (%47,2). Blastosiste ulaşma değerleri karşılaştırıldığında ise bu oran, gen enjeksiyonu grubu ve sham opere gruplarında benzer bulunurken, bu değerler kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede daha düşük (%18,4) kalmıştır ($P<0,01$) (Tablo 4-8).

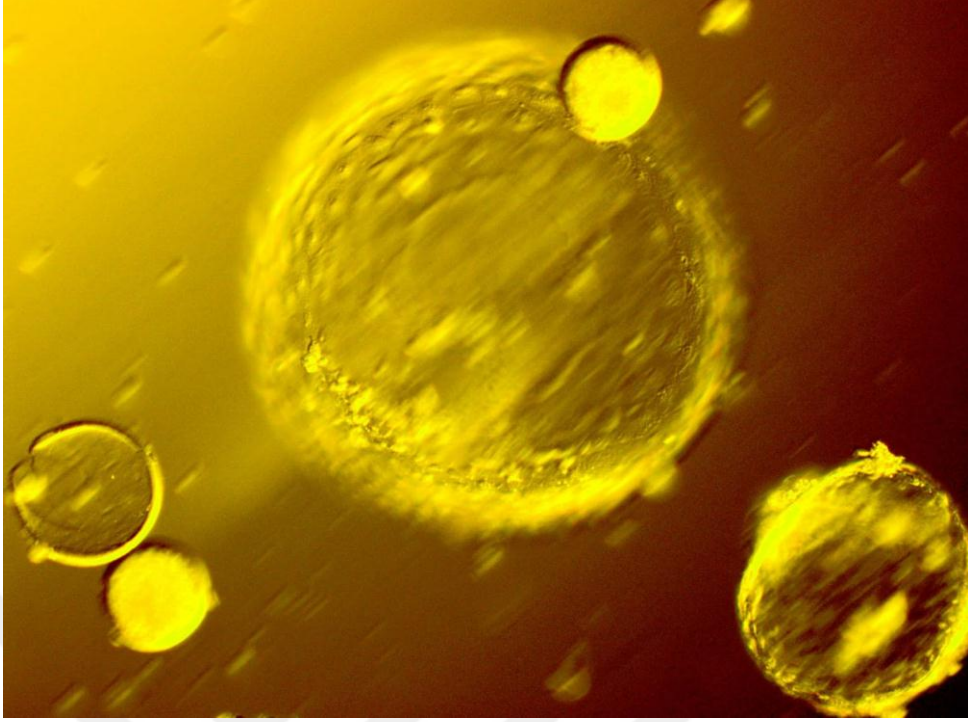
Tablo 4-8: Dokuzuncu saat enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları.

Embriyo Gelişim Durumları	Gen Enjeksiyon Grubu	Sham Opere	Kontrol Grubu
	(%)		
Gelişmemiş	59 (47,2) ^a	8 (18,2) ^b	15 (25,9) ^b
Morula Öncesi	7 (5,6) ^a	3 (6,8) ^{a,b}	9 (15,5) ^b
Morula	36 (28,8) ^a	25 (56,8) ^b	14 (24,1) ^a
Blastosist	23 (18,4) ^a	8 (18,2) ^{a,b}	20 (34,5) ^b

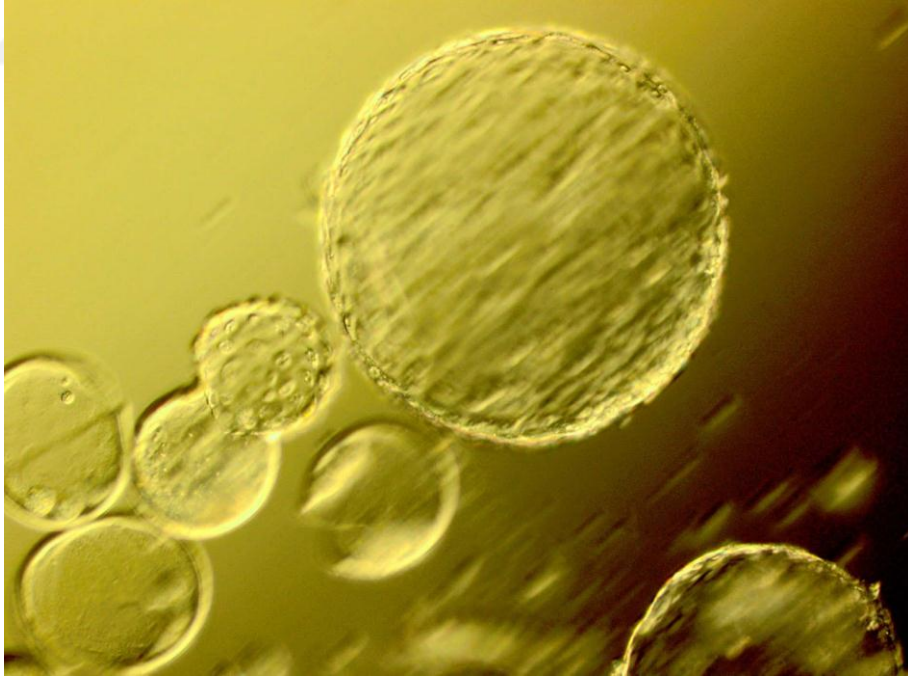
^{a,b}. Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır (P<0,01).



Şekil 4-4: Dokuzuncu saat enjeksiyon grubundan hücreler. A: Yarıklanmamış hücreler, %100 ve %0 parlama oranı, B: Yarıklanma aşamasında kalmış hücre, %50 parlama oranı, C: Farklı gelişim aşamalarındaki farklı parlama oranlarında hücreler, D: 4 Blastomerli aşamada kalmış hücre, %25 parlama oranı ve Morula aşamasında kalmış hücre, %10 parlama oranı, E: Hatching Blastosist, F: E'deki Blastosist, %80 parlama oranı.



Şekil 4-5: Fertilizasyonun ardından 9. saatte yapılan sham enjeksiyon grubunda gelişen hatched blastosist embriyolar.



Şekil 4-6: Negatif kontrol grubunda gelişen hatching ve hatched blastosist embriyolar.

4.1.5. Gen Enjeksiyonu Gruplarının Karşılaştırması

Farklı saatlerdeki gen enjeksiyon gruplarının yarıklanma ve gelişim evresi değerlendirmelerinin sonuçları Tablo 4-9'da verilmiştir. Gelişmemiş grup, fragmente, dejenere ve lize hücreleri kapsamaktadır.

Elde edilen sonuçlara göre, en çok yarıklanma oranı ve en çok gelişmeme oranına sahip olan grup 3. saat gen enjeksiyonu grubu olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, blastosist aşamasına ulaşan hücreler açısından, gruplar arasında istatistik açısından önemli bir fark bulunmamıştır (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: Enjeksiyon gruplarındaki hücrelerin gelişme durumları

Embriyo Gelişim Durumları	3. Saat	5. Saat	7. Saat	9. Saat
	(%)			
Bölünmemiş	28 (22,8) ^a	45 (36,6) ^b	41 (32,8) ^{a,b}	50 (40) ^b
Morula Öncesi	8 (6,5) ^a	4 (3,3) ^a	5 (4) ^a	7 (5,6) ^a
Morula	39 (31,7) ^a	39 (31,7) ^a	55 (44) ^b	36 (28,8) ^a
Blastosist	26 (21,1) ^a	29 (23,6) ^a	21 (16,8) ^a	23 (18,4) ^a
Gelişmemiş	22 (17,9) ^a	6 (4,9) ^b	3 (2,4) ^b	9 (7,2) ^b

^{a,b}. Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır (P<0,01).

Tablo 4-10: Çalışma gruplarında elde edilen hücrelerin gelişme aşamalarına göre sayısal değerleri.

