



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



IN VİTRO ELDE EDİLEN SIĞIR BLASTOSİSTLERİNDE BLASTOSİST SIVISINDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU

Arzu ESEN GÖBEKÇİ

**DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ**

**ANKARA
2025**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**IN VİTRO ELDE EDİLEN SIĞIR BLASTOSİSTLERİNDE
BLASTOSİST SIVISINDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU**

Arzu ESEN GÖBEKÇİ

**DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ

**Bu araştırma 2230333 proje numaralı TÜBİTAK 1002-Hızlı Destek Programı
Projesi ve 22A0239001 proje numaralı BAP Projesi ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2025**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “In Vitro Elde Edilen Sığır Blastosistlerinde Blastosist Sıvısından Genomik DNA İzolasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Arzu ESEN GÖBEKÇİ

Tarih:

İmza

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda

Arzu ESEN GÖBEKÇİ tarafından hazırlanan “In Vitro Elde Edilen Sığır Blastosistlerinde Blastosist Sıvısından Genomik DNA İzolasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

In Vitro Elde Edilen Sığır Blastosistlerinde Blastosist Sıvısından Genomik DNA İzolasyonu

Bu tez çalışmasında in vitro koşullarda üretilen sığır blastosistlerine iç hücre kümesi ve trofektoderm biyopsisi ile blastosist sıvı aspirasyonu yapılmış, elde edilen biyopsi örneklerine yapılan genetik analizlerin sonuçları karşılaştırılarak blastosist sıvısındaki genomik deoksiribonükleik asit (gDNA) varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmada *defined* medyum (Grup I) ve *undefined* medyum (Grup II) olmak üzere iki farklı kültür solüsyonu kullanılmış ve blastosist elde etme yüzdesi ile biyopsi örneklerine yapılan genetik analizlerin sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada Ankara ve Konya illerinde bulunan mezbahalardan toplanan ovaryumlar (Grup I, n: 30; Grup II, n: 54) kullanıldı. *Defined* medyum (Grup I, n:112) ile elde edilen oositler in vitro maturasyon, in vitro fertilizasyon ve in vitro embriyo kültürüne alındı. In vitro kültürün 7.-9. günü Kalite kodu I olan *expanded* blastosistlere (Grup I, n:29) sırasıyla blastosist sıvı aspirasyonu, trofektoderm biyopsisi ve iç hücre kümesi biyopsisi (Grup I, n:20) mikromanipülatör ile yapıldı. *Undefined* medyum (Grup I, n:226) ile elde edilen oositler in vitro maturasyon, in vitro fertilizasyon ve in vitro embriyo kültürüne alındı. In vitro kültürün 7.-9. günü Kalite kodu I olan *expanded* blastosistlere (Grup II, n:70) sırasıyla blastosist sıvı aspirasyonu, trofektoderm biyopsisi ve iç hücre kümesi biyopsisi (Grup II, n:20) mikromanipülatör ile yapıldı. Blastosist elde etme yüzdesi; Grup I (%25,89) ve Grup II (%30,97) olarak bulundu. Biyopsi örneklerinden elde edilen deoksiribonükleik asit (DNA) kalitesi DNA zenginleştirme işlemi sonrası nanodrop konsantrasyon ölçümü ile belirlendi. Nanodrop ölçümler karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunamadı. Embriyoların elde edildiği sığırlara ait uterus dokularından (Grup I, n:10; Grup II, n:16) örnekler alındı ve DNA izolasyonu yapıldı. DNA zenginleştirme ve DNA izolasyonu işlemi sonrası Grup I ve uterus doku örnekleri ile Grup II ve uterus doku örnekleri 19 primer içeren kısa tandem tekrar dizileri analizine alındı. Bu analiz ile anneden aktarılan allel genlerin varlığı araştırıldı. Grup I ve Grup II iç hücre kümesi ve trofektoderm biyopsilerinde anne ile uyum bulunurken, blastosist sıvısında Grup II’de bir örnekte iki primer belirlendi diğer örneklerde anne ile uyum belirlenemedi. Bu çalışmada, blastosist sıvısının miktarının azlığı nedeniyle tüm genom amplifikasyonunda yeterli DNA edilemeyeceği ve daha farklı analiz yöntemleri ile çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Blastosentez, DNA, İn vitro, Sığır Blastosisti, STR

SUMMARY

Isolation of Genomic DNA from Blastocyst Fluid in Bovine Blastocysts Produced In Vitro

In this study, inner cell mass and trophoctoderm biopsy and blastocyst fluid aspiration were performed on bovine blastocysts produced under in vitro conditions, and it was aimed to investigate the presence of genomic deoxyribonucleic acid (gDNA) in the blastocyst fluid by comparing the results of genetic analyses performed on the biopsy samples obtained. In addition, two different culture solutions, defined medium (Group I) and undefined medium (Group II), were used in the study and it was aimed to compare the percentage of blastocysts obtained and the results of genetic analysis of biopsy samples. Ovaries collected from slaughterhouses in Ankara and Konya provinces (Group I, n: 30; Group II, n: 54) were used in the study. Oocytes obtained with defined medium (Group I, n: 112) were cultured for in vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro embryo culture. On the 7th-9th day of in vitro culture, blastocyst fluid aspiration, trophoctoderm biopsy and inner cell mass biopsy (Group I, n:20) were performed with micromanipulator on expanded blastocysts (Group I, n:29) with Quality code I, respectively. Oocytes obtained with undefined medium (Group I, n:226) were cultured for in vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro embryo culture. On the 7th-9th day of in vitro culture, blastocyst fluid aspiration, trophoctoderm biopsy and inner cell mass biopsy (Group II, n:20) were performed with micromanipulator on expanded blastocysts with Quality code I (Group II, n:70), respectively. The percentage of blastocyst retrieval was found as Group I (25.89%) and Group II (30.97%). The quality of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from biopsy samples was determined by nanodrop concentration measurement after DNA enrichment. No difference was found between the groups when nanodrop measurements were compared. Samples were taken from the uterine tissues of cattle from which embryos were obtained (Group I, n:10; Group II, n:16) and DNA isolation was performed. After DNA enrichment and DNA isolation, Group I and uterine tissue samples and Group II and uterine tissue samples were subjected to short tandem repeat sequence analysis with 19 primers. With this analysis, the presence of maternally transmitted allelic genes was investigated. While maternal concordance was found in Group I and Group II inner cell mass and trophoctoderm biopsies, two primers were detected in one sample in Group II in blastocyst fluid and no maternal concordance was detected in the other samples. In this study, it was concluded that due to the small amount of blastocyst fluid, whole genome amplification of DNA was not sufficient and studies with different analysis methods should be performed.

Keywords: Blastocentesis, Bovine Blastocyst, DNA, In vitro, STR

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xv
Çizelgeler	xvii

1. GİRİŞ	1
1.1. Embriyo Transferi ve Embriyo Biyopsisinin Tarihçesi	4
1.2. Ülkemizde ve Dünyada Hayvancılık Verileri ile Embriyo Transferinin Yeri	12
1.3. In Vitro Embriyo Üretimi	18
1.3.1. Oosit Maturasyonu	18
1.3.2. In Vitro Fertilizasyon	24
1.3.3. In Vitro Embriyo Kültürü	26
1.4. Oositlerin Değerlendirilme Kriterleri	27
1.5. Embriyoların Değerlendirilme Kriterleri	31
1.6. Farklı Kültür Solüsyonlarının Kullanılması ve Embriyodaki Metabolik Değişiklikler	34
1.7. Embriyonik Genom Aktivasyonu	39
1.8. Preimplantasyon Genetik Test	41
1.9. Embriyo Biyopsisi	43
1.9.1. Polar Cisim Biyopsisi	47
1.9.2. Bölünme Aşamasındaki Embriyo Biyopsisi	48
1.9.3. Trofektoderm Biyopsisi	49
1.9.4. Blastosentez	50
1.9.5. Biyopsi Yöntemlerinde Diğer Güncel Yaklaşımlar	53
2. GEREÇ VE YÖNTEM	55
2.1. Ovaryumların Toplanması	55
2.2. Oosit Eldesi ve Ovaryumlar ile Uterustan Doku Örneğinin Alınması	56
2.3. Oositlerin Morfolojik Değerlendirilmesi	59
2.4. In Vitro Maturasyon	61
2.4.1. <i>Defined</i> Medyum Kullanarak In Vitro Maturasyon	61
2.4.2. <i>Undefined</i> Medyum Kullanarak In Vitro Maturasyon	63
2.5. Spermanın Fertilizasyon için Hazırlanması	64
2.5.1. <i>Defined</i> Medyum Kullanarak Hazırlama	64
2.5.2. <i>Undefined</i> Medyum Kullanarak Hazırlama	67
2.6. In Vitro Fertilizasyon	68
2.6.1. <i>Defined</i> Medyum Kullanarak In Vitro Fertilizasyon	68
2.6.2. <i>Undefined</i> Medyum Kullanarak In Vitro Fertilizasyon	69
2.7. Fertilizasyon Sonrası Oositlerin Denadüasyonu	70
2.7.1. <i>Defined</i> Medyum Kullanarak Fertilizasyon Sonrası Oositlerin Denadüasyonu	70
2.7.2. <i>Undefined</i> Medyum Kullanarak Fertilizasyon Sonrası Oositlerin Denadüasyonu	71
2.8. In Vitro Embriyo Kültürü	71
2.8.1. <i>Defined</i> Medyum Kullanarak In Vitro Embriyo Kültürü	71
2.8.2. <i>Undefined</i> Medyum Kullanarak In Vitro Embriyo Kültürü	73

2.9. Blastosistlerin Morfolojik Değerlendirilmesi	75
2.10. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	76
2.11. Blastosist Sıvı Aspirasyonu ve Re-ekspansiyon	77
2.12. Trofektoderm (TE) ve İç Hücre Kümesi (ICM) Biyopsisi	79
2.13. Biyopsi Materyalinden DNA İzolasyonu ve Zenginleştirme	82
2.14. Kısa Tandem Tekrar Dizilerinin (STR) Analizi	86
3. BULGULAR	90
4. TARTIŞMA	97
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
KAYNAKLAR	102
EKLER	117
Ek-1. Etik Kurul Raporu	117

ÖNSÖZ

Son yıllarda artan insan nüfusu sebebiyle hayvansal ürünlere talebin artması reproduktif alanında pek çok biyoteknolojik gelişmeyi de beraberinde getirmiştir. En önemli gelişmeler suni tohumlama (ST) ve in vitro embriyo üretimi (IVP) alanında yoğunlaşmış ve reproduktif verim özelliklerinin artırılmasına yönelik olmuştur. Seçkin bir inek normalde yılda bir kez yavru vermektedir fakat in vitro embriyo üretimi ile seçkin düve veya ineklerden daha fazla embriyo elde edilebilmektedir. Elde edilen embriyonun ise transfer edilmeden önce gerek genetik yönden gerekse verim özellikleri ve hastalıklar yönünden taranması için günümüzde biyopsi yöntemi kullanılan yöntemlerden biri haline gelmiştir. Embriyoya yapılan biyopsilerin embriyonun canlılığı üzerine etkisi veya ileri süreçte yol açacağı etkiler hala tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Bu sebeple son yıllarda minimal invaziv bir yöntem geliştirilmesi için çalışmalara başlanmıştır. Özellikle embriyonik gelişim dönemlerinde oluşan embriyonik metabolizma ürünleri ve genomik DNA'nın blastosist sıvısından elde edilebileceği görüşü ortaya çıkmıştır.

Günümüzde insanlarda invaziv olmayan biyopsi teknikleri kullanılmaya başlamıştır. Veteriner tıp alanında da bu tekniklerin araştırılması ve kullanılması ülkemizde hayvancılık yetiştiriciliği açısından önem arz etmektedir. Bu çalışma ile in vitro sığır embriyosu üretiminde kriyoprezervasyon öncesi aspire edilen blastosist sıvısından genomik DNA analizi ve diğer biyopsi yöntemleri ile karşılaştırılması yapılarak diğer bilimsel araştırmalara öncü olması düşünülmektedir.

Doktora eğitimim boyunca bana akademik bilgileri ile yol gösteren ve her zaman destek olan danışman hocam Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ'a ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı başkanı Prof.Dr. Rıfat VURAL'a, Doç. Dr. Murat Onur YAZLIK'a ve diğer öğretim üyelerine desteklerinden ve bana verdikleri değerli bilgilerinden dolayı teşekkür ederim. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hasan ALKAN'a, Doç. Dr. Kübra KARAKAŞ ALKAN'a, Doç. Dr. Fatma SATILMIŞ'a ve ekip arkadaşları Veteriner Hekim Ömer Faruk Yeşilkaya, Veteriner Hekim Muhammed Furkan Çiftçi ile doktora öğrencisi Yunus Emre DENİZ'e destekleri ve yardımları için teşekkür ederim. Tez çalışmamda yardımcı

olan ve manevi desteklerini esirgemeyen doktora öğrencisi Yasin BAKAR’a, Yaren BERK’e, Nazlı Senem CAM’a ve Sude VURAL YILDIZ’a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve yaşamım boyunca beni her anımda hem maddi hem manevi destekleyerek bana moral veren sevgili annem Yıldız ESEN’e, kardeşim Aslı ESEN’e ve sevgili eşim Burak GÖBEKÇİ’ye teşekkür ederim.

Ayrıca doktora tez çalışmam TÜBİTAK 1002-Hızlı Destek Programı 223O333 numaralı proje ve Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi 22A0239001 numaralı projesi ile desteklenmiştir. Verdikleri destekleri için TÜBİTAK’a ve Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

2N	Haploid
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
aCGH	Komparatif Genomik Hibridizasyon
AI	Yapay Zeka
ALT	<i>Alberta Livestock Transplants</i>
AMH	Anti-Müllerian Hormon
ATP	Adenozin Trifosfat
Bax	Pro-apoptotik Gen
BCB	Parlak Kresil Mavisi Boyama
Bcl-2	Anti-apoptotik Gen
BF	Blastosist Sıvısı
BME	<i>Bazal Medyum Eagle</i>
BO	<i>Brackett and Oliphant Solution</i>
BO-IVC	Bovine In Vitro Kültür
BO-IVF	Bovine In Vitro Fertilizasyon
BO-IVM	Bovine In Vitro Maturasyon
BSA	Sığır Serum Albümini
Ca	Kalsiyum
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum Klorid Dihidrat
cAMP	Siklik Adenozin 3', 5' Monofosfat
CDH2	<i>Cadherin 2</i>
CDX2	Kaudal Tip <i>Homeobox 2</i>
cf-DNA	<i>Cell-free-hücre</i> siz DNA
Cl	Korpus Luteum
CO ₂	Karbondioksit
CR1aa	Aminoasitli <i>Charles Rosencrans Medium</i>
CS	Buzağı Serum
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPBS	<i>Dulbecco 'nun</i> Fosfat Tamponlu Tuzlu Su Solüsyonu
eCG	At Koryonik Gonadotropini
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EGA	Erken Genomik Aktivasyon

EOMES	<i>Eomesodermin Homolog</i>
EPI	Epiblast
ERK1	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz-1
ERK2	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz-2
ESC	Embriyonik Kök Hücre
ET	Embriyo Transferi
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FCS	Fötal Sığır Serum
FF	Foliküler Sıvı
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
g	Gram
G	Kütle Çekim Kuvveti
G6PDH	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GATA3	Gata Bağlayıcı Protein 3
gDNA	Genomik DNA
GEBV	Genomik Tahmini Üreme Değeri
GS	Genomik Seçim
GV	Germinal Vezikül
GVBD	Germinal Vezikül Parçalanması
HEPES	Hidroksietil Piperazin Etan Sülfonik Asit
ICM	İç Hücre Kümesi
ICMART	Yardımcı Üreme Teknolojilerini İzleme Uluslararası Komitesi
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IETS	Uluslararası Embriyo Teknoloji Topluluğu
IR	Kızılötesi
IU	Uluslararası Birim
IVC	In vitro Kültür
IVD	In Vivo Üretilen Embriyo
IVF	In vitro Fertilizasyon
IVM	In vitro Maturasyon
IVP - IVEP	In vitro Embriyo Üretimi
KCl	Potasyum Klorür
KOK	Kumulus Oosit Kompleksi
KSOM	Potasyum Simpleks Optimize Edilmiş Medyum
LBI	<i>Livestock Breeders International</i>
LD	Lipit Damlacıkları
LH	Lüteinleştirici Hormon
M	Molarite
M.Ö.	Milattan Önce

MAPK	Mitogenle Aktive Olan Protein Kinaz
MDA	Çoklu Yer Değiştirme Amplifikasyonu
MEM	Minimum Esansiyel Medyum
mg	Miligram
MgCl ₂ .6H ₂ O	Magnezyum Klorid Hekzahidrat
MII	Metafaz II
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mm-Hg	Milimetre Civa
MOET	Çoklu Ovulasyon Embriyo Transferi
MZT	Maternal-Zigotik Geçiş
N ₂	Azot
Na ⁺ -K ⁺ ATPaz	Sodyum-Potasyum Adenozin Trifosfataz
NaCl	Sodyum Klorür
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NANOG	<i>Homeobox</i> Transkripsiyon Faktörü <i>Nanog</i>
NGS	Sonraki Nesil Dizileme
O ₂	Oksijen
°C	Santigrat
OCT4	Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4
Oksfos	Oksidatif Fosforilasyon
OVS	Oosit Yıkama Solüsyonu
PB	Polar Cisim
PB1	1. Polar Cisim
PB2	2. Polar Cisim
PBS	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su Solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	İlkel Endoderm
pg	Pikogram
PGD	Preimplantasyon Genetik Tanı
PGF ₂ α	Prostaglandin F ₂ alfa
PGS	Preimplantasyon Genetik Tarama
PGT	Preimplantasyon Genetik Test

PGT-A	Anöplöidi için Preimplantasyon Genetik Tanı
PGT-M	Monogenik Durumlar için Preimplantasyon Genetik Tanı
PGT-SR	Yapısal Yeniden Düzenlemeler için Preimplantasyon Genetik Tanı
pH	Hidrojen Potansiyeli
PLM	Polarize Işık Mikroskobu
PMSG	Gebe Kısırak Serum Gonadotropini
POU5F1	POU Alanı Sınıf 5 Transkripsiyon Faktörü 1
PPP	Pentoz Fosfat Yolu
PRC1	<i>Polycomb Resesif Kompleks 1</i>
PRC2	<i>Polycomb Resesif Kompleks 2</i>
PVA	Polivinil Alkol
PZD	Kısmi Zona Diseksiyonu
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	Dakika Başına Devir Sayısı
SCM	Kullanılmış Kültür Medyumu
SDS	Sperm Dilüsyon Solüsyonu
Sn	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SOF	Sentetik Ovidukt Sıvısı
SOP	Standart Çalışma Prosedürleri
SOX-2	Cinsiyet Belirleme Bölgesi Y-box2
sp-TALP	Spermatozoaya Modifiye Edilmiş Tyrode Albümin Laktat Piruvat
sp-TALP-H	Spermatozoaya Modifiye Edilmiş Tyrode Albümin Laktat Piruvat Heparin
ST	Suni Tohumlama
STR	Kısa Tandem Tekrar Dizileri
SWS	Sperm Yıkama Solüsyonu
TALP	<i>Tyrode Albümin Laktat Piruvat</i>
TCA	Trikarboksilik Asit
TCM-199	Doku Kültürü Medyumu-199
TE	Trofektoderm
TEAD4	TEA Alanı Aile Üyesi 4
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TKDP1	Trofoblast <i>Kunitz</i> Alan Proteini 1
TP1	Geçiş Proteini 1
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
u/ml	Mililitredeki Birim
UV	Ultraviyole
WE	<i>Warburg Etkisi</i>

WGA	Tüm Genom Amplifikasyonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ZP	Zona Pellusida
ZPB	Zona Pellusida Çift Kırılması
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. George John Romanes	5
Şekil 1.2. Walter Heape	5
Şekil 1.3. Embriyonun ikiye bölünmesi	7
Şekil 1.4. Yarasa embriyolarının evreleri	10
Şekil 1.5. Embriyo bölme işlemi ve ikiz buzağılar	11
Şekil 1.6. Son elli yılda yapılan önemli çalışmaların zaman çizelgesi	12
Şekil 1.7. Yapay zekanın (AI) IVF’te kullanımı	12
Şekil 1.8. 2023 yılı kırmızı et üretiminin hayvan türlerine göre dağılımı	13
Şekil 1.9. 2022-2023 yılları arası hayvan sayılarındaki değişim	14
Şekil 1.10. Dünyadaki süt ve et üretimi ile büyüme oranları	15
Şekil 1.11. Hayvan türlerine göre çiğ süt üretim miktarı	16
Şekil 1.12. Ülkelere göre süt üretim miktarı	16
Şekil 1.13. Oositin nükleer maturasyonu	19
Şekil 1.14. Folikülogenezisin şematik gösterimi	21
Şekil 1.15. Oositin olgunlaşma ve fertilizasyon süreci	22
Şekil 1.16. Dişi genital kanalında fertilizasyonun şematize edilmesi	24
Şekil 1.17. Birinci ve ikinci polar cisim ile erkek ve dişi pronükleusların görünümü	25
Şekil 1.18. KOK’ların morfolojik kalite değerlendirmesi	29
Şekil 1.19. Sığır embriyolarında gelişim aşamaları ve kalite kodu örnekleri	32
Şekil 1.20. Glukoz, yağ asitleri ve glutaminin metabolik yolları	36
Şekil 1.21. Biyopsi ve blastosist sıvısından yapılan genetik analizler	42
Şekil 1.22. Biyopsi yöntemleri	44
Şekil 1.23. Polar cisim biyopsisi	48
Şekil 1.24. Biyopsi pipeti ile blastomerlerin aspirasyonu	49
Şekil 1.25. İnek blastosistlerin te biyopsisi sonrası yapılabilecek analizlerin özeti	50
Şekil 1.26. Blastosist sıvısında, proteinler, dna ve rna varlığı	52
Şekil 2.1. Ovaryumların laboratuvara ulaştırılması	55
Şekil 2.2. Ovaryumlardan folikül sıvısının aspirasyonu	56
Şekil 2.3. Ovaryumlardan folikül sıvısının aspirasyonu	57
Şekil 2.4. Numaralandırılmış santrifüj tüplerine alınan folikül sıvıları	57
Şekil 2.5. 35 mm petrilere aktarılan oositlerin stereo mikroskopta kalitelerinin değerlendirilmesi	58
Şekil 2.6. Oosit arama için numaralandırılan ve karelere bölünen 35 mm petrilere	58
Şekil 2.7. İneklere ait uterusdan alınan doku örnekleri	59
Şekil 2.8. Brackett ve Zuelke (1993) ve De Loos vd. (1992)’nin belirttiği şekilde aspire edilen oositlerin kalite yönünden değerlendirilmesi	60
Şekil 2.9. Kumulus oosit kompleksleri	60

Şekil 2.10. In vitro maturasyon için hazırlanan TCM-199 + %5 CS	62
Şekil 2.11. TCM-199 + %5 CS ile hazırlanan in vitro maturasyon dropları	62
Şekil 2.12. BO-WASH VE BO-IVM (mavi ok) yıkama dropları	63
Şekil 2.13. 35 mm petrilere oluşturulan 100 µl/BO-IVM solüsyonu	63
Şekil 2.14. Spermatozoonların <i>Thoma</i> lamında sayımı	67
Şekil 2.15. BO-SemenPrep ile spermanın hazırlanması	68
Şekil 2.16. Spermatozoonlar ve oositlerin bir araya gelmesi	69
Şekil 2.17. Maturasyon sonrası kumulus ekspansiyonu	69
Şekil 2.18. In vitro fertilizasyon için oluşturulan BO-IVF dropları	70
Şekil 2.19. Kumulus hücreleri uzaklaştırılmış oositler	71
Şekil 2.20. In vitro kültür için oluşturulan droplar	73
Şekil 2.21. BO-IVC kültür ve yıkama dropları	74
Şekil 2.22. BO-IVC in vitro kültürde ilk 48 saat bölünme aşamasındaki embriyolar	74
Şekil 2.23. Embriyoların taşıma için kültür medyumunda payetlenmesi ve mikroskop görünümü	75
Şekil 2.24. BO-IVC in vitro kültür 7. Gün blastosist ve dejenere blastosist görüntüleri (A,B), CR1AA+ %5 CS in vitro kültür 7. gün blastosist ve dejenere blastosist görüntüleri (C)	76
Şekil 2.25. Grupların oluşturulması	77
Şekil 2.26. Blastosist sıvısının ICSI pipeti ile aspire edilmesi	78
Şekil 2.27. Mikro <i>blade</i> ile embriyo biyopsisi	80
Şekil 2.28. Embriyolardan alınan TE ve ICM biyopsi materyallerinin yıkama yapıldığı dropların şematik ve petrideki (mavi ok) görünümü	82
Şekil 2.29. DNA miktarını pikogramdan mikrogram seviyesine çıkaran kit	84
Şekil 2.30. Örneklerin hazırlanması	84
Şekil 2.31. İnek doku örneklerinden DNA izolasyonu	85
Şekil 2.32. Embriyo biyopsi örneklerine pre-amplifikasyon aşaması	85
Şekil 2.33. DNA kalitesinin 260/280nm dalga boyunda kontrolü	86
Şekil 2.34. DNA zenginleştirme işlemi yapılan biyopsi örnekleri ve dna izolasyonu yapılan sıgır dokularına seqline bovine 19-plex genotyping kit ile amplifikasyon işlemi	87
Şekil 2.35. Amplifikasyon işlemi yapılan örneklerin kapiller elektroforez ile analizi	88
Şekil 2.36. Amplifikasyon işlemi yapılan örneklerin kapiller elektroforez ile analizi sonucu STR lokuslarının belirlenmesi (EYS Medikal&Laboratuvar Projeleri, İstanbul)	89