Çalışma Saati	Çalışma Grubu	Toplam Hücre Sayısı (n)	Bölünen Hücre Sayısı (%)	Bölünmeyen Hücre Sayısı (%)	Embriyolarda gözlemlenen gelişim durumları (%)						
					Morula Öncesi	Morula	Kompakt Morula	Blastosist	Fragmente	Dejenere	Lize
3	gen	123	95 (77,23)	28 (22,77)	8 (8,42)	36 (37,89)	3 (3,15)	26 (27,36)	3 (3,15)	16 (16,84)	3 (3,15)
	sham	37	22 (59,45)	15 (40,55)	2 (9,09)	11 (50)	0	6 (22,27)	0	0	3 (13,63)
5	gen	123	78 (63,41)	45 (36,59)	4 (7,69)	38 (48,71)	1 (1,28)	29 (37,18)	2 (2,56)	1 (1,28)	3 (3,84)
	sham	39	36 (92,3)	3 (7,7)	0	27 (75)	0	7 (19,45)	0	0	2 (5,55)
7	gen	125	84 (67,2)	41 (32,8)	5 (5,95)	48 (57,14)	7 (8,33)	21 (25)	0	0	3 (3,85)
	sham	38	28 (73,68)	10 (26,32)	0	12 (42,85)	3 (10,71)	9 (32,14)	0	0	4 (14,28)
9	gen	125	75 (60)	50 (40)	7 (9,33)	34 (45,33)	2 (2,66)	23 (30,66)	0	7 (9,33)	2 (2,66)
	sham	44	39 (88,63)	5 (11,37)	3 (7,69)	24 (61,54)	1 (2,56)	8 (20,51)	0	2 (5,13)	1 (2,56)
Negatif Kontrol		58	43 (74,13)	15 (25,87)	9 (20,93)	14 (32,56)	0	20 (46,51)	0	0	0

4.2. FLÖRESAN PARLAMA DURUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gen enjeksiyonu yapılan gruplar için, yeşil parlama gösteren embriyo oranları Tablo 4-11’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, parlayan hücre oranları yönünden gruplar arasında istatistiki bir fark bulunmamıştır ($P>0,01$).

Tablo 4-11: Enjeksiyon gruplarında görülen yeşil parlama gösteren embriyo sayıları.

	3. Saat	5. Saat	7. Saat	9. Saat
	(%)			
Toplam Embriyo Sayısı	123	123	125	125
Parlayan Embriyo Sayısı	38 (30,9) ^a	48 (39,0) ^a	50 (40,0) ^a	40 (32,8) ^a

^a: Aynı satırda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır ($P<0,01$).

Her çalışma saati için kaydedilen yeşil parlama gösteren embriyoların içindeki parlama gösteren hücrelerin oranlarının ortalamaları karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlarda 7. Saat enjeksiyon grubunun parlama oranı ortalaması diğer gruplardan istatistiki olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($P<0,05$; Tablo 4-12). Ortalama dağılım aralıkları ve ortalama karşılaştırma sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 4-12).

Tablo 4-12: Parlayan hücrelerde ortalama değ er aralıkları ve ortalamalarının karşılaştırması.

Çalışma Grubu	Ortalama Alt Sınır	Ortalama Üst Sınır	Parlama Yüzdesi Ortalaması
3. Saat	30,07	51,08	40,57 ^a
5. Saat	34,56	51,05	42,81 ^a
7. Saat	20,51	31,52	26,02 ^b
9. Saat	32,50	52,99	42,75 ^a

^{a,b}: Aynı sütunda birbirinden farklı harflerle gösterilen değ erler istatistiki açıdan önemli oranda farklıdır (P<0,05).

Parlama görülen hücreler, mikroskopta gözle subjektif olarak değ erlendirilmiş ve her embriyoda bulunan parlama gösteren hücrelerin oranları tahmini olarak kaydedilmiştir. Gelişim aşamasına göre kategorize edilen hücrelerin sayıları ve parlama oranları Tablo 4-14'te verilmiştir. Her grubun farklı gelişim aşamasındaki hücrelerinin parlama oranları ayrı ayrı değ erlendirildiği için, grup başına düşen hücre sayısı, istatistiki değ erlendirme için yetersizdir. Bu sebeple güvenilir istatiki analiz yapılamamıştır.

Tablo 4-13: Çalışma gruplarında elde edilen hücrelerin gelişme aşamalarına göre sayısal değerleri ve parlama yüzdeleri (Subjektif bakı).

Çalışma Saati		Morula Öncesi	Morula	Kompakt Morula	Blastosist	Fragmente
3. Saat	Parlayan Hücre Sayısı (n)	5	18	2	13	0
	Parlama Oranları (%)	30, 100, 80, 60, 10	5, 30, 10, 20, 60, 60, 80, 80, 10, 50, 10, 10, 30, 20, 60, 10, 10, 10	10, 60	2, 70, 80, 90, 80, 80, 70, 80, 10, 50, 10, 5, 5,	
5. Saat	Parlayan Hücre Sayısı (n)	2	28	1	16	1
	Parlama Oranları (%)	40, 20	40, 40, 40, 20, 5, 10, 15, 15, 30, 70, 80, 50, 10, 10, 40, 40, 60, 70, 20, 70, 20, 20, 70, 10, 30, 30, 10, 30	40	10, 80, 90, 30, 60, 90, 70, 50, 20, 80, 80, 80, 100, 100, 10, 10	40
7.Saat	Parlayan Hücre Sayısı (n)	2	35	7	6	0
	Parlama Oranları (%)	40, 100	10, 10, 10, 15, 20, 20, 20, 40, 50, 60, 20, 20, 40, 10, 20, 60, 10, 40, 40, 20, 40, 10, 40, 50, 20, 10, 50, 40, 20, 10, 10, 10, 10, 10, 10	50,10, 30,10,10, 20,10,	80, 80, 30, 10, 10, 10	
9.Saat	Parlayan Hücre Sayısı (n)	5	22	2	11	0
		40, 80, 100, 10, 70	30, 50, 60, 70, 10, 70, 40, 100, 10, 10, 10, 30, 20, 20,	10, 10	60, 90, 90, 90, 90, 80, 10, 40, 80, 70, 30	

	Parlama Oranları (%)		10, 10, 10, 10, 10, 10, 30, 40			
--	----------------------------	--	-----------------------------------	--	--	--



5. TARTIŞMA

Transgenesis, bir canlıya kendi genomunda olmayan bir gen parçacığının aktarılması işlemidir. Bu teknoloji; mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlarda uygulanmaktadır. Özellikle insanlara çeşitli alanlarda fayda sağlaması için son zamanlarda transgenik hayvan üretimine eğilinmiştir. Deneyler için model hayvan üretimi; ksenotransplantasyon ve biyoreaktör üretimi, hayvansal ürünlere yeni özellikler kazandırılması ve çeşitli hastalıklara dirençli hayvan üretimi gibi amaçlarla üretilen bu hayvanların üretilmesinde mikroenjeksiyon, viral vektörler ve transpozonlar, somatik hücrelerden çekirdek transferi (SCNT), sperm aracılıklı gen transferi (SMGT) ve spermin hücre içine enjeksiyonu (ICSI) ile pluripotent hücrelere gen aktarımı yöntemleri kullanılmaktadır (Houdebine 2009).

Mikroenjeksiyon yöntemi günümüzde en çok tercih edilen yöntemlerden biri olmakla birlikte; kullanımında oosit, zigot/embriyo hasarlanması (Iqbal ve ark. 2009, Sumiyama ve ark. 2010) veya belirli bir gelişim aşamasında uygulanabilmesi sebebiyle, kısıtlı zamanda yapılmasının (Burdon ve Wall 1992; Canseco 1994; Powell 1992) gerekmesi gibi, çeşitli kısıtlamaları bulunmaktadır.

Bu yöntem öncelikle farelerde (Gordon ve ark. 1980) kullanılmaya başlanmış, daha sonra tavşan, domuz ve koyun gibi diğer hayvanlarda kullanılmaya devam edilmiştir (Houdebine 2002). Bu yöntem kullanılarak inek (Krimpenfort ve ark. 1991), koyun (Wright ve ark. 1991), keçi (Ebert ve ark. 1991), domuz (Velandar ve ark. 1992), tavşan (Voss ve ark. 1990) ve domuz (Li ve ark 2014) gibi hayvanlar üretilmiştir.

Pronükleer enjeksiyon yöntemi, pronükleusları net olarak görüntülenebilen fare ve tavşan gibi hayvanlarda tercih edilirken, çiftlik hayvanlarında ise sitoplazmanın yoğun granüllü opak yapısından dolayı pronükleusların ayırt edilmesinde zorlanıldığı için, çok tercih edilmemekte ve daha çok intrasitoplazmik enjeksiyon yöntemi kullanılamamaktadır.

Çalışmamızda, fertilizasyonun ardından pronüklear gelişimin ve DNA singami mekanizmalarının farklı gelişim evreleri hedeflenerek 3., 5., 7. ve 9. saatlerde koyun zigotlarına intrasitoplazmik gen mikroenjeksiyonu yapılmış ve bu hücreler inkübatör içerisinde kültüre

edilmiştir. Kültürün 8. gününde subjektif olarak mikroskop altında kontrol edilen hücreler gelişim aşaması, parlama durumu ve embriyoların hücrelerindeki parlama oranları üzerinden farklı saatlerde yapılan gen enjeksiyonlarının etkinliği değerlendirilmiştir.

Dört farklı saate gerçekleştirilen enjeksiyon işleminin yarıklanma oranları açısından kendi arasında karşılaştırıldığında, 3. saat enjeksiyon grubu değerinin (%77,2) istatistiksel olarak negatif kontrol ve sham opere gruplarına nazaran önemli düzeyde yüksek olduğu görüldü ($P<0,01$). Bununla birlikte, yine aynı grupta lize ve dejenere olma oranı da (%17,9), diğer gruplara göre önemli düzeyde yüksek bulundu ($P<0,01$). Ancak gruplar arasında, blastosist aşamasına ulaşan embriyo oranları bakımından sayısal farklar olsa da (enjeksiyon saatlerine göre sırasıyla %21,1, 23,6, 16,8 ve 18,4) istatistiksel bir fark bulunamadı ($P>0,05$).

Lize ve dejenere hücre oranlarının 3. saatte daha yüksek olması, erken dönem enjeksiyonların, pronükleusların şekillendiği bu dönemde hücre iskeletinin çok hareketli ve hassas olması sebebiyle (Gianaroli ve ark. 2002, Menezo 2004, Apter ve ark. 2020) daha yüksek hasarlayıcı etkisinin olduğunu düşündürmüştür.

Yapılan enjeksiyon işleminin ve gen enjeksiyonunun embriyo gelişiminin ilk aşaması olan yarıklanma oranları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, her enjeksiyon grubu ile aynı grubun hem sham grubu hem de negatif kontrol grubunun embriyolarındaki yarıklanma oranları ile karşılaştırılmıştır. Yapılan bu karşılaştırmalarda, 3. saat gen enjeksiyon grubunun diğer saat gruplarına göre yarıklanma oranlarının önemli derecede daha yüksek (%77,2) olduğu görülmüştür ($P<0,05$). Toplam gelişmemiş hücre oranında ise sham grubu (%48,6) kontrol grubuna göre belirgin düşüş göstermiştir ($P<0,05$). Gen enjeksiyonu grubunda sayısal olarak daha yüksek oran görülse de (%40,7), bu farkın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Blastosist aşamasına ulaşan hücrelerde ise yine, gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir. Üçüncü saat enjeksiyon uygulaması kendi içinde değerlendirildiğinde; sham opere grubunun dejenerasyon, lize olma ve bölünmeme oranları açısından diğer gruplar ile arasında bir fark oluşmazken, kontrol grubunun bölünme oranları bakımından sham opere grubuna göre önemli düzeyde ($P<0,05$) farklılık gösterme sebebinin, örneklem boyutunun küçük olmasına bağlı olabileceğini düşündürmüştür.

Beşinci saat enjeksiyon grubunun kendi sham grubu ve negatif kontrol ile karşılaştırılmasında, yarıklanma oranı için sham opere grubu diğer gruplara göre daha yüksek (%92,3) değer göstermiştir ($P<0,05$). Toplamda gelişmemiş embriyo oranında ise gen enjeksiyon grubundaki oran (%41,5) diğer gruplara göre önemli derecede yüksek kalmıştır ($P<0,05$). Blastosist aşamasına ulaşan hücrelerde ise, sayısal olarak fark görülse de farkların

istatistiki önem taşımadığı belirlenmiştir ($P>0,05$). Elde edilen bu sonuçlar, bölünme olarak yine örneklem boyutunun küçük olması sebebiyle sham grubunda farklılık görüldüğünü düşündürmüştür. Gelişmemiş embriyo (lize ve dejenere) oranında gen enjeksiyon grubunda görülen yükseklik ise gen bileşiğinin negatif etkisinin olabileceğini düşündürmüştür.

Yedinci saatte, en yüksek bölünme oranı (%74,1) ve en düşük gelişmemiş hücre oranı (%25,9) negatif kontrol grubunda görülse de gruplar arası istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır. Blastosist aşamasına ulaşma değerlendirmesinde ise, sayısal olarak en yüksek oran negatif kontrol grubunda (%34,5), sonrasında sham grubunda (%23,7) ve en son olarak en düşük oran gen enjeksiyon grubunda (%16,8) bulunmuştur. İstatistiki olarak ise sadece gen enjeksiyon ve negatif kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0,01$). Sham enjeksiyonu ve negatif kontrol arasında fark bulunmaması, uygulama açısından negatif etki görülmediğini göstermektedir. Gen enjeksiyon grubunda görülen istatistiki açıdan önemli olan fark sadece genden kaynaklı oluşabileceğinden, bu saat için gen bileşiğinin blastosiste ulaşma açısından negatif etkili olduğu düşünülmüştür.

Dokuzuncu saat çalışma grupları kendi içinde karşılaştırıldığında, negatif kontrole bir fark görülmemesine rağmen, gen enjeksiyonu ve sham opere grupları arasında farklılıklar şekillenmiş, en yüksek bölünme oranı sham opere grubunda (%88,6) oluşmuştur ($P<0,01$). Lize ve dejenere hücre oranları karşılaştırıldığında ise gen enjeksiyonu grubunda diğer gruplara kıyasla yüksek oran (%47,2) elde edilmiştir. Blastosiste ulaşan hücre oranları karşılaştırıldığında, negatif kontrol grubu (%34,5) gen enjeksiyon grubuna (%18,4) göre önemli derecede yüksek bulunmuştur ($P<0,01$). Bu saat dilimi için de gen bileşiğinin blastosiste ulaşma açısından olumsuz bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Farklı saatlerde gen enjeksiyon uygulamaları arasında çeşitli gelişim aşamalarında farklar görülmüştür. 3. saat enjeksiyon grubunda bölünme oranının yüksek ve yine lize olma oranının yüksek olması, erken saatlerde gerçekleştirilen enjeksiyonlarda hücre içi mekanizmaların daha çok etkilendiği veya daha önce yapılan çalışmalarda da öne sürüldüğü (Walton 1987, Ebrahimi 2020) üzere, hücre membranının hasarlanmayı daha az tolere edebildiği veya hasarlanma sonrası toparlanmada yetersiz kaldığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak bunun hangi sebeple olduğunun anlaşılabilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Bununla birlikte, 5, 7 ve 9. saatlerde, bölünme oranının düşük; lize ve dejenere hücre sayısının yüksek olmasına rağmen, bütün grupların blastosiste ulaşma oranın benzer olması,

pronükleus oluşumunun başlamasından itibaren enjeksiyon aşamasında hasarlanan hücrelerin gelişiminin durduğunu ve bölünmeye gitmediğini; ancak 3. saatte pronükleus oluşumu öncesinde alınan hasarın bölünmeyi etkilemeden gelişimi bozduğunu göstermektedir. Bu durum, erken dönem zigot gelişiminde pronükleus oluşumu öncesi ve sonrası dönemdeki hücre içi olayların farklı hassasiyette olmasından veya pronükleus oluşumu sonrası hücre iskeletinin zarar görmesinden dolayı, bölünmenin devam edememesinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Transfeksiyon açısından değerlendirildiğinde; gruplar arasında transfekte embriyo sayıları arasında istatistiki bir fark bulunmamıştır. Ancak, her embriyonun teker teker parlama gösteren hücre oranı tespit edilip bunların ortalaması karşılaştırıldığında; 3., 5. ve 9. saatlerdeki ortalama ve transfekte hücre oranı dağılım aralıkları (en yüksek-en düşük) daha yüksek (%30-52 arasında) görünürken, 7. saatte bu aralık istatistiki olarak daha düşük gerçekleşmiştir (%20-32) ($P<0,05$). Bu, istatistiki olarak fark olmasa da sayısal olarak 7. saatte toplam parlama gösteren embriyo sayısının diğer gruplara göre fazla (50 embriyo) olmasına karşın, transfekte embriyoların içerdiği transfekte hücre oraları önemli derecede daha düşük kalmıştır.

Diğer gruplardan farklı olarak 7. saatte, oluşumları tamamlanan pronükleusların singaminin gerçekleşeceği bölgeye hareket ettiği zaman dilimine denk gelmektedir (Crozet 1988). Bu durum, genin sitoplazma hareketine bağlı hücrenin dışına doğru atılması ihtimalini düşündürmekle birlikte buradaki esas etkinin, kimerik yapıyı oluşturan transfekte olan blastomerlerin gelişimlerini devam ettirememesi ve genel embriyo gelişimine katılamadığını veya embriyo gelişimde baskın olamadığını akla getirmiştir.