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Toplanan sığır sütü ve üretilen süt ürünleri miktarı	13
Çizelge 1.2. IETS'nin 2022 yılında yayınladığı in vivo üretilen (IVD) ve in vitro üretilen (IVP) embriyoların kıtalara göre dağılımları	15
Çizelge 1.3. Polar cisim biyopsisi, blastomer biyopsisi, TE biyopsisi ve blastosentezin karşılaştırılması	46
Çizelge 2.1. In vitro maturasyon solüsyonunun hazırlanması	61
Çizelge 2.2. SWS solüsyonunun hazırlanması	65
Çizelge 2.3. SDS solüsyonunun hazırlanması	65
Çizelge 2.4. %90 Percoll gradient solüsyonunun hazırlanması	65
Çizelge 2.5. %45 Percoll gradient solüsyonunun hazırlanması	65
Çizelge 2.6. 10X Sperm TL stok solüsyonunun hazırlanması	65
Çizelge 2.7. BO-A solüsyonunun hazırlanması	66
Çizelge 2.8. BO-B solüsyonunun hazırlanması	66
Çizelge 2.9. BO solüsyonunun hazırlanması	66
Çizelge 2.10. OWS solüsyonunun hazırlanması	69
Çizelge 2.11. CR1aa solüsyonunun hazırlanması	72
Çizelge 2.12. CR1aa+%5 CS solüsyonunun hazırlanması	72
Çizelge 3.1. Grup I (<i>defined</i> medyum) bireysel ve toplam kumulus oosit kompleksi (KOK) sayısı, blastosist sayısı, biyopsi sayısı ve blastosist oranı yüzdesi	91
Çizelge 3.2. Grup II (<i>undefined</i> medyum) bireysel ve toplam kumulus oosit kompleksi (KOK) sayısı, blastosist sayısı, biyopsi sayısı ve blastosist oranı yüzdesi	92
Çizelge 3.3. Grup I (<i>defined</i> medyum) DNA zenginleştirme sonrası nanodrop ölçümleri ile str analizi anne-embriyo uyumu	93
Çizelge 3.4. Grup II (<i>undefined</i> medyum) DNA zenginleştirme sonrası nanodrop ölçümleri ile STR analizi anne-embriyo uyumu	95
Çizelge 4.1. İnsanlarda blastosist sıvısından genetik analiz için uygun DNA elde edilen çalışmalar	97

1. GİRİŞ

Birleşmiş Milletler'in 2022 yılında yayınladığı rapora göre dünya nüfusunun 2050 yılında yaklaşık 10 milyara ulaşması beklenmektedir (United Nations, 2022). Hayvancılık süt, et, yumurta gibi gıda maddelerinin yanında, yün, gübre, tarım gibi pek çok gelir ve ihtiyaç kaynaklarının sağlanmasında bir kaynak olarak rol oynar. Milyarlarca insanın gıda ihtiyacının karşılanması ve bu alanda istihdamın sağlanması hayvancılık endüstrisine bağlıdır. Dünyanın buzsuz karasal alanının yaklaşık %30'unu hayvancılık alanında yararlanılan sığır, manda, domuz, koyun, keçi ve kümes hayvanları kaplamaktadır. Artan insan nüfusu ile ihtiyaç duyulan hayvansal gıdalara talebin artması hayvancılık sektöründe biyoteknoloji alanında gelişmelere sebep olmuştur. İhtiyaçların karşılanması için hayvancılık sektöründe reproduktif olarak verim özelliklerinin artırılması ve iş kolaylığı sağlanması açısından yardımcı üreme teknikleri alanında çalışmalar yoğunlaşmıştır (Singh vd., 2019).

Biyoteknoloji, sürekli artmakta olan insan nüfusu için yeterli gıda arzının elde edilmesi için kilit bir teknolojidir. Başarılı bir hayvancılık üretimi için temel koşulların başında genetik ve reproduksiyon gelir. Bu iki alan, biyoteknolojik araştırmalarda yıllardır yer almaktadır. Şimdiye kadar geliştirilen biyoteknolojik prosedürler; çiftlik hayvanlarında reproduktif verimin artırılması, hayvanların genetik kaynaklarının korunması, ürün kalitesinin iyileştirilmesi veya yeni üretim stratejileri ve yeni hayvansal ürünler için uygulanmaktadır (Bedasa vd., 2017). Sığırlarda reproduktif alanda kullanılan mevcut biyoteknolojik prosedürler; suni tohumlama (ST), çoklu ovulasyon embriyo transferi (MOET), oositlerin in-vitro maturasyonu (IVM) ve in-vitro embriyo üretimi (IVP-IVEP), klonlama, nükleer transfer, biyopsi ve geliştirilen diğer teknolojilerdir. Bu teknolojilerin ustaca kullanılması, çağdaş hayvansal üretim verimliliği üzerindeki etkisi kısa sürede gerçekleşebilmekte ve seleksiyon farklılıkları ile nesil uzunluğunun değiştirilmesi yoluyla gelecek nesiller üzerinde kalıcı bir etkiye sahip olmaktadır. Üreme alanındaki biyoteknolojik gelişmeler ile nesil aralıklarını kısaltmak ve hayvan popülasyonları arasında genetik materyali çoğaltmak için kullanılması amaçlanmaktadır. Bu amaca ulaşmak için, nesiller boyu ST, in-vitro fertilizasyon (IVF) ve embriyo transferi (ET), embriyonik mikro manipülasyonlar alanında çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu teknolojilerin bilgi sistemleri ve veri analizleri ile birleştirilmesi önümüzdeki yıllarda daha da önemli değişiklikler sağlayacaktır. Hayvancılık gelişmekte olan ülkelerde hızlı büyüyen tarım sektörlerinden birisidir ve bu ülkeler son yıllarda yüksek ekonomik büyümeye sahiptir. Dünya çapında protein talebi, bitki proteinlerinden hayvansal

proteinlere doğru kaymaktadır. Hayvansal ürünlere olan talebin 2030 yılına kadar neredeyse iki katına çıkacağı ve bu artışın büyük bir bölümünün gelişmekte olan ülkelerde olacağı tahmin edilmektedir. “Hayvancılık Devrimi” olarak adlandırılan hayvancılık ürünlerine yönelik bu artan talep, geçimlerini hayvancılıkla sağlayan milyonlarca yoksul insanın refahını artırmak için bir şans yaratarak yoksulluğu azaltmanın önemli bir yolu haline gelebilir. Hayvansal protein için dünyada insan tüketiminin kişi başına günlük 29 g olduğu bildirilmiştir. Özellikle gelişmiş ülkelerde ise bu kişi başına yaklaşık 90 g olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte hayvansal kaynaklı gıdalara yönelik kişi başına artan talep eğilimi genellikle gelişmekte olan ülkelerde (dünya nüfusunun %80’i) ortaya çıkmaktadır (Said vd., 2020). Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak; büyüme, karkas ve üreme kalitesinin artırılması, beslenme ve yemden yararlanmanın iyileştirilmesi, kalite ve gıda güvenliğinin artırılması, hayvanların sağlık ve refahının iyileştirilmesi ve kaynakların daha verimli kullanılarak atıkların azaltılması ile hayvanların verimliliğinin artırılması mümkün hale gelmiştir. Bu nedenle hayvancılık üretimi ile ilgili olan biyoteknolojik alanlar diğerlerine göre daha hızlı büyümektedir. Hayvancılıkta üreme biyoteknolojilerinin kullanım amaçları; üretimi artırmak, reproduktif verimliliği ve genetik iyileştirme oranlarını artırmaktır. Yıllar geçtikçe, küçükbaş ve büyükbaş hayvanların üremesini yönetmek için birçok seçenek erişilebilir hale gelmiştir. En yaygın kullanılan yöntemler ise suni tohumlama ve spermanın saklanmasıdır. Hayvansal üretimde biyoteknoloji yalnızca dünyadaki hayvansal ürün talebini karşılamak amacıyla çiftlik hayvanı popülasyonunu artırmak için değil aynı zamanda nesli tükenmekte olan türlerin üremesini artırmak, mevcut biyoçeşitlilik ve genetik çeşitlilik düzeylerini sürdürmek için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Genetik belirteçler, aday genler ve ilgili diğer teknikler hayvanların genetik değerinin belirlenmesini iyileştirebilir. Bu sayede biyoteknoloji ve gen mühendisliği birlikte kullanıldığında gen transferi ve benzeri teknikler ile DNA düzeyinde genom yapay olarak değiştirilebilmektedir. Yardımcı üreme teknikleri, hayvan ıslah programlarına önemli katkılar sağlamıştır. Benzer şekilde, genomik seçilimin doğruluğunu artırmak için de önemli bilgiler ve araçlar sağlamıştır. Bununla birlikte bu araçların en büyük yararları, yalnızca hayvanların erken yaşta doğru bir şekilde seçilmesine izin verecek şekilde birleştirildiğinde beklenebilir. Bu nedenle canlılıklarından ödün vermeden embriyolardan DNA örneklerinin alınması, preimplantasyon genomik seçilimin (GS) konsolidasyonu için esastır. Çiftlik hayvanlarının genetik ıslahının ana odak noktaları genellikle süt ve et üretimi gibi kantitatif özelliklerdir. Yıllardır, üreme değerini tahmin etmek için her bir hayvanın kaydedilmiş fenotipinin soyağacı bilgisi ile kullanılmasına dayanan geleneksel genetik iyileştirme, reproduktif verimi artırmak için de kullanılmıştır. Bu teknoloji çok başarılı olmasına ve yetiştirilen türlerin çoğunda genetik kazanımlara yol açmasına rağmen, kalıtsal genetik

belirteçlerin üreme ve genetik ilerlemeyi hızlandırmak için hayvanları doğru bir şekilde seçilmesini gerektirmektedir (de Sousa vd., 2017). Seksenli yılların ortalarında sığır genom dizilimi ile başlayarak, genetik analiz ve haritalama teknolojilerinde önemli bir ilerleme meydana gelmiş ve bu da çeşitli genetik araçların geliştirilmesine yol açmıştır. Bunlardan biri, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) (Kadarmideen vd., 2014) olarak adlandırılan ve GS (Goddard vd., 2010) adı verilen yeni bir seçim yöntemiyle sonuçlanan on binlerce belirtecin saptanmasıdır. Genomik seçim yöntemi ile hayvanlar genomik damızlık değerlerine yani, tüm genomu etiketleyen belirteçler tarafından tahmin edilen genetik değerlerine göre üreme için seçilebilir (Ponsart vd., 2014). Genetik kazançtaki artışın, geleneksel progeny testi yöntemleriyle karşılaştırıldığında %60 ila %120 arasında olduğu belirtilmektedir (Pryce ve Daetwyler, 2011). Bunun nedeni, büyük ölçüde çok sayıda hayvan yetiştirme ve bunlardan sadece birkaç tanesini seçme maliyetlerindeki çarpıcı düşüştür. Yetiştiriciler GS ile, sığırlarda ve diğer türlerde geleneksel progeny testi şemalarını önemli ölçüde değiştirmiş olsa da genetik kazançtaki en büyük artış, nesil aralığını kısaltarak elde edilebilir. Bu da GS'yi, doğmamış bir hayvanın genetik değerinin embriyo aşamasında tahmin edildiği ve nesil aralığını büyük ölçüde azaltan IVEP ile ilişkilendirilerek yapılabilir (de Sousa vd., 2017). Ayrıca IVP, büyük miktarlarda embriyo üretimine izin vererek, seçim yoğunluğunu hızla artırır ve hızlı genetik iyileşmeye yol açar. In vitro fertilizasyon, yardımcı üreme tekniklerinin %99' unu oluşturur. In vitro embriyo üretimi ile mezbahada kesilen ineklerden, prepubertal düvelerden, repeat breeder hayvanlardan, gebe ineklerden ve genital kanal fizyolojik bozuklukları veya yüksek reproduktif özelliklere sahip fakat çeşitli sebepler ile (ayak hastalıkları, travmalar, yaralanmalar vb.) kesime sevk edilen hayvanlardan çok sayıda oosit elde edilerek yapılmaktadır. In vitro fertilizasyonun ana zorluğu, en büyük implantasyon potansiyeline sahip en iyi tek embriyoyu ve ardından doğuma kadar gelişimini tamamlama şansı en yüksek olanı seçmektir. Embriyo implantasyon potansiyelini optimize etmek için şu anda subjektif ve objektif embriyo morfolojisi yoluyla embriyo derecelendirme kullanılmaktadır. Bununla birlikte ayrıntılı olarak embriyonik canlılığın belirlenmesinde sınırlamalar vardır (Rule vd., 2018). Bu sınırlamalardan bazıları, implantasyon için en uygun embriyoyu belirlemek amacıyla embriyoların istatistiksel olarak karşılaştırılması ve gruplandırılmasını içerir. In vitro elde edilen embriyoların transfer sonrası gebelik oranı %30-40 iken in vivo üretilen embriyoların transfer sonrası gebelik oranı %50 oranındadır (Masuda vd., 2021). Son çalışmalar, tek embriyo transfer döngülerinde embriyo seçimine yardımcı olmak için preimplantasyon genetik tanı (PGT) kullanıldığında IVF başarısını yani transfer başına devam eden gebelik oranlarını %30 oranında artırılabilirliğini göstermektedir (Ben-Nagi vd., 2019).