Ebrahimi ve ark.'nın (2020) yine GFP ile koyunlarda yaptığı fertilizasyon sonrası farklı zamanlarda gerçekleştirdikleri gen enjeksiyonu çalışmasında, 6-8 ve 10-12. saat enjeksiyon gruplarında hücrelerin 8 blastomerli aşamada takılı kaldığını, sadece 8-10 saat enjeksiyon grubundaki embriyolardan 2 adet blastosist elde edebildiklerini ve bu yüzden en uygun enjeksiyon saatinin fertilizasyon sonrasındaki 8-10. saatler olduğunu bulduklarını ifade etmişlerdir. Çalışmada araştırmacılar, teknik olarak intrasitoplazmik enjeksiyon, gen olarak GFP ve plazmid olarak da pEGFPC1 plazmidini kullanmıştır. Oysaki aynı protein geninin pEGFPN1 plazmidinin kullanıldığı ve aynı bölgeye enjeksiyonların yapıldığı sunulan bu tez çalışmasında daha yüksek gelişmişlik oranları ve transgenik hücre oranlarına ulaşılmıştır. Çalışmamızda 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak dozunda kullanılan plazmid yoğunluğu, Ebrahimi ve ark. (2020) tarafından 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dozunda kullanılmıştır. Aradaki gelişimle ilgili bu farkın, kullanılan plazmid yoğunluk

farkından ileri gelmiş olabileceği düşüncesini akla getirmiştir. Ebrahimi ve ark. ile farklı gen enjeksiyonu saatlerinin başarılı bulunmasının sebebinin N1 ve C1 plazmidinin farklılıklarından ileri geldiği düşünölmüş ve genel bakıda N1 plazmidinin daha başarılı bir bileşik olduğu sonucuna varılmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fertilizasyon sonrası erken dönemde gen enjeksiyonun 4 farklı saat grubunda denendiği bu çalışmada; fertilizasyon sonrası 3., 5., 7. ve 9. saatlerde GFP geni plazmidi pEGFPN1, intrasitoplazmik mikroenjeksiyon yöntemiyle 10 µg/µL konsantrasyonda zigotlar içerisine verilmiştir. Dört ayrı deney grubunun kendi sham opere ve negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığı bu tez çalışması sonucunda;

- Koyunlarda intrasitoplazmik enjeksiyon yöntemi kullanıldığında pEGFPN1 geninin 10 µg/µL konsantrasyonu ile transgenik embriyo elde edilebildiği,
- Fertilizasyon sonrası erken saatte yapılan enjeksiyonlardan transgenik embriyo elde edilebildiği,
- Fertilizasyonun ardından 3. saatte yapılan enjeksiyonlarda lize olma oranının daha yüksek olduğu; ancak 9. saate kadar olan diğer gruplarda bölünmeme oranının daha yüksek olduğu ve bunların blastosist aşamasına ulaştığında birbirini dengeleyerek, blastosiste gelişim açısından benzer sonuçları verdiği,
- Farklı saatlerde yapılan enjeksiyonlarda, transgenik hücre sayısı bakımından gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir farkın oluşmadığı,
- Gen enjeksiyonu 7. saatte yapıldığında transgenik embriyoların içindeki transfekte hücre oranlarının önemli düzeyde düşük kaldığı ve kimerik yapının transgenik hücre sayıları aleyhine yoğunlaşabileceği

sonuçlarına ulaşılmıştır.

Buna göre; gen enjeksiyonu çalışmalarında erken saatlerin kullanılabilecek olmasıyla beraber, fertilizasyon sonrası 3. ila 9. saatler arasında zaman kısıtlaması olmadan güvenle enjeksiyona devam edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Daha sonraki çalışmalar için, 3. saat gruplarında sham opere grubunun, çalışma ve negatif kontrol grubundan yarıklanma, dejenere hücre ve gelişme oranı açısından daha kötü sonuçlar vermesi; 5. saat gruplarında sham opere grubunun kendi saatindeki diğer gruplara göre yarıklanma oranı açısından daha iyi sonuçlar vermesi ve 9. saat çalışma gruplarında sham

opere grubunun yarıklanma oranı açısından kendi saatindeki diğer gruplarına göre daha iyi sonuçlar vermesi gibi, sebebi tam olarak belirlenemeyen istatistiki farkların olduğu veriler üzerine araştırma yapılması ve parlayan hücrelerdeki gen entegrasyon sayı ve bölgelerinin incelenmesi, ayrıca yine bu hücrelerdeki parlama oranlarının objektif bir şekilde değerlendirilebilmesi için ileri tetkikler ve genetik analizlerin yapılması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Abe, T., Inoue, K., Furuta, Y., Kiyonari, H. (2020), Pronuclear Microinjection during S-Phase Increases the Efficiency of CRISPR-Cas9-Assisted Knockin of Large DNA Donors in Mouse Zygotes. *Cell Reports*, 31, 107653.
- Adenot P.G., Mercier Y., Renard J.P. ve Thompson E.M (1997), Differential H4 Acetylation of Paternal and Maternal Chromatin Precedes DNA Replication and Differential Transcriptional Activity in Pronuclei of 1-Cell Mouse Embryos. *Development*. 124, 4615–4625.
- Ak, K. (1999), Koyunlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İçinde İleri, İ.K., Pabuççuoğlu, S. ve Birler, S., *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Ve Sun'i Tohumlama*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını; 189-205.
- Akbudak, M.A. ve Kontbay, K. (2017), Yeni Genom Düzenleme Teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve Bitkilerde Kullanımı. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 26 (1), 111-126.
- Allison, A.C., Hartree, E.F. (1970), Lysosomal Enzymes in the Acrosome and Their Possible Role in Fertilization. *Journal of Reproduction and Fertilization*. 21, 501-515.
- Alizadeh, Z., Kageyama, S. I., Aoki, F., (2005), Degradation of Maternal mRNA in Mouse Embryos: Selective Degradation of Specific mRNAs After Fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 72, 281-290.
- Apter, S., Ebner, T., Freour, T., Guns, Y., Kovacic, B., Le Clef, N., Marques, M., Meseguer, M., Montjean, D., ve ark. (2020), Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. *Human Reproduction Open*, 1–26.
- Arnoult, C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R. ve Florman, H.M. (1996), Egg-Activation of Sperm T-type Ca Channels Regulates Acrosome Reactions During Mammalian Fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93, 13004–13009.
- Arslan, K., Akyüz, B., (2009), Gen Transfer Teknolojileri. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 6(1), 77-82.
- Austin, C. R. (1952), The “Capacitation” of Mammalian Sperm. *Nature*, vol 170, 326.
- Austin, C.R. ve Bishop, M.W.H. (1958), Capacitation of Mammalian Spermatozoa. *Nature*, no 4612, 851.
- Austin, C. R. ve Bishop, M.W.H. (1958), Role of the Rodent Acrosome and Perforatorium in Fertilization. *Proceedings of Royal Society of London Series*, 149: 241-48.
- Bach F.H. (1998), Xenotransplantation: Problems and Prospects. *Annual Reviews of Medicine*, 49, 301-310.
- Bağış, H., 2002, Transgenik Biyoreaktörlerde Rekombinant Proteinlerin Üretimi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 28 (1), 113-123.
- Barton, K.A., Binns, A.N., Matzke, A.J.M. ve Chilton, M.D. (1983), Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell*, 32-4, 1033-1043.
- Bedford, J. M. (1970), Sperm Capacitation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction Supplement*, 2, 128-158.
- Bertolini, L.R., Meade, H., Lazzarotto, C.R., Martins, L.T., Tavares, K. C., Bertolini, M., Murray, J.D., (2016), The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Research*. Online Publication.

- Bishop, J. (1996), Chromosomal insertion of foreign DNA. *Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences*, 36 (6), 607-618.
- Bleil, J.D ve Wassarman, P.M. (1980), Structure and Function of the Zona Pellucida: Identification and Characterization of the Proteins of the Mouse Oocyte's Zona Pellucida, *Developmental Biology*. Volume 76, Issue 1, 185-202.
- Bleil, J.D. ve Wassarman, P.M. (1983), Sperm-Egg Interactions in the Mouse: Sequence of Events and Induction of the Acrosome Reaction by a Zona Pellucida Glycoprotein. *Developmental Biology*, 95, 317–324.
- Bogner, K., Hinsch, K.D., Nayudu, P., Konrad, L., Cassara, C., Hinsch, E. (2004), Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Mol Hum Reprod*, 10(7):481-8.
- Bondioli, K.R., Biery, K.A., Hill, K.G., Jones, K.B. ve DeMayo, F.J. (1988), Production of transgenic cattle by pronuclear injection. Boston: Butterworth-Heinemann. İçinde: First, N.L., ve Haseltine, F.P. eds, *Transgenic Animals*, 265-273.
- Bonifer, C., M. C., Huber, U., Jagle, N., Faust ve Sippel, A.E. (1996), Prerequisites for Tissue Specific and Position Independent Expression of a Gene Locus in Transgenic Mice. *Journal of Molecular Medicine*, 74(11):663–671.
- Bortesi L. ve Fischer R., (2015), The CRISPR/Cas9 System for Plant Genome Editing and Beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1):41-52
- Brady, D.E. ve Gildow, E.M., (1939), Characteristics of Ram Semen as Influenced by the Method of Collection. *Journal of Animal Science*, vol 1939, issue 1, 250-254.
- Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier P. ve Laible G. (2003), Cloned Transgenic Cattle Produce Milk With Higher Levels of β -casein and κ -casein. *Nature Biotechnology*, 21 (2), 157-162.
- Burdon, T.G. ve Wall, R.J. (1992), Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryos. *Molecular Reproduction Dev.* 33, 436-42.
- Burgess, T.L. ve Kelly, R.B. (1987), Constitutive and Regulated Secretion of Proteins. *Annual Reviews of Cell Biology*, 3,243-293.
- Canseco, R.S., Sparks, A.E.T., Page, R.L., Russell, C.G., Johnson, J.L., Velander, W.H., Pearson, R.E., Drohan, W.N. ve Gwazdauskas, F.C. (1994), Gene transfer efficiency during gestation and the influence of co-transfer of non-manipulated embryos on production of transgenic mice. *Transgenic Research*, 3, 20-25.
- Cardullo, R.A. ve Thaler, C.D. (2002), Function of the Egg's Extracellular Matrix. *Fertilization*. Texas: Academic Press. 119-144.
- Carter, M., Shieh, J., (2015). *Making and Using Transgenic Organisms*. Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition). Academic Press. 253-271.
- Castro, F.O., Toledo, J.R., Sanchez, O., Rodriguez, R., (2010), All roads lead to milk: Transgenic and non-transgenic approaches for expression of recombinant proteins in the mammary gland. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38 (2), 615-626.
- Chang, M.C. (1951), Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*, vol 168, 697-698.
- Chang, H.Y., Levasseur, M., ve Jones, K.T. (2004), Degradation of APCcdc20 and APCcdh1 Substrates During the Second Meiotic Division in Mouse Eggs. *Journal of Cell Science*. 117, 6289–6296.
- Chuan, D., Jin, T., Fan, R., Zhou, L., & Guo, G. (2019). Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications. *Advances In Colloid and Interface Science*, 268, 25-38.
- Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N. ve Mermillod, P. (2003), Current Status of Embryo Technologies in Sheep and Goat. *Theriogenology*, 59, 171-188.

- Crosby, I. M., Gandolfi, F., Moor, R. M., (1988), Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *Journals of Reproduction and Fertility*, 82, 769-775.
- Cross, N.L. (1998). Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*, volume 59, Issue 1, 7–1.1
- Crozet, N. (1988a), Ultrastructural Aspects of in Vitro Fertilization in Sheep. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*, 98, 1-10.
- Crozet, N. (1988b), Fine Structure of Sheep Fertilization In Vitro. *Gamete Research*, 19, 291-303.
- Cohen, S. N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W. ve Helling, R.B. (1973), Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 70 (11), 3240-3244.
- Cummins, J. M. ve Yanagimachi, R. (1982), Sperm–egg Ratios and the Site of the Acrosome Reaction During In Vivo Fertilization in the Hamster. *Gamete Research*, 5, 239–256.
- Cummins, J. M. ve Yanagimachi, R. (1986), Development of Ability to Penetrate the Cumulus Oophorus by Hamster Spermatozoa Capacitated In Vitro, In Relation to the Timing of the Acrosome Reaction. *Gamete Research*, 15, 187–212.
- Cyranoski D. (2003). Koreans Rustle up Madness-Resistant Cows. *Nature*, 426 (6968), 743.
- Dale, B. (1985). Sperm Receptivity in Sea Urchin Oocytes and Eggs. *Journal of Experimental Biology*, 118:85–97.
- Damak S., Jay N.P., Barrell G.K. ve Bullock D.W. (1996a). Targeting Gene Expression to the Wool Follicle in Transgenic Sheep. *Biotechnology*, 14 (2), 181-184.
- Damak S., Su H., Jay N.P. ve Bullock D.W. (1996b). Improved Wool Production in Transgenic Sheep Expressing Insulin-Like Growth Factor 1. *Biotechnology*, 14 (2), 185-188.
- De Smetd, V., Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Martino, A. ve Cognie, Y., (1992). In Vitro Maturation and Fertilization of Goat Oocytes. *Theriogenology*, vol 37, issue 5, 1049-1060.
- De Lamirande, E., Leclerc, P. ve Gagnon, C. (1997). Capacitation as a Regulatory Event That Primes Spermatozoa for the Acrosome Reaction and Fertilization. *Molecular Human Reproduction*, 3(3), 175-194.
- Denli, M., (2012). Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO). İstanbul Ticaret Odası Yayınları. Billur Yayınevi, İstanbul. 2010-90.
- Ducibella, T., Huneau, D., Angelichio, E., Xu, Z., Schultz, R.M., Kopf, G.S., Fissore, R., Madoux, S., ve Ozil, J.P. (2002). Egg-to-Embryo Transition is Driven by Differential Responses to Ca(2+) Oscillation Number. *Developmental Biology*. 250, 280–291.
- Dunbar, B.S., S. Avery, V. Lee, S. Prasad, D., Schwahn, E. Schwoebel, S. Skinner, Wilkins, B. (1994). The mammalian zona pellucida: Its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and development expression. *Reprod Fertil Dev* 6: 331–347.
- Ebert, KM., Selgrath, JP., DiTullio, P., Denman, J., Smith, TE., Memon, MA. ve ark. (1991). Transgenic Production of Human Tissue-Type Plasminogen Activator in Goat Milk: Generation of Transgenic Goats and Analysis of Expression. *Nat Biotechnol*, 9, 835-838.
- Ebrahimi, M., Mara, L., Chessa, B., Chessa, F., Parham, A. ve Dattena, M. (2020). Optimizing injection time of GFP plasmid into sheep zygote. *Reproduction in Domestic Animals*, 1-9.
- Ecklund, P.S. ve Levine, L. (1975). Mouse Sperm Basic Nuclear Protein –Electrophoretic Characterization and Fate After Fertilization. *Journal of Cell Biology*, 66:251–262.
- Florman, H.M., Arnoult, C., Kazam, I.G., Li, C. ve O’Toole, C.M.B. (1998). A Perspective on the Control of Mammalian Fertilization by Egg-Activated Ion Channels in Sperm: A Tale of Two Channels. *Biology of Reproduction*, 59, 12–16.