1.1. Embriyo Transferi ve Embriyo Biyopsisinin Tarihçesi

Milattan önce (M.Ö.) 5. yüzyılda Pisagor okulunda çoğulcu akım “tohumlar” teorisini kabul etmiştir. Çoğulcu akım, fetüsün iki ebeveyn tohumunun karışımından meydana geldiğini savunmuştur. Demokritos (M.Ö. 460-370), dişilerin sol testisten, erkeklerin ise sağ testisten geldiği fikrini savunmuştur. Hipokrat (M.Ö. 460-370) ise, bu tohumların tüm vücut bölgelerinden akarak her birinin hem eril ve hem de dişil temel organları içerdiği görüşünü kabul etmiştir. Aristoteles (M.Ö. 384-322), fetüsün oluşumuna sadece erkeğin tohumunun katıldığı görüşünü kabul etmiştir. M.Ö. 350 civarında yayımlanan *De generatione animalium* (Hayvanların Nesli)’da çeşitli hayvanların üreme mekanizmasının ilk kapsamlı teorisine yer verilmiştir; bu teoriler, organın embriyoda kademeli olarak geliştiğini savunan (epigenez) teori ile bütün dokuların ve genel vücut yapısının sperm ve yumurtada var olduğunu ve gelişmenin bu minyatür organizmanın büyümesiyle oluştuğu (preformasyon) teorisidir. Hipokratın manevi varisi sayılan Galen ise (M.Ö. ~130-201), hem erkeğin hem de dişinin tohumlarının üremeye katkısı olduğunu ileri sürmüştür. Fakat Galen, dişi ve erkeğin sadece bir temel organ içerdiğini savunmuştur. Geç Rönesans dönemine kadar bu fikirler kabul görmeye devam etmiştir (Alexandre, 2002).

Modern anatominin babası kabul edilen Andreas Vesalius 1543 yılında insan anatomisi üzerine yaptığı *De humani corporis fabrica* (İnsan Vücudunun Kumaşı Üzerine) adlı çalışmada, kadınlarda bulunan “uterus” ile erkeklerdeki “sperm taşıyan kanallar (*ductus deferens*)” arasında benzerlik olabileceğini öne sürmüştür. Bu görüş daha sonra öğrencisi Gabrielis Fallopius tarafından doğru bir şekilde tanımlanmasına rağmen bu organların gerçek işlevleri bir yüzyıl sonra Reiner De Graff’ın çalışmaları ile anlaşılabilmiştir. 1672’de De Graff yumurta olarak tanımladığı foliküllerle ilişkilendirilmiş ve bunlar daha sonra Graff folikül olarak isimlendirilmiştir. Aynı yılda ayrıca insan yumurtasının *fallop* tüplerinden geçtiğini de ileri sürmüştür. Bu nedenle modern üreme biyolojisinin kurucusu olarak kabul edilmiştir (Ankum vd., 1996).

Antoni Van Leeuwenhoek, kendi tasarladığı mikroskopta “*animacules*” olarak adlandırdığı yapıları keşfetmiştir (Cobb, 2012). İlk suni tohumlama uygulaması ise yaklaşık yüz yıl sonra 1784’te fizyolog Lazzaro Spallanzani tarafından bir köpek üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmayı, 1790 yılında anatomist ve cerrah John Hunter insanlarda ilk başarılı suni tohumlamayı yaparak izlemiştir.

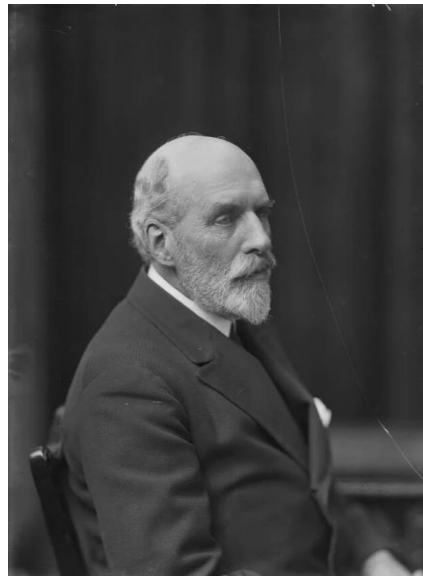
Aydınlanma Çağında, preformasyoncular ve epigenezistler olmak üzere iki farklı görüş ortaya çıkmıştır. Preformasyoncular, tohum teorisini ve hücrelerin yumurta ya da *animacules*’de daha önceden var olduğunu, bütün dokuların ve vücut yapısının bu minyatür

hücrelerin büyümesiyle oluştuğunu savunmaktadır. Epigenezistler ise, vücut parçalarının başlangıçta var olmadığını sonradan embriyoda kademeli olarak oluştuğunu savunmaktadır (Van Speybroeck vd., 2002).

Bu iki görüşe rağmen memeli üremesi ve gelişimi hakkındaki çalışmalar 19. yüzyıla kadar ciddi bir ilerleme gösterememiştir. Embriyo transferinin başarısız da olsa ilk girişimcisi, on dokuzuncu yüzyılın başlarında, Kanadalı-İngiliz evrim biyoloğu George John Romanes'tir (Şekil 1.1.). Fakat tavşanlarda yaptığı embriyo transferi çalışmaları ve ilk canlı yavru doğumu 1890 yılında Walter Heape tarafından yapılmıştır (Betteridge, 2003, Şekil 1.2). Bu yöntem daha sonra sistematik olarak diğer türlere de uygulanmıştır.



Şekil 1.1. George John Romanes (https://tr.wikipedia.org/wiki/George_Romanes)



Şekil 1.2. Walter Heape (<https://npgshop.org.uk/products/walter-heape-npg-x44316-print>)

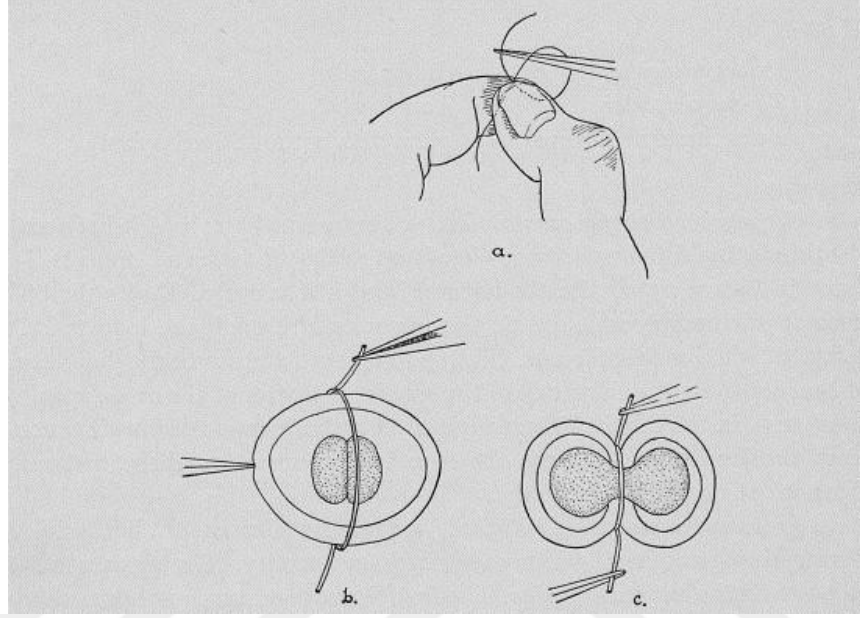
Avrupa kıtasında, 19. yüzyılın sonunda yeni bilim dalı olarak “Gelişim mekaniği” alanı, deneysel embriyolojinin babası olarak bilinen Wilhelm Roux (1850-1924) sayesinde ortaya çıkmıştır (Sander, 2012). Albert von K  llicker 1861 yılında *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der h  heren Tiere* (İnsanların ve Gelişmiş Hayvanların Gelişim Tarihi) adlı embriyoloji üzerine ilk ders kitabını yayınlamıştır. Zoolog Oscar Hertwig 1876 yılında deniz keşanesinde spermatozoon ve yumurtanın pron  kleer füzyonunu bildirmiştir. Bunun   zerine     yıl sonra Hermann Fol döllenme için tek bir spermatozoonun gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu kadar çalışma sonunda spermatozoon ve yumurtanın birleşimi döllenme olayı olarak kabul edilmiştir (Herdoğan vd., 2023).

İlk kez Kaliforniya   niversitesi’nde Cole ve Hart (1930) tarafından keşfedilen at koryonik gonadotropini (eCG) ya da gebe kısra  k serum gonadotropini (PMSG) daha sonra çiftlik hayvanları için s  perovulasyonun sağlanması  da oldu  ka önemli bir hale gelmiştir. Embriyo transferi’nin (ET) hayvancılıkta kullanılmasına yönelik ilk adımlar ilk kez iki hücreli sığır embriyosu elde eden Hartman vd. tarafından 1931 yılında Carnegie Embriyoloji Laboratuvarı’nda atılmıştır (Niemann ve Seamark, 2018). Bu çalışmayı sonra, Berry ve Warwick’in 1949 yılında koyun ve keçilerde ilk canlı hayvan embriyosu transferi takip etmiştir (Souza-Fabjan vd., 2023). Bu başarisından dolayı Berry 1982 yılında Uluslararası Embriyo Teknoloji Topluluğunun (IETS)   d  l  n   alan ilk kişi olmuştur (Betteridge, 2003). İ  kinci Dünya Savaşı’nın başlaması ile ET yöntemlerinin gelişmesi aksamış fakat savaş sonrası yaşanan gıda kıtlığı ET dâhil hayvancılıkta üremeyi iyileştirmeyi amaçlayan pek çok araştırma yapılmasına yöneltmiştir.

Pincus vd. (1936) hafif anestezi ile özel bir transfer pipeti kullanarak ovidukt ve ovaryumların çıkarılması için laparotomi yöntemini kullanmışlar ve ovaryumdan elde ettikleri oositi bir tuz çözeltisi içerisinde d  llemişlerdir. Daha sonra gelişen bu embriyoyu inkübatör görevi gören başka bir tavşanın uterusuna aktarmışlardır. Yaptıkları deneylerde Pincus, sentetik progesteron (progestin) uygulanarak ovulasyonun durdurulabileceği bulmuş ve bu çalışma hormonal doğum kontrol haplarının temelini oluşturmuştur.

Gıda kıtlığı sebebiyle İngiliz h  k  meti 1942 yılında Cambridge’de Lionel Edward Aston Rowson yönetiminde sığır yetiştiriciliğinde ilk suni tohumlama merkezini kurmuştur. Bu   alışma sayesinde Rowson   iftlik hayvanlarında embriyo transferinin kurucu babası olarak anılmaya başlamıştır (Hunter ve L  pez-Gatius, 2021). Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) 1950’lerde Minnesota’da ineklerin s  perovulasyonu, embriyoların serviks yolu ile toplanması ve aktarılması, transfer bekleyen embriyoların işlenmesi ve donör ile alıcıların siklus döngülerinin senkronize edilmesi üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Dziuk vd.,

1958). Dünyadaki embriyo çalışmalarından bağımsız olarak Almanya’da Hans Spemann’ın “Embriyonik Gelişim ve İndüksiyon” adlı kitabı ile amfibi embriyolojisinin temel yönlerini açıklamıştır. Spemann, yapay yolla identik ikizler elde etmek için 2 hücreli bir semender embriyosunun etrafına saç teli dolamış ve hücrelerin bölünmesini sağlamıştır (Hamburger, 1942; Moore ve Hasler, 2017, Şekil 1.3.).