- Florman, H.M. ve Ducibella, T. (2006). Fertilization in Mammals. *The Physiology of Reproduction, Third Edition*. New York: Academic Press Ltd.; 55-94.
- Gadella, B.M., (2008). Sperm Membrane Physiology and Relevance for Fertilization. *Animal Reproduction Science*. 107, 229-236.
- Gama Sosa, M.A., Gasperi, R.D. ve Elder, G.A. (2010). Animal Transgenesis: An Overview. *Brain Struct Funct.*, 214, 91-109.
- Gedikli, S., Özbek, E. ve Demirci, T., (2013). Fertilizasyonun Moleküler Temeli. *Van Tıp Dergisi*, 20(4), 294-301.
- Gerton, G.L. (2002). Function of the Sperm Acrosome. *Fertilization*. Texas: Academic Press. 265-302.
- Gianaroli, L., Magli, M.C., Ferraretti, A.P., Fortini, D., Grieco, N (2002). Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertility and Sterility*. 80(2), 341-349.
- Giraldo, P. ve Montoliu, L. (2001). Size Matters: Use of YACs, BACs and PACs in Transgenic Animals. *Transgenic Research*, 10, 83-103.
- Giraldo, P., Gimenez, E. ve Montoliu, L. (1999). The Use of Yeast Artificial Chromosomes in Transgenic Animals: Expression Studies of the Tyrosinase Gene in Transgenic Mice. *Genetic Analysis*, 15:175-178.
- Grootenhuis, A.J., H.L. Philipsen, J.T. de Breet Grijsbach, M. van Duin (1996). Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. *J Reprod Fertil Suppl* 50: 43-54.
- Gong, X.H., Dubois, D.H., Miller, D.J. ve Shur, B.D. (1995). Activation of a G Protein Complex by Aggregation of b-1,4-galactosyltransferase on the Surface of Sperm. *Science*, 269, 1718-1721.
- Golovan S.P., Meidinger R.G., Ajakaiye A., Cottrill M., Wiederkehr M.Z., Barney D.J., ve ark. (2001). Pigs Expressing Salivary Phytase Produce Low-Phosphorus Manure. *Nature Biotechnology*., 19 (8), 741-745.
- Gordon, M.F., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. ve Ruddle, F.H. (1980). Genetic Transformation of Mouse Embryos by Microinjection of Purified DNA. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 77, 7380-7384.
- Gordon, I.R. 2004. *Reproductive Technologies in Farm Animals*. Oxfordshire: CABI.
- Gök, M. K., Demir, K., Cevher, E., Özgümüş, S., & Pabuccuoğlu, S. (2019). Effect of the linear aliphatic amine functionalization on in vitro transfection efficiency of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 207, 580-587.
- Green, D.P.L. ve Purves, R.D. (1984). Mechanical Hypothesis of Sperm Penetration. *Biophysiology Journal*, 45, 659-662.
- Green, D.P.L. (1988). Sperm Thrusts and the Problem of Penetration. *Biology Reviews*, 63, 79-105.
- Grunwald K.A., Schueler K., Uelmen P.J., Lipton B.A., Kaiser M., Buhman K. ve Attie A.D. (1999). Identification of a Novel Arg-->Cys Mutation in the LDL Receptor That Contributes to Spontaneous Hypercholesterolemia in Pigs. *Journal of Lipids Research*, 40 (3), 475-485.
- Handrow, R.R., Parrish, J.J. ve First, N.L. (1986). Heparin Stimulates Calcium Uptake by Bovine Sperm In Vitro. *Journal of Andrology*. 7, 23.
- Hatzioannou, T., Evans, D., T., (2012). Animal models for HIV/AIDS research. *Nature Reviews Microbiology*. 10(12), 852-867.
- Henikoff, S. (1998). Conspiracy of Silence Among Repeated Transgenes. *Bioessays* 20(7):532-535.

- Hewitson, L., Simerly, C.R. ve Schatten, G. (2002). Fate of Sperm Components During Assisted Reproduction: Implications for Infertility. *Human Fertilization*. 5, 110–116.
- Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind H., Brem G. ve ark. (2004). Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer Into Oocytes. *Biology of Reproduction*, 71 (2), 405-409.
- Horii, T. ve Hatada, I. (2017). Genome Editing of Mouse by Cytoplasmic Injection. *Genome Editing in Animals: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1630.
- Honda, A., Siruntawineti, J., ve Baba, T. (2002). Role of Acrosomal Matrix Proteases in Sperm-Zona Pellucida Interactions. *Human Reproduction Update* 8, 405–412.
- Houdebine L.M. (2002). The Methods to Generate Transgenic Animals and to Control Transgene Expression. *Journal of Biotechnology* 98, 145-160.
- Houdebine L.M. (2009). Production of Pharmaceutical Proteins by Transgenic Animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 107-121.
- Howarth, J. L., Lee, Y. B., Uney, J. B., (2009). Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell BiologyToxicology*. 26, 1-20.
- Iqbal, K., Barg-Kues, B., Broll, S., Bode, J., Niemann, H. ve Kues, W.A. (2009). Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *BioTechniques*, 47:959-968.
- İleri, İ.K. (1999). Fertilizasyon. İçinde İleri, İ.K., Pabuççuoğlu, S. ve Birler, S., *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Ve Sun'i Tohumlama*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını; 31-37.
- Inoue, K., Yamashita, S., Hata, J. I., Kabeno, S., Asada, S., Nagahisa, E., & Fujita, T. (1990). Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell differentiation and development*, 29(2), 123-128.
- Johnson, J., Bierle, B.M., Gallicano, G.I. ve Capco, D.G. (1998). Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Calmodulin: Regulators of the Meiotic Spindle in Mouse Eggs. *Developmental Biology*. 204, 464–477.
- Jost B., Vilotte J.L., Duluc I., Rodeau J.L. ve Freund J.N. (1999). Production of Low-Lactose Milk by Ectopic Expression of Intestinal Lactase in the Mouse Mammary Gland. *Nature Biotechnology*, 17 (2), 160-164.
- Kalkan, C. ve Horoz, H. (1997). Pubertas ve Seksüel Sikluslar. İçinde Alaçam, E., Alan, M., Apaydın, A.M., Bekyürek, T., Çolak, A., Deveci ve ark., *Doğum ve İnfertilite*. Ankara: Medisan; 23-41.
- Keefer, C.L., (2004). Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Animal Reproduction Science*. 82–83, 5–12.
- Klymiuk, N., Aigner, B., Brem, G., Wolf, E., (2010). Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Molecular Reproduction and Development*. 77(3), 209-21.
- Koo, B. C., Kwon, M. S., Kim, T., (2014). Retrovirus-Mediated Gene Transfer. *Transgenic Animal Technology* (Third Edition). Elsevier, USA. 167-194.
- Kölle, S., F. Sinowatz, G. Boie, G. Palma (1998). Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte and embryo. *Mol Reprod Dev* 49: 435–443.
- Kresge, N., Vacquier, V. D. ve Stout, C. D. (2001). Abalone lysin: the Dissolving and Evolving Sperm Protein. *BioEssays*, 23, 95–103.
- Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., Van der Schans A., Van den Broek S., Kooiman P. ve ark. (1991). Generation of Transgenic Dairy Cattle Using In Vitro Embryo Production. *Biotechnology*, 9 (9), 844-847.

- Krisher, R.L., Gibbons, J.R., Canseco, R.S., Johnson, J.L., Russell, C.G., Notter, D.R., Velander, W.H. ve Gwazdauskas, F.C. (1994). Influence of time of gene microinjection on development and DNA detection frequency in bovine embryos. *Transgenic Research*, 3, 226-231.
- Kues W.A. ve Niemann H. (2004). The Contribution of Farm Animals to Human Health. *Trends Biotechnology*, 22 (6), 286-294.
- Kumar S., Clarke A.R., Hooper M.L., Horne D.S., Law A.J., Leaver J., Springbett A., Stevenson E. ve Simons J.P. (1994). Milk Composition and Lactation of β -casein Deficient Mice. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 91 (13), 6138-6142.
- Kuwaki K., Tseng Y.L., Dor F.J., Shimizu A., Houser S.L., Sanderson T. ve ark. (2005). Heart Transplantation in Baboons Using α 1,3-galactosyltransferase Gene-Knockout Pigs as Donors: Initial Experience. *Nature Medicine*, 11 (1), 29-31.
- Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., Schans, A.V.D., Broek, S.V.D., Kooiman, P., ve ark. (1991). Generation of Transgenic Dairy Cattle Using 'In Vitro' Embryo Production. *Nat Biotechnol*, 9, 844-847.
- Lavitrano, M., Bacci, M.L., Forni, M., Lazzereschi, D., Di Stefano, C., Fioretti, D. ve ark. (2002). Efficient Production by Sperm-Mediated Gene Transfer of Human Decay Accelerating Factor (hDAF) Transgenic Pigs for Xenotransplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 14230–14235.
- Li, Z., Zeng, F., Meng, F., Xu, Z., Zhang, X., Huang, X., ve ark. (2014). Generation of Transgenic Pigs by Cytoplasmic Injection of piggyBac Transposase-based pmGENIE-3 Plasmids. *Biology of Reproduction*, 90, 1-10.
- Liu, X., Wang, Y., Tian, Y., Yu, Y., Gao, M., Hu, G., Su, F., Pan, S., Luo, Y., Guo, Z., Quan, F., Zhang, Y., (2014). Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 281(1780).
- Longo, F. J., Krohne, G., and Franke, W. W. (1987). Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell Biol.* 105, 1105–1120.
- Louros, N.N., Iconomidou, V.A., Giannelou, P. ve Hamodrakas, S.J. (2013). Structural Analysis of Peptide-Analogues of Human Zona Pellucida ZP1 Protein with Amyloidogenic Properties: Insights into Mammalian Zona Pellucida Formation. *PLoS ONE*. 8(9):e73258.
- Lu, T., Cohen, A. L., & Sanchez, J. T. (2017). In Ovo Electroporation in the Chicken Auditory Brainstem. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (124), e55628.
- Ma, Y., Poole, K., Goyette, J., & Gaus, K. (2017). Introducing membrane charge and membrane potential to T cell signaling. *Frontiers in immunology*, 8, 1513.
- Maga E.A., Anderson G.B. ve Murray J.D. (1995a). The Effects of Mammary Gland Expression of Human Lysozyme on the Properties of Milk From Transgenic Mice. *Journal of Dairy Science*, 78 (12), 2645-2652.
- Maga E.A. ve Murray J.D. (1995b). Mammary Gland Expression of Transgenes and the Potential For Altering the Properties of Milk. *Biotechnology*, 13 (13), 1452-1457.
- Matthews, N., Bester, N. ve Schwalbach, L.M.J. (2003). A Comparison Of Ram Semen Collected By Artificial Vagina and Electroejaculation. *South African Society for Animal Science*, vol 4, 28-30.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T., (2000). Embryogenesis: Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 403, 501–502.
- McLay, D.W. ve Clarke, H.J. (2003). Remodelling the Paternal Chromatin at Fertilization in Mammals. *Reproduction*. 125, 625–633.

- Menchaca, A., Anegon, I., Whitelaw, C. B. A., Baldassarre, H., Crispo, M., 2016. New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. *Theriogenology*. 86, 160–169.
- Menezo, Y. (2004). Cryopreservation of IVF embryos: which stage? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 113, 28–32.
- Metz, C. B., Seiguer, A. C., ve Castro, A. E. (1972). Inhibition of the Cumulus Dispersing and Hyaluronidase Activities of Sperm by Heterologous and Isologous Antisperm Antibodies. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*. 140, 776–781.
- Monroy A. ve Moscona A.A. (1979). *Introductory Concepts in Developmental Biology*. Chicago University Press.
- Montoliu, L., Schedl, A., Kelsey, G., Lichter, P., Larin, Z., Lehrach, H. ve Schutz, G. (1993). Generation of Transgenic Mice With Yeast Artificial Chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 58:55–62.
- Montoliu, L. (2002). Gene Transfer Strategies in Animal Transgenesis. *Cloning Stem Cells* 4:39–46
- Muir, W. M. ve Howard, R.D. (1999). Possible Ecological Risks of Transgenic Organism Release When Transgenes Affect Mating Success: Sexual Selection and the Trojan Gene Hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 24:13853–13856.
- Myles, D., Cho, C., Yuan, R. ve Primakoff, P. (1999). A Current Model for the Role of ADAMs and Integrins in Sperm–Egg Membrane Binding and Fusion in Mammals İçinde In The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications (C. Gagnon, Ed.). Viyana: Cache River Press, 249-255.
- Niemann, H. (2004). Transgenic Pigs Expressing Plant Genes. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 101 (19), 7211-7212.
- Niemann, H. ve Kues, W.A. (2003). Application of Transgenesis In Livestock for Agriculture and Biomedicine. *Animal Reproduction Science*, 79, 291-317.
- Niemann, H., Kues, W. ve Carnwath, J.W. (2005). Transgenic Farm Animals: Present and Future. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 24 (1), 285-298.
- Nottle M.B., Nagashima H., Verma P.J., Du Z.T., Grupen C.G., MacIlpatrick S.M. ve ark. (1999). Production and Analysis of Transgenic Pigs Containing a Metallothionein Porcine Growth Hormone Gene Construct. İçinde Murray, J.D., Anderson, G.B., Oberbauer, A.M. ve McGloughlin, M.M. (Ed.), *Transgenic animals in agriculture*. New York: CABI Publishing, 145-156.
- O’Rand, M. G., Metz, C. B. (1974). Tests for Rabbit Sperm Surface Iron-binding Protein and Hyaluronidase Using the “Exchange Agglutination” Reaction. *Biology of Reproduction*. 11, 326–334.
- Osakabe Y. ve Osakabe K. (2015). Genome Editing With Engineered Nucleases in Plants. *Plant and Cell Physiology*, 56(3):389-400.
- Overbeek, P. A., (2014). Factors Affecting Transgenic Animal Production. *Transgenic Animal Technology (Third Edition)*. Elsevier, USA. 71-107.
- Payne, C., Rawe, V., Ramalho-Santos, J., Simerly, C., Schatten, G. (2003). Preferentially Localized Dynein and Perinuclear Dynactin Associate with Nuclear Pore Complex Proteins to Mediate Genomic Union During Mammalian Fertilization. *Journal of Cell Science*. 116, 4727–4738.
- Piko, L., Tyler, A (1964). Ultrastructure of the Acrosome and the Early Events of Sperm Penetration in the Rat. *Animal Zoology*, 4, 287-296.

- Pinkert, C. A., (2014). Introduction to Transgenic Animal Technology. Transgenic Animal Technology (Third Edition). Elsevier, USA. 3-13.
- Platenburg G.J., Kootwijk E.A.P., Kooiman P.M., Woloshuk S.L., Nuijens J.H., Krimpenfort P.J.A. ve ark. (1994). Expression of Human Lactoferrin in Milk of Transgenic Mice. *Transgenic Research*, 3 (2), 99-108.
- Platt J.L. ve Lin S.S. (1998). The Future Promises of Xenotransplantation. *Annual New York Academy of Science*, 862, 5-18.
- Polites, H. G., Johnson, L. W., Pinkert, C. A., (2014). DNA Microinjection, Embryo Handling, and Germplasm Preservation. Transgenic Animal Technology (Third Edition). Elsevier, USA. 17-70.
- Potter, H., & Heller, R. (2018). Transfection by electroporation. *Current protocols in molecular biology*, 121(1), 9-3.
- Powell, D.J., Galli, C. ve Moor, R.M. (1992). The fate of DNA injected into mammalian oocytes and zygotes at different stages of the cell cycle. *Journal of Reproduction and Fertilization*, 95, 211-20.
- Powell, B.C., Walker, S.K., Bawden, C.S., Sivaprasad, A.V., Rogers, G.E., (1994). Transgenic sheep and wool growth: possibilities and current status. *Reproduction, Fertility and Development*. 6(5), 615-623.
- Prasad S.V., Skinner S.M., Carino C., Wang N., Cartwright J. ve Dunbar B.S. (2000). Structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona Pellucida. *Cells Tissues Organs*, 166(2), 148-164.
- Pursel V.G., Pinkert C.A., Miller K.F., Bolt D.J., Campbell R.G., Palmiter R.D. ve ark. (1989). Genetic Engineering of Livestock. *Science*, 244 (4910), 1281-1288.
- Pursel, V.G., Rexroad, C.E.Jr., (1993). Status of research with transgenic farm animals. *Journal of Animal Science*. 71 (3), 10-19.
- Rapacz J. ve Hasler-Rapacz J. (1989). Animal Models: The Pig. İçinde: *Genetic Factors in Atherosclerosis: Approaches and Model Systems* (R.S. Sparkes & A.J. Lusis, ed). Basel: Karger, 139-169.
- Ricklefs, R. E. (1990). *Ecology*, Third Edition. New York: W. H. Freeman.
- Saeki K., Matsumoto K., Kinoshita M., Suzuki I., Tasaka Y., Kano K. ve ark. (2004). Functional Expression of a Delta12 Fatty Acid Desaturase Gene From Spinach in Transgenic Pigs. *Proceedings of National Academy of Science*. USA, 101 (17), 6361-6366.
- Samanta, M.K., Dey, A. ve Gayen, S. (2016). CRISPR/Cas9: An Advanced Tool For Editing Plant Genomes. *Transgenic Research*, 25(5):561-73
- Schatten, G. (1994). The Centrosome and Its Mode of Inheritance: the Reduction of the Centrosome During Gametogenesis and Its Restoration During Fertilization. *Developmental Biology*. 165, 299-335.
- Scholey, J.M., Porter, M., Lye, R. ve McIntosh, J. (1989). Cytoplasmic Microtubule-Associated Motors. İçinde *The Cell Biology of Fertilization*. New York: Academic Press. 139-163.
- Schedl A, Beermann F, Thies E, Montoliu L, Kelsey G ve Schutz G (1992). Transgenic Mice Generated by Pronuclear Injection of a Yeast Artificial Chromosome. *Nucleic Acids Research*, 20, 3073-3077.
- Shinohara, E T; Kaminski, J M; Segal, D J; Pelczar, P; Kolhe, R; Ryan, T; Coates, C J; Fraser, M J; Handler, A M; Yanagimachi, R ve Moisyadi, S (2007). Active integration: new strategies for transgenesis. *Transgenic Research*, 16(3):333-9.
- Sinowatz, F., W. Amselgruber, E. Töpfer-Petersen, I. Totzauer, J.J. Calvete, J. Plendl (1995). Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anat Embryol* 191: 41-46.