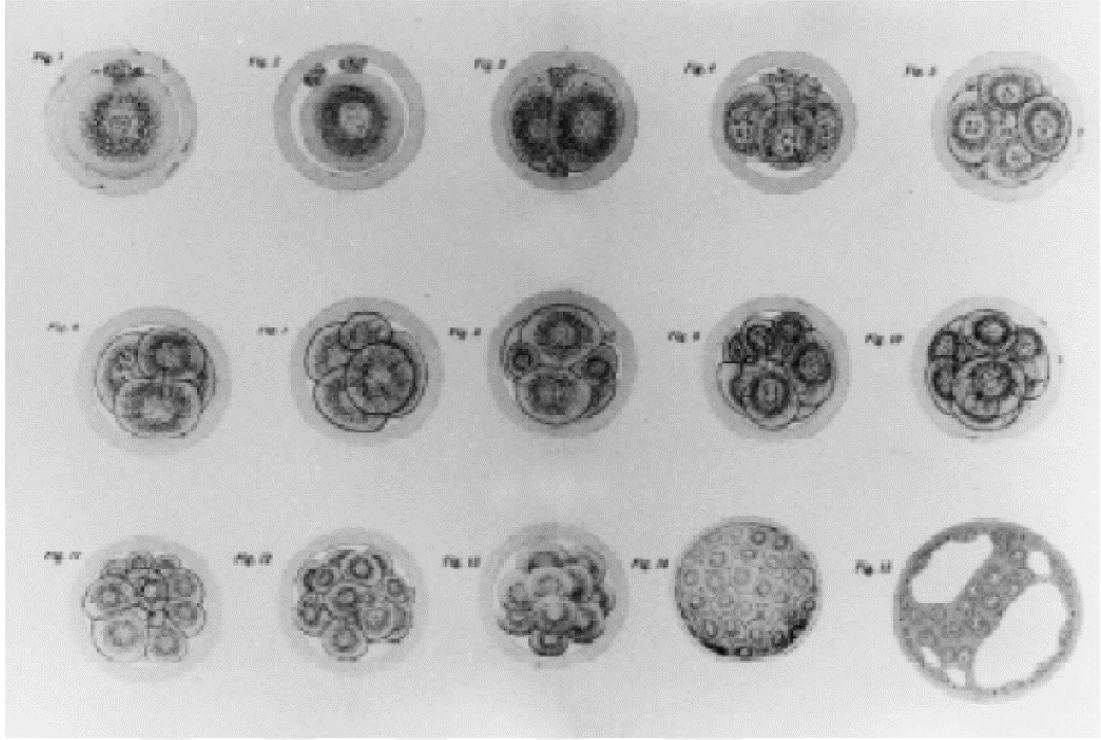


Şekil 1.3. Embriyonun ikiye bölünmesi (Hamburger, 1942)

Whitten 1956 yılında tanımlanmış (*defined* –içeriği belli olan) bir kültür ortamında 8-hücreli fare embriyolarını in vitro ortamda blastosist aşamasına getirmeyi başarmıştır. Bu sırada, tavşan, keçi, sıçan, fare, sığır ve domuz üzerinde tür içi transfer gerçekleştirilmiştir (Hammer, 1998) ve sonra hamster, gelincik, vizon, at, babun, kedi, köpek ve manda gibi diğer türlere de uygulanmıştır (Kraemer, 1983). Richard Gardner ve Robert Edwards tavşan blastosistlerinde cinsiyet belirlemeye yönelik çalışmalara başlamış ve tavşan embriyolarında holding pipet ve iridektomi makası ile trofektoderm (TE) hücrelerinden biyopsi almayı ve bu parçayı ince bir pipet ile aspire etmeyi başarmıştır (Gardner ve Edwards, 1968). Aslında preimplantasyon genetik tanı (PGT) kökenleri burada atılmıştır. İnsan embriyolarında PGT için tek hücreli ilk biyopsi 1990’ların başında gerçekleştirilmiş ve cinsiyet belirlenmiştir (Handyside vd., 1990). Hayvan ıslahında ilk PGT uygulaması embriyo transferi öncesi embriyoların cinsiyetlerini belirlemek için yapılmıştır (Herr vd., 1990). Holding ve Monk (1989)’un fare embriyolarında yaptığı çalışmada, fare blastomerlerindeki tek bir kopya genin tespit edilmesi ile tekniğin potansiyeli fark edilmiş ve bu alanda çalışmalar artmıştır. Albert Brachet (1912-1913), tavşan blastosistini 48 saat boyunca anne vücudu dışında, kan plazması içinde canlı tutan ve geliştiren ilk kişidir. Lewis ve Gregory 1929 yılında tavşan oositlerinin

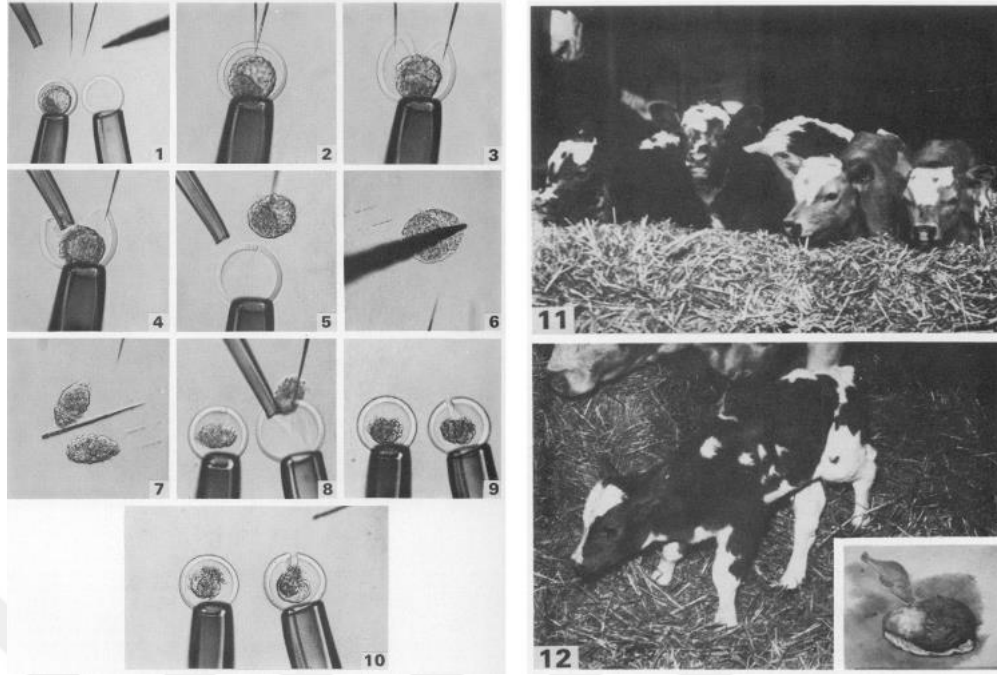
gelişimini mikroskop altında ilk bölünme aşamasından blastosist aşamasına kadar filme almayı başarmıştır (Alexandre, 2002). Sıçan, fare ve kobay oositleri bir veya iki bölünmenin ötesine geçememiştir (Pincus, 1936). Pincus Lewis ve Gregory'nin yöntemi ile deneysel cihazları (asılı drop tekniği, Carrel şişesi, nemli bir saat camı odacığı vb.) kullandığında tavşan oositlerinde elde edilen sonuçlarla benzer başarı elde etmiştir. Bu deneyden sonra Pincus, oositlerin metabolik gereksinimlerini araştırmaya başlamıştır. Willett (1953) Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı Süt Endüstrisi Bürosu ve Wisconsin Üniversitesi Genetik Bölümü ile iş birliği içinde sığırlarda süperovulasyon ve embriyo transferi üzerinde çalışmak üzere görevlendirilmiş ve yapılan çalışmalar sonrası embriyo transferi sonrası ilk buzağı doğumu gerçekleşmiştir. Bu sırada sığırların süperovulasyonu, embriyoların serviks yoluyla toplanması ve aktarılması, transfer bekleyen embriyoların işlenmesi ve donör ile alıcı ineklerin senkronize edilmesi yöntemleri üzerinde yoğun çalışmalar devam etmekteydi (Dziuk vd., 1958). Tim Rowson da 1950'lerde süperovulasyon üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmıştır. Smith 1952 yılında gliserolün kriyoprotektif etkisini araştırmıştır (Casciani vd., 2023). Bu sırada Marden ve Chang (1952) ise Massachusetts'ten İngiltere'ye tavşan embriyolarını vakumlu bir şişede buz balonlarıyla paketleyerek hava yolu ile göndermiştir, transfer sonrası başarı düşük olsa da embriyoların uluslararası gönderilme potansiyeline dikkat çekmiştir. Koyun, sığır ve domuz üzerindeki çalışmalar 1960'lı yıllarda birbirine paralel ilerleme göstermiştir. Japonya'da Sugie (1965) yaptığı çalışmada serviksi by-pass ederek transvaginal bir yaklaşım geliştirmiştir. Bu amaçla, embriyo transferinde kullanılan iğnenin uterus lümeninde olduğundan emin olmak için karbondioksit (CO₂) insuflasyonu tekniğini kullanmıştır. Rowson ve Moore (1966) transservikal transfer sonrası bu yöntemi kullanmıştır fakat yeterli başarı sağlayamadığı ve Cambridge'deki cerrahi yöntemin yüksek başarı oranları sebebiyle gözden düşmüştür. 1969 yılında homolog serum ile doku kültürü medyumuna-199'u (TCM-199) ve cerrahi ile cerrahi olmayan transfer yöntemini karşılaştırılmış ve homolog serum ortamı kullanılan grupta cerrahi ve cerrahi olmayan yöntem ile hiç gebelik elde edilemez iken, TCM-199 ve cerrahi yöntem kullanılan grupta gebelik oranı %91'dir (Polge, 2000). Tavşan ve domuz embriyolarında 1960'ların sonunda mikromanipülasyon araştırmaları başlamış ve tek blastomerin bütün hayvanlara dönüşebileceği fikri ortaya çıkmıştır (Moore vd., 1968). Çiftlik hayvanlarında cinsiyet kromatinin tespit edilmesi zor olduğu için bu konu yeterince önemli görülmemiştir. Rowson, 1972 yılında Cambridge'de, 13 veteriner hekimden oluşan bir gruba eğitim düzenlemiş ve bu grup birçok bağımsız embriyo şirketine ek olarak 2 yıl sonra IETS'yi kurmuştur (Betteridge, 2003). Donmuş-çözdürülmüş blastosistten ilk buzağı Wilmot ve Rowson (1973) tarafından üretilmiştir. Çiftlik hayvanlarının senkronizasyonunda kullanılan prostaglandin F₂ alfa (PGF₂α) ve analoglarının bulunması büyük ilerlemelere neden

olmuştur (Philippo ve Rowson, 1975). Sığırlarda embriyo transferindeki gelişmeler ve kullanılan tekniklerin laboratuvardan sahaya taşınmasında küçük şirketlerin katkısı olmuştur. Hatta James Dula ve Duane Kraemer tarafından kurulan ilk şirket *Livestock Breeders International* (LBI)'dir ve ticari olarak ilk buzağısını 1971'de üretmiştir (Kraemer ve Dula, 1972). En uzun süre faaliyet gösteren ve en büyük şirketlerden biri olan 1971'de kurulan *Alberta Livestock Transplants* (ALT)'nin tek amacı büyükbaş hayvan yetiştiricileri için kâr amacıyla embriyo transfer hizmetleri sağlamaktır (Church ve Shea, 1977). Bu hizmet, günümüzde ALT'nin devamı niteliğinde olan Alta Embriyo Grubu tarafından devam etmektedir. Karl Ernst von Baer, önce köpek sonra diğer türlerde oositin mikroskopik tanımını yapmıştır (Horowitz, 1987). Modern histolojinin kurucularından Jan E. Purkinje'nin öğrencisi Adolph Bernhardt, oositte bir "germinal vezikül" gözlemlemiştir ve bunun hücre çekirdeği olabileceğini düşünmüştür. Bu da hücre teorisinin ortaya çıkması ile paralellik göstermektedir (De La Fuente, 2006). Zoolog Edouard Van Beneden tarafından yumurta gelişiminin erken evreleri ayrıntılı bir şekilde ortaya koyulmuştur. Ayrıca Van Beneden, nematodlardan *Ascaris megalocephala*'da gamet üretimi sırasında kromatik azalmayı keşfeden kişidir ve ilk kez hem tavşan hem de yarasalarda üç temel tabakanın oluşumunu tanımlamıştır. Bu sayede, zigot bölünmesi sırasında "blastodermik kesecik" oluşumunu da keşfetmiştir. Aslında bu, günümüzde "blastosist" olarak adlandırılan embriyo evresinin ilk tanımıdır. Yarasalarda yaptığı çalışma sonucu memelilerde implantasyon öncesi dönemdeki embriyo gelişim evrelerinin çizimleri son aşamayı göstermek için günümüzde hala kullanılmaktadır (Alexandre, 2002, Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Yarasa embriolarının evreleri (Alexandre, 2002)