- Sinowatz, F., Kölle, S., Töpfer-Petersen, E. (2001). Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Review Cells Tissues Organs*, 168(1-2):24-35.
- Spadafora C. (2002). Sperm-Mediated Gene Transfer: Practical Implications of a Biological Process. *Transgenic Research*. 11 82–83.
- Steinlechner, S. ve Niklowitz, P., (1992). Impact of Photoperiod and Melatonin on Reproduction in Small Mammals. *Animal Reproduction Science*, vol 30, issues 1-3, 1-28.
- Stinnakre M.G., Vilotte J.L., Soulier S. ve Mercier J.C. (1994). Creation and Phenotypic Analysis of α -lactalbumin Deficient Mice. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 91 (14), 6544-6548.
- Sumiyama, K., Kawakami, K., Yagita, Y., (2010). A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection *Genomics*, 95, 306–311.
- Sun, F., Bahat, A., Gakamsky, A., Girsh, E., Katz, N., Giojalas, L. C., Tur-Kaspa, I., ve Eisenbach, M. (2005). Human Sperm Chemotaxis: Both the Oocyte and Its Surrounding Cumulus Cells Secrete Sperm Chemoattractants. *Human Reproduction*. 20, 761–767
- Swanson M.E., Martin M.J., O'Donnell J.K., Hoover K., Lago W., Huntress V. ve ark. (1992). Production of Functional Human Hemoglobin in Transgenic Swine. *Biotechnology*, 10 (5), 557-559.
- Tarım ve Orman Bakanlığı (2019). *Koyun Yetiştiriciliği*. Ankara: Tarım ve Orman Bakanlığı. https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Belgeler/Hayvanc%C4%B1l%C4%B1k/K%C3%BC%C3%A7%C3%BCkba%C5%9F%20Hayvanc%C4%B1l%C4%B1k/Koyun%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi/2019%20Y%C4%B1l%C4%B1/Koyun_Yetistirciligi.pdf
- Tresoriero, J.V. (1981) Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *J Morphol* 168: 171–179.
- Tosti, E., & Boni, R. (2004). Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans. *Human Reproduction Update*, 10(1), 53-65.
- Vacquier V.D., Tegner M.J. ve Epel D. (1973). Protease Activity Establishes the Block Against Polyspermy in Sea Urchin Eggs. *Nature*, 240:352–3.
- Vacquier, V.D., Carner, K.R. ve Stout, C.D. (1990). Species-Specific Sequences of Abalone Lysin, the Sperm Protein that Creates a Hole in the Egg Envelope. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 87, 5792–5796.
- Van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., Van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M. ve ark. (2002). – Large Scale Production of Recombinant Human Lactoferrin in the Milk of Transgenic Cows. *Nature Biotechnology*, 20 (5), 484-487.
- Velander, WH., Johnson, JL., Page, RL., Russell, CG., Subramanian, A., Wilkins, TD. ve ark. (1992). High-level Expression of a Heterologous Protein in the Milk of Transgenic Swine Using the cDNA Encoding Human Protein C. *P Natl Acad Sci USA*, 83, 12003-12007.
- Vandenberg, J.G., Coffin, J.M., Hallerman, E.M., Lee, T.C., Mench, J.A., Muir, W.M. ve ark. (2002). *Animal Biotechnology: Science Based Concerns*. Washington: The National Academy Press.
- Voss, A.K., Sandmöller, A., Suske, G., Strojek, RM., Beato, M., Hahn, J. (1990). A Comparison of Mouse and Rabbit Embryos for the Production of Transgenic Animals by Pronuclear Injection. *Theriogenology*, 34, 813-824.
- Wagner, J., Thiele, F., Ganten, D., 1995. Transgenic animals as models for human disease. *Clinical and Experimental Hypertension*. 17(4), 593-605.
- Wah, D.A., Bitinaite, J., Schildkraut, I. ve Aggarwal, A.K. 1998. Structure of FokI Has Implications for DNA Cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18):10564-10569.

- Walton, J. R., Murray, J. D., Marshall, J. T. ve Nancarrow, C., D. (1987). Zygote Viability in Gene Transfer Experiments. *Biology of Reproduction*, 37, 957-967.
- Wani, N. A. (2002). In Vitro Maturation and In Vitro Fertilization of Sheep Oocytes. *Small Ruminant Research*, vol 44, issue 2, 89-95.
- Ward, C.R. ve Kopf, G.S. (1993). Molecular Events Mediating Sperm Activation. *Developmental Biology*, 104, 287-296.
- Ward, C.R., Storey, B.T. ve Kopf, G.S. (1994). Selective Activation of Gi1 and Gi2 in Mouse Sperm by the Zona Pellucida, the Egg's Extracellular Matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 13254-13258.
- Wassarman, P.M. (1987). Early Events in Mammalian Fertilization. *Annual Reviews Cell Biology*, vol 3, 109-142.
- Wassarman, P.M. (1999). Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. *Cell*, vol 96, 175-183.
- Watson, J.D. ve Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171, 737-738.
- Wheeler M.B., Bleck G.T. ve Donovan S.M. (2001). Transgenic Alteration of Sow Milk to Improve Piglet Growth and Health. *Reproduction*, 58, 313-324.
- Wheeler, M. B., 2007. Agricultural applications for transgenic Livestock. *TRENDS in Biotechnology*. 25 (5), 204-210.
- Wiznerowicz M. ve Trono D. (2005). – Harnessing HIV for Therapy, Basic Research and Biotechnology. *Trends of Biotechnology*, 23 (1), 42-47.
- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P. ve Sautiere, P. (1998). Nuclear Basic Proteins in Spermiogenesis. *Biochimie*. 80, 117-128.
- Woychik, R. P., Stewart, T.A, Davis, L.G., D'Eustachio, P.D. ve Leder, P. (1985). An Inherited Limb Deformity Created by Insertional Mutagenesis in a Transgenic Mouse. *Nature* 318:36-40.
- Wright, S.J. ve Longo, F.J. (1988). Sperm Nuclear Enlargement in Fertilized Hamster Eggs is Related to Meiotic Maturation of the Maternal Chromatin. *Journal of Experimental Zoology*. 247, 155-165.
- Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P. ve ark. (1991). High Level Expression of Active Human alpha-1-antitrypsin in the Milk of Transgenic Sheep. *Nat Biotechnol*, 9, 830-834.
- Würtele, H., Little, K.C.E. ve Chartrand, P. (2003). Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Therapy* 10, 1791-1799
- Yang, Z., Jiang, H., Chachainasakul, T., Gong, S., Yang, X.W., Heintz, N. ve Lin, S. (2006). Modified Bacterial Artificial Chromosomes for Zebrafish Transgenesis. *Methods* , 39, 183-188.
- Yang, Z., Jiang, H. ve Lin, S. (2009). Bacterial Artificial Chromosome Transgenesis for Zebrafish. *Methods of Molecular Biology*, 546, 103-116.
- Yamada K., Yazawa K., Shimizu A., Iwanaga T., Hisashi Y., Nuhn M. ve ark. (2005). Marked Prolongation of Porcine Renal Xenograft Survival in Baboons Through the Use of α 1,3-galactosyltransferase Gene-Knockout Donors and the Cotransplantation of Vascularized Thymic Tissue. *Nature Medicine*, 11 (1), 32-34.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. *The Physiology of Reproduction, Second Edition*. New York: Raven Press Ltd.; 190-281.
- Yılmaz, B. (1999). *Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi*. Ankara: Feryal Matbaacılık.
- Yong H.Y., Hao Y., Lai L., Li R., Murphy C.N. ve Rieke A. (2006). Production of a Transgenic Piglet by a Sperm Injection Technique in Which No Chemical or Physical Treatments Were Used For Oocytes or Sperm. *Molecular Reproduction Development*, 73, 595-599.

Zhu, J., Barratt, C.L.R., Lippes, J., Pacey, A.A ve Cooke, I.D. (1994). The Sequential Effects of Human Cervical Mucus, Oviductal Fluid, and Follicular Fluid on Sperm Function. *Fertility and Sterility*, volume 61, Issue 6, 1129-1135.





İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FERTİLİZASYON SONRASI FARKLI ZAMANLARDA YAPILAN GEN ENJEKSİYONLARININ TRANSGENİK KOYUN EMBRİYOSU ÜRETİMİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikerisim.sakarya.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

2

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

3

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

kutuphane.ksu.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

7

cdn.istanbulc.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

acikerisim.medipol.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

app.trdizin.gov.tr