Steen Willadsen, 2 hücreli koyun embriyosunu keserek blastomerleri çıkarmış ve bu blastomerleri içi boşaltılmış oositlere transfer etmiş ve agara gömmüştür. Elde ettiği homozigot embriyoları uterusunda kültürledikten sonra alıcılara transfer etmiştir. Bunun sonucunda her biri klon olan 5 adet ikiz doğmuştur. Bu çalışma, modern memeli bölünmesi çalışmalarına öncülük etmiş ve aynı işlem yine Willadsen tarafından sığır embriyolarına da uygulanmış ve klon ikiz yavrular elde edilmiştir (Brem, 1989). Ozil (1983) sığır blastosistlerinde yaptığı çalışmada, invert mikroskop ve bu mikroskopa eklenmiş mikro bistüri kullanarak 8. gün embriyoları zonadan ayırarak blastosistleri tam ortadan ikiye bölmüş ve identik ikizler elde etmiştir (Şekil 1.5.). Memeli embriyosunda nükleer transfer teknolojisi, ilk kez Solter ve Mcgrath (1983) tarafından geliştirilmiştir ve fareler üzerinde yapılan bu deneylerden sonra Solter (1984) memeli klonlamanın biyolojik olarak mümkün olduğunu belirtmiştir (Tucci vd., 2019). Willesden, 1984 yılında embriyonik kök hücreler (ESC) kullanarak bir koyun klonlamıştır. Ayrıca çeşitli memeli türlerine ait embriyonik hücreleri birleştirerek koyun-keçi ve koyun-sığır melezleri oluşturmaya çalışmıştır. Sims ve First ise 1993 yılında ilk kez in vitro geliştirilen sığır embriyosu klonlamak için sığır ESC'lerini kullanmıştır. Wilmut ve Campbell, bir koyunun meme bezinden alınan somatik hücreleri kullanarak ilk koyun klonu olan Dolly'yi 1996'da elde etmiştir (Wilmut ve Campbell, 2001).



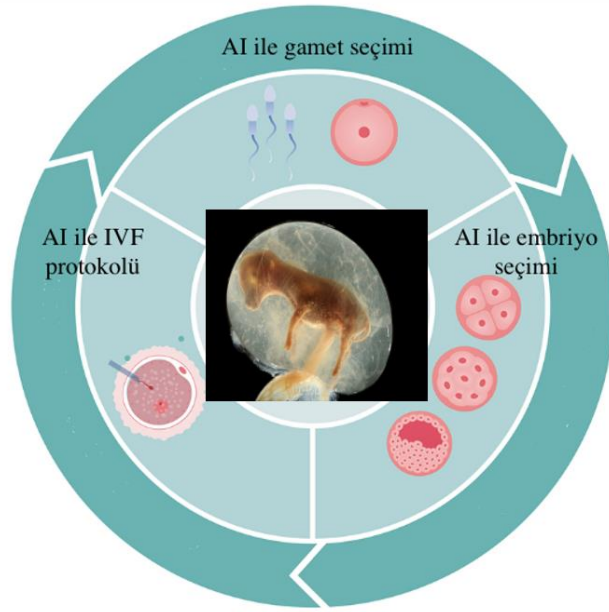
Şekil 1.5. Embriyo bölme işlemi ve ikiz buzağılar (Ozil, 1983)

Son elli yılda, embriyo bölünmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda moleküler ve hücresel çalışmalara odaklanılmıştır (Şekil 1.6.). Velasquez vd. (2017) yaptıkları çalışmada, sığır blastosistlerinde iki bölme işlemi sonrası embriyo morfolojisini ve oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (OCT4), cinsiyet belirleme bölgesi Y-box 2 (SOX2), *Homeobox Transkripsiyon Faktörü Nanog* (NANOG), *kaudal tip homeobox 2* (CDX2), geçiş proteini 1 (TP1), trofoblast *Kunitz alan proteini 1* (TKDP1), *eomesodermin homolog* (EOMES) ve pro-apoptotik gen (Bax) dâhil olmak üzere çeşitli gen ifadelerini incelemiş ve embriyoların morfolojik olarak 13 gün sonra önemli ölçüde farklılaştığını ve gen ifadelerinden bazılarının embriyo bölme işlemi ile azaldığını bulmuşlardır. Ayrıca miRNA'ların keşfedilmesi ve biyoteknoloji alanındaki çalışmalarda araştırılmaya başlanması ile birçok moleküler mekanizma ve sinyal yolları ile bunların mekanizmaları açıklanabilir hale gelmiştir. Omik analizlerin yaygınlaşması ile embriyoda proteomik analiz çalışmaları yapılmıştır. Erken soy hattı spesifikasyonu, embriyonik genom aktivasyonu (EGA), in vivo üretilen embriyo (IVD) ve IVP embriyolar arasındaki farkları, blastosist sıvısındaki, ilkel yolk kesesindeki ve trofektodermdeki proteomları non-invaziv bir şekilde embriyoların kaliteleri için biyobelirteç olarak kullanmak günümüzde mümkün hale gelmiştir (Rabel vd., 2023). Son yıllarda, yapay zekanın kullanım alanları arasına IVF de eklenmiştir. Makine öğrenimi ile dejenere olan oosit ve embriyoların tanımlanması, embriyonun hangi gelişim aşamasında olduğu, spermanın morfolojisi, oosit ve embriyoların kalite açısından değerlendirilip sınıflandırılması, optimum

IVF protokollerinin geliştirilmesi, genetik ve omik analizler gibi pek çok değerlendirme standart hale gelmiştir (Dimitriadis vd., 2022, Şekil 1.7.).



Şekil 1.6. Son elli yılda yapılan önemli çalışmaların zaman çizelgesi (Canva'da yapılmıştır)



Şekil 1.7. Yapay zekanın (artificial intelligence-AI) IVF'te kullanımı (Canva'da yapılmıştır)

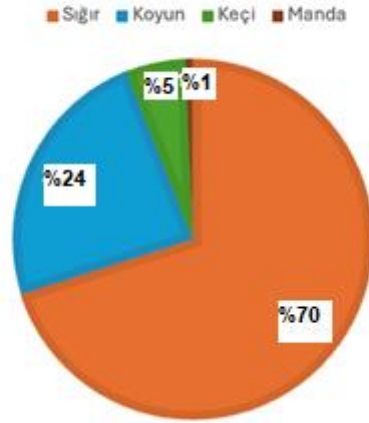
1.2. Ülkemizde ve Dünyada Hayvancılık Verileri ile Embriyo Transferinin Yeri

In vitro fertilizasyon çalışmaları Türkiye'de 1983 yılında tavşanlarda başlamış olup, ineklerde ilk embriyo transferi 1985 yılında yapılmıştır ve ilk in vitro embriyo üretimi ile sağlıklı kuzuların alınması 2002 yılında gerçekleşmiştir (Akyol vd., 2007).

Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) 2023 verilerine göre, kırmızı et üretiminin % 70,1'ini sığır eti oluşturmakta ve bunu % 23,9 ile koyun eti takip etmektedir (Şekil 1.8.).

Türkiye İstatistik Kurumu’nun 2022 ve 2023 verileri karşılaştırıldığında, sığır eti üretim miktarının %6,2 arttığı görülmüştür. Türkiye İstatistik Kurumu’nun 2024 verilerinde, ocak ve mayıs ayları arası toplanan sığır sütü miktarı yaklaşık 4.775.272 ton olarak bildirilmiştir (Çizelge 1.1.). Yine 2023 TÜİK verilerine göre, bu üretim miktarıyla ülkemizdeki toplam hayvan sayısı göz önünde bulundurulduğunda 2022 yılına göre sığır sayısında % 2,56 oranında bir azalma olduğu görülmüştür (Şekil 1.9.).

KIRMIZI ET ÜRETİMİNİN HAYVAN TÜRLERİNE GÖRE DAĞILIMI



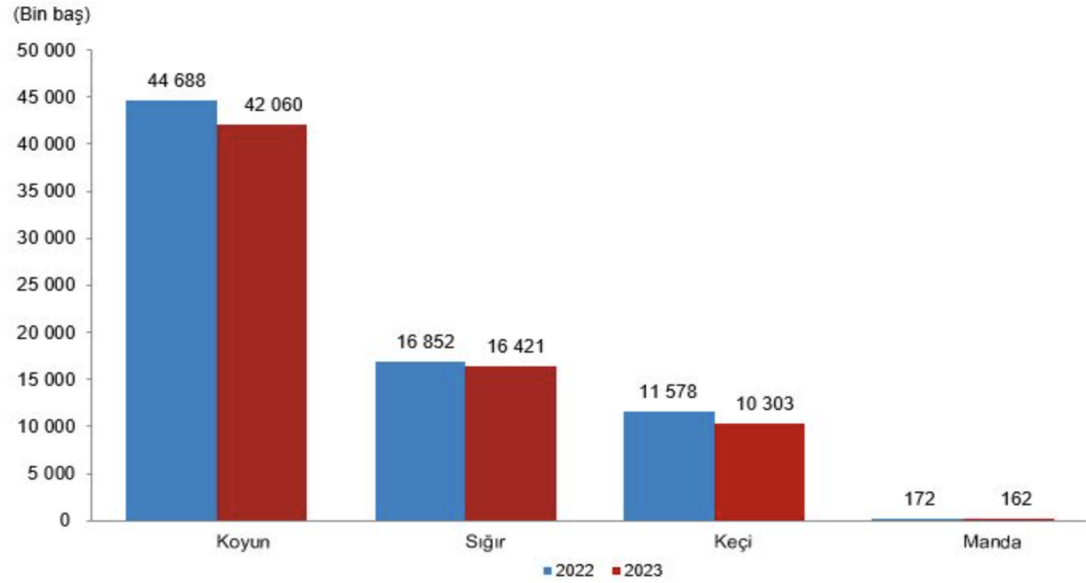
Şekil 1.8. 2023 yılı kırmızı et üretiminin hayvan türlerine göre dağılımı (TÜİK, 2023; Kırmızı Et Üretim İstatistikleri)

Çizelge 1.1. Toplanan sığır sütü ve üretilen süt ürünleri miktarı (TÜİK, 2024; Süt ve Süt Ürünleri Üretimi)

Ocak-Mayıs*			
	2023 (Ton)	2024 (Ton)	Değişim (%)
Toplanan İnek Sütü	4.403.539	4.775.272	+ 8,4
İçme Sütü	654,751	680,168	+ 3,9
Yoğurt	465,789	512,353	+ 10,0
Ayran	312,599	362,483	+ 16,0
İnek Peyniri	318,358	340,704	+ 7,0
Tereyağı	39,290	44,837	+ 14,1

* Oranlar yuvarlanmış rakamlar üzerinden hesaplanmıştır.

Hayvan sayıları, 2022-2023



Şekil 1.9. 2022-2023 yılları arası hayvan sayılarındaki değişim (TÜİK, 2023; Hayvansal Üretim İstatistikleri)

Uluslararası Embriyo Teknoloji Topluluğu'nun Türkiye'deki çalışmaların bildirilmesi ile oluşturduğu 2022 yılı verilerine göre, Türkiye'de süt ineklerinde in vivo embriyo üretiminde 139 adet normal sperma, 176 adet cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanılmış ve 2,824 adet oositten 1,791 adet transfer edilebilir embriyo üretilmiştir. Ayrıca, süt ineklerinde in vivo elde edilen embriyoların 1,128 adeti taze, 113 adeti ise yerli dondurulmuş embriyolardır. Süt ineklerinde oosit toplama işlemi (ovum pick-up, OPU) ile üretilen in vitro embriyoların 239 adeti transfer edilebilir embriyolardır. Ülkemizde süt ineklerinde mezbaha materyalinden in vitro embriyo üretiminde ise 2,478 adet oositten 837 adet transfer edilebilir embriyo üretilmiştir. Besi sığırlarında ise 555 adet oositten 195 adet transfer edilebilir in vitro embriyo üretilmiştir. Yine aynı verilere göre, 239 adet OPU ile üretilen embriyo, mezbaha materyali ile elde edilen 10 adet taze ve 61 adet donmuş embriyo transfer edilmiştir.

Brezilya toplam 440,256 transfer edilen embriyo ile in vitro embriyo üretiminde dünya genelinde 1. sırada yer almaktadır. Brezilya'yı 413,158 adet transfer edilen embriyo ile ABD 2. sırada izlemektedir. Avrupa'da ise diğer ülkelere göre 6,135 adet transfer edilen embriyo ile Hollanda ön sırada yer almaktadır (Viana, 2023). Tüm bu veriler göz önüne alındığında, özellikle Avrupa ve Amerika verileri ile ülkemizdeki veriler karşılaştırıldığında oldukça düşük seviyelerde kalmaktadır.

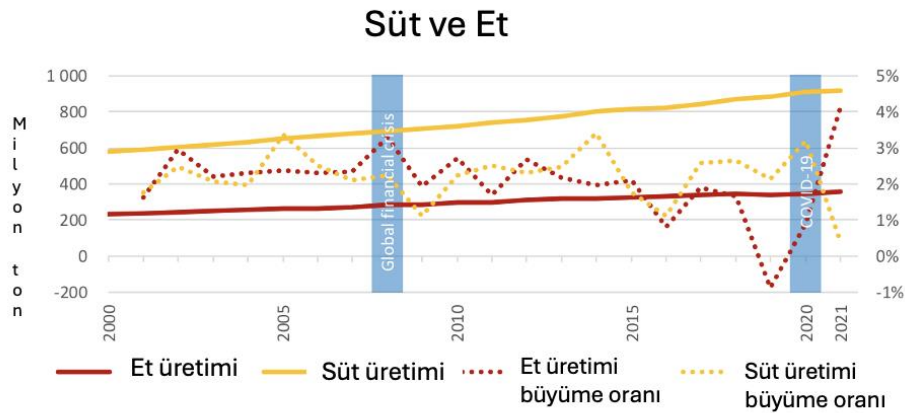
Uluslararası Embriyo Teknoloji Topluluğu'nun 2022 embriyo üretimi ve transferi ile ilgili yaptığı istatistiksel çalışmada, toplam üretilen embriyoların %95,2'sinin sığır olduğu ve 2021'e göre toplam embriyo sayısının sığırlarda %5,5 oranında arttığı görülmüştür. Yine bu

çalışmada, geçmiş yıla oranla IVD üretilen embriyolarda %2,1 ve IVP üretilen embriyolarda %6,3'lük bir artış olduğu belirtilmiştir (Viana, 2023, Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. IETS'nin 2022 yılında yayınladığı in vivo üretilen (IVD) ve in vitro üretilen (IVP) embriyoların kıtalara göre dağılımları (Viana, 2023)

BÖLGE	IVD	IVP
Afrika	2,027	7,377
Asya	1,764	14,733
Avrupa	137,036	43,749
Kuzey Amerika	204,682	842,064
Okyanusya	12,455	20,633
Güney Amerika	36,545	688,415
2022 yılı Toplam	394,509	1.616.971
2021 yılı Toplam	386,374	1.521.018
Değişim oranı	+ 2,1	+ 6,3

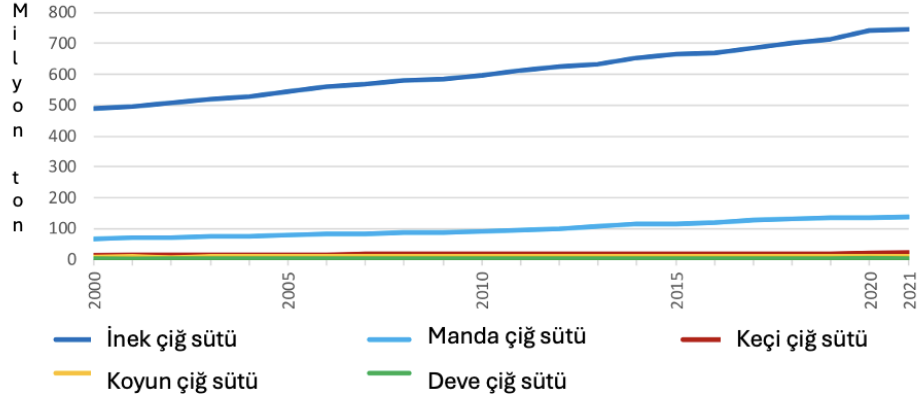
Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nın 2021 verilerine göre dünyada sığır, koyun ve keçi eti üretimi düzenli bir büyüme eğrisi göstererek sırasıyla 73.000.000, 10.000.000 ve 6.000.000 tona ulaşmıştır (Şekil 1.10.). Küresel toplamın %43'ü ile Asya et üretiminde ilk sırada yer alırken, %31 ile Amerika, %18 ile Avrupa, %6 ile Afrika ve %2 ile Okyanusya takip etmektedir.



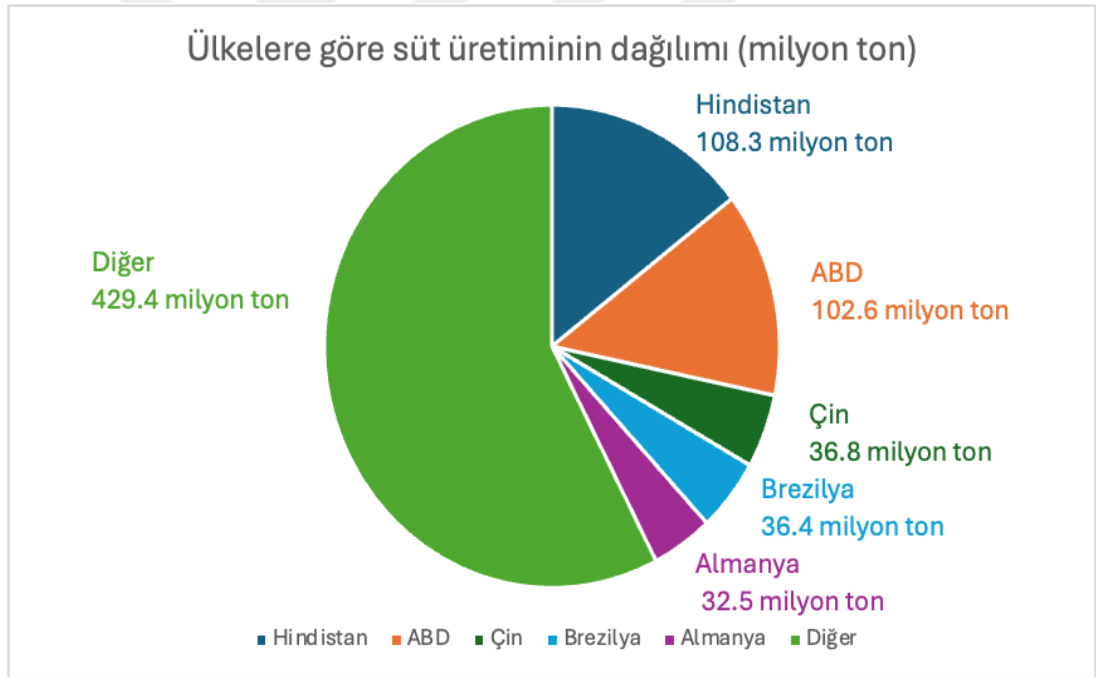
Şekil 1.10. Dünyadaki süt ve et üretimi ile büyüme oranları (FAO, 2022)

Gıda ve Tarım Örgütü 'nün 2000-2021 yılları arasındaki verilerine bakıldığında sığır çiğ sütü toplam süt üretiminin azalan da en büyük payını oluşturmaktadır. Üretim oranı 2000 yılında %84 iken 2021 yılında bu oran %81'e düşmüştür. Üretim miktarı olarak karşılaştırıldığında ise 2000 yılında üretim 489 milyon ton iken 2021 yılında 746 milyon ton olmuştur. Veriler karşılaştırıldığında sığır çiğ sütünün üretim oranının 2021 yılında düşük olmasının sebebinin manda çiğ sütündeki artıştan kaynaklandığı görülmektedir (Şekil 1.11.).

Dünyadaki en büyük üç çiğ sığır sütü üreticisi; 108 milyon ton ile Hindistan, 103 milyon ton ile ABD ve 37 milyon ton ile Çin'dir (Şekil 1.12.).



Şekil 1.11. Hayvan türlerine göre çiğ süt üretim miktarı (FAO, 2022)



Şekil 1.12. Ülkeler göre süt üretim miktarı (FAO, 2022)

Embriyo transferi dünyada 1970'li yıllarda ticari olarak uygulama alanı bulmuş ve günümüzde biyoteknoloji alanındaki yerini geliştirerek oldukça ileri seviyelere ulaşmıştır. Fakat Türkiye'de reproduktif biyoteknoloji alanında oldukça geri kalmış uygulamalardan biridir. Ülkemiz suni tohumlama uygulamasına dünyada ikinci ülke olarak başlamasına rağmen genetik ilerlemede istenilen düzeye ulaşamamış olup bunun sebebinin, suni tohumlamanın hala pek çok ilde yeterince yaygın olarak kullanılmaması ve kullanılacak

boğaların seçim kriterlerinin düzgün yapılmaması ve tabi ki hayvancılık politikaları olduğu düşünülmektedir. Suni tohumlama ile yüksek genetik özelliklere sahip boğaların bir sonraki nesile katkıda bulunması sağlanır fakat erkek genetiği bu denklemin yarısını oluşturmakta yani genetik ilerleme en fazla %50 düzeyinde kalmaktadır. Embriyo transferi yapıldığında seçilen donör sığır ve en iyi sperma ile bu genetik ilerleme daha hızlı ve %100 oranında olmaktadır (Sirard, 2018). Suni tohumlama ile genetik ilerlemenin %100 olması için en az 4-5 nesil beklemek gerekirken embriyo transferi ile bu 1 nesile düşmektedir. Ayrıca embriyo transferi ile yüksek verimli ineklerden elde edilen embriyoların düşük verimli ineklere nakli ile sürü bazında verim artırımını sağlamış olmaktadır. Fizyolojik olarak normalde ineklerden yılda bir buzağı alınırken embriyo transferi ile yüksek verim ve genetik kapasitesine sahip bir inekten bir yılda birden fazla buzağı almak mümkündür. Ayrıca, yüksek verimli fakat yaşlılık veya farklı sağlık problemleri nedeni ile kesime sevk edilen hayvanların ovaryumlarından alınan oositlerle in vitro ortamda kaliteli embriyolar üretilmektedir.

Ülkemiz hayvancılık açısından özellikle de süt sığırcılığı açısından önemli bir potansiyele sahiptir. Geçtiğimiz yıllarda kademeli olarak yem fiyatlarının artması ile kâr marjının düşmesi sonucu pek çok damızlık hayvan kesime sevk edilmiştir. Hayvansal gıda talebinin artışı azalan damızlık hayvanlar sebebiyle karşılanamaz hale gelmiş ve bunun sonucunda hayvansal ürünlerde çok ciddi fiyat artışı olmuştur ve yurtdışından damızlık düve veya besi amaçlı dana ithal edilmek zorunda kalınmıştır. Embriyo transferi ile sığır ithalatı için yapılan masrafların ciddi oranda azalması ve ülkeler arası bulaşıcı hastalıkların taşınmasının önüne geçilmesi de mümkündür. Ek olarak, nesli tükenmekte olan türlerin korunması ve bunların gen bankalarının oluşturulması için de önemli bir yöntemdir. Embriyo transferinin ülkemizde yaygınlaştırılması ile ülke ekonomisine çok ciddi katkıları olacağı düşünülmektedir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin büyük çoğunluğu embriyo üretimi verilerini IETS'ye bildirirken Türkiye'ye ait veri girişi yetersizdir. Yine TÜİK ile Tarım ve Orman Bakanlığında da bir veri girişi bulunmamaktadır. 1985 yılında ülkemizde ilk embriyo transferi İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesinde yapılmıştır. Akyol vd. (2007)'nin yaptığı çalışmada in vitro üretilmiş embriyolardan, her payette ikişer adet embriyo bulunmak üzere farklı zamanlarda beş adet taze transfer yapılmış ve ilk canlı buzağı Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'nde alınmıştır. Ülkemizde geçmiş yıllarla karşılaştırıldığında günümüzde hayvanların verim özellikleri artmış olmasına rağmen hayvan başına verim açısından değerlendirildiğinde gelişmiş ülkelere kıyasla düşük kalmaktadır. Verim özelliklerinin kısa sürede arttırılmasının çözümlerinden biri embriyo transferidir. Artan insan nüfusu, iklim değişikliği, protein üretiminin daha verimli ve sürekli hale getirilmesi konusunda artan baskılar sebebiyle sığır endüstrisinde in vitro embriyo üretiminin hızla benimsenmesi

gerekmektedir. Buna ek olarak, işletmelerde sürü yönetiminin düzgün yapılması, beslemenin ideal ve standart şekilde uygulanması, hastalıklarla mücadelenin doğru yapılması ve embriyo transferi konusunda eğitilmiş personel sayısı arttırılmadığı sürece istenilen sonucu almak pek mümkün olmayacaktır. Embriyo transferinin yaygınlaştırılmasında devlet, üniversiteler ve özel sektör ile yapılacak iş birlikleri önemli bir yer tutmaktadır. Ülkemiz için hayvancılık sektörünün gelişmesinde ve ekonominin büyümesinde bu teknoloji çok önemli bir konumdadır.

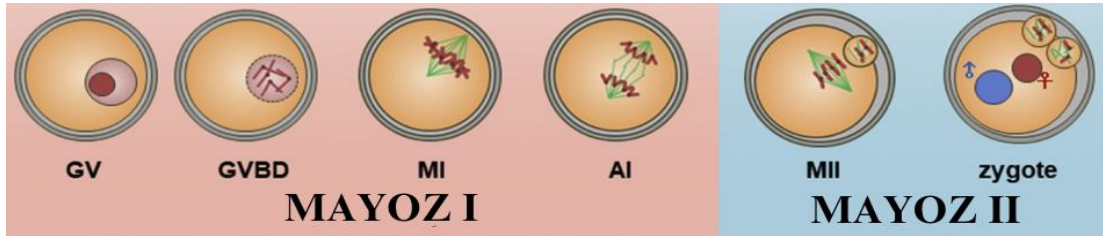
1.3. In Vitro Embriyo Üretimi

In vitro embriyo üretimi birbirini takip eden birçok süreçten oluşmaktadır. Bunlar; in vitro oosit maturasyonu (IVM), in vitro fertilizasyon (IVF) ve in vitro kültür (IVC) aşamalarını içermektedir. In vitro embriyo üretimi amacıyla uygulanan her yöntem in vivo ortamı taklit etmektedir (Galli vd., 2003).

1.3.1. Oosit Maturasyonu

Oosit maturasyonu, gelişen dişi gametteki nükleer ve sitoplazmik değişiklerin oluştuğu bir süreçtir. Bir diğer tanımı, oositlerin döllenmeye hazırlanmak için mayotik bölünmenin tekrar başladığı oogenezin son adımıdır. Sitoplazmik maturasyon, oosite spermatozoonun girmesi, aktivasyonu ve implantasyon öncesi gelişimi için oositin geçirdiği kromatin bazlı olmayan süreçtir. Hücrel organellerin yeniden düzenlenmesi, enerji ihtiyacının ayarlanması, döllenme ve embriyonik genom aktivasyonundan önce embriyonik gelişimin desteklenmesi için mesajcı ribonükleik asit (mRNA), çeşitli substratlar ve proteinlerin biriktiği yapısal değişiklikleri kapsamaktadır. Oositin mayoz bölünme geçirebilmesi için öncelik hücrel organellerin uygun şekilde dağılmasıdır (Tukur vd., 2020). Sitoplazmik organellerin oluşması ve dağılımı, sitoskeleton dinamikleri ve oositin sitoplazmik moleküler olgunlaşması olmak üzere üç aşaması mevcuttur. Mitokondri, ribozom, endoplazmik retikulum, kortikal granüller ve golgi cisimciğinin sayısı, dağılımı ve aktiviteleri embriyo gelişimi üzerinde oldukça etkilidir (Harvey, 2019). Mitokondrinin görevi, nükleer olgunlaşma sırasında germinal vezikülün parçalanması, iğ ipliklerinin organizasyonu ve kromozomların ayrılması için adenosin trifosfat (ATP) ihtiyacını karşılamaktır (Fan ve Sun, 2019). Endoplazmik retikulum, ikinci mayoz bölünmenin devamı ve tamamlanmasında, polisperminin önlenmesinde ve embriyonik genom aktivasyonu için gereken maternal mRNA'ların toplanmasında gerekli olan kalsiyum (Ca) iyonunun asıl kaynağıdır (Tukur vd., 2020). Golgi cisimciğinin görevi ise, hücre içi protein taşınmasıdır. Maturasyondan sonra golgi cisimciğinin, ribozomun ve lizozomun sayısı azalmaktadır (Fan ve Sun, 2019). Nükleer maturasyon, mayoz I'in yeniden başlaması, polar cismin atılması ve metafazın mayoz II

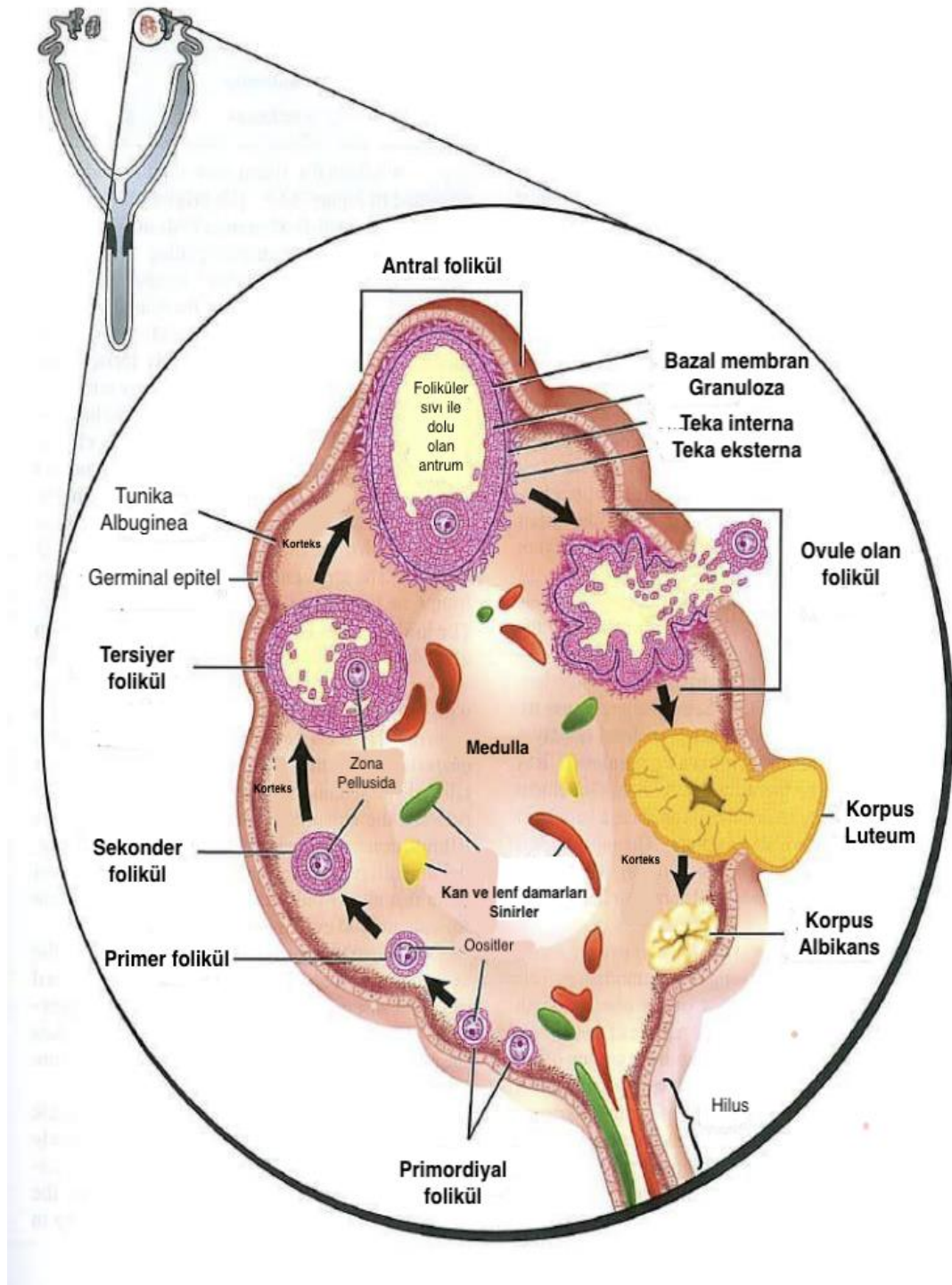
evresine gelmesi sürecini kapsar. In vivo koşullarda, nükleer maturasyon mayozun yeniden başlaması, lüteinleştirici hormon (LH) artışı sonucu ovulasyonun şekillenmesi sonrası olur. Serin/treonin protein kinaz ailesine ait olan mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ökaryot hücrelerde yaygın olarak bulunmaktadır ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz-1 ve kinaz-2 (ERK1 ve ERK2) olmak üzere iki önemli üyesi vardır. Gonadotropinle uyarılan oositin yeniden mayoz bölünmesi için granüloza ve kumulus hücrelerinde ERK1 ve ERK2 aktivasyonu şarttır. In vitro koşullarda oositte ERK1 ve ERK2 aktivasyonu olsa da mayoz bölünmenin yeniden başlaması için yeterli değildir. LH artışına bağlı olarak ERK1 ve ERK2, granüloza ve kumulus hücreleri arasında ve kumulus hücreleri ile oosit arasında siklik adenozin 3'-5' monofosfat (cAMP)'nin etkisini azaltır. Bu sayede mayozun yeniden başlaması sağlanmış olur. Kumulus hücrelerinin ekspansiyonu da yine ERK1 ve ERK2 ile ilişkilidir. Germinal vezikül parçalanması (GVBD) mayoz bölünmenin yeniden başladığını gösteren ilk morfolojik işarettir (Fan ve Sun, 2019, Şekil 1.13.). Mayoz I birinci kutup cisminin çıkarılması ile tamamlanmış olur ve döllenme olana kadar mayozun metafaz II aşamasında duraksamaya geçer. Mitojenle aktive olan protein kinaz'ın bir diğer görevi de oositin MII evresinde tutulmasıdır. Mayoz bölünme aşamasında oositte birçok maternal mRNA aktive edilmektedir. Aktive edilen bu mRNA'lardan translasyon sonucu elde edilen proteinler; iç ipliklerinin birleşmesi, MII aşamasında duraksama ve maternal-zigotik geçiş (MZT) döneminde mRNA'ların temizlenmesi gibi görevlere sahiptir. Nükleer ve sitoplazmik maturasyon farklı süreçleri içerse de birbirlerine bağımlıdırlar (Bao vd., 2023).



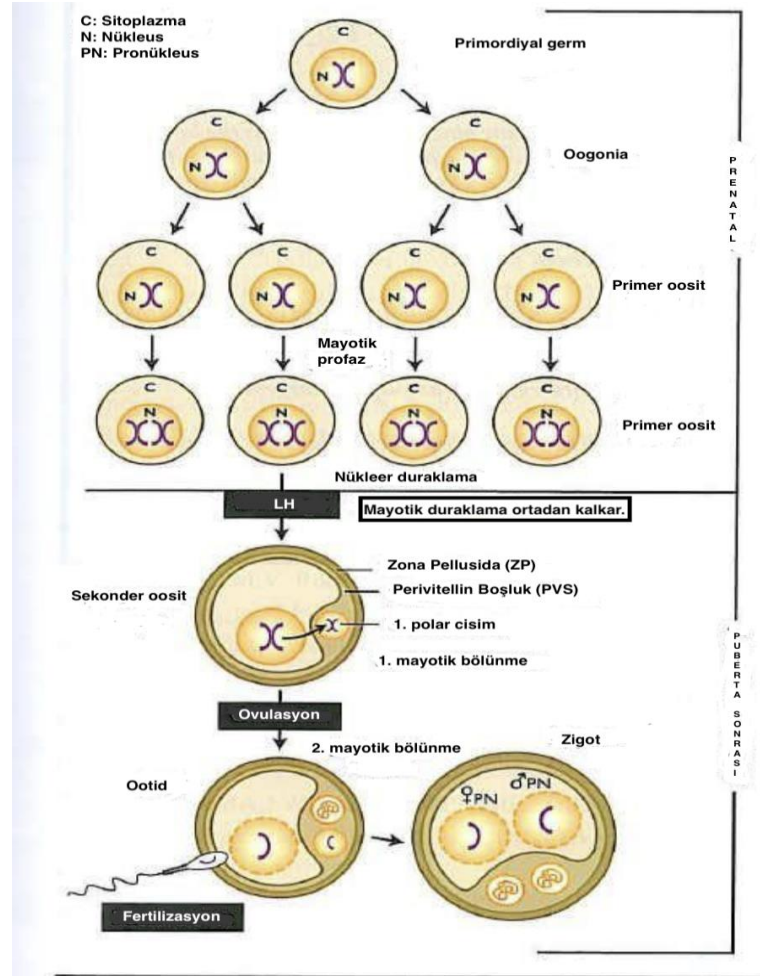
Şekil 1.13. Oositin nükleer maturasyonu (Fan ve Sun, 2019)

In vitro şartlarda, oositler ortalama 20 ila 24 saat içinde MII'ye kadar nükleer olgunlaşmayı tamamlar ve döllenmeye hazır hale gelir (Ferré vd., 2020). Yapısal olarak etrafını zona pellusida (ZP) sarmakta ve granuloza hücrelerinin birkaç katmanı kumulus oosit kompleksini (KOK) oluşturmaktadır. Corona radiata hücreleri oositin yakınında yer alarak ZP'ye penetre olur ve bu bağlantı sayesinde kumulus hücreleri ile oositin metabolik alışverişinde rol oynar. Kumulus hücrelerinin bir diğer işlevi, kültürden oosite ilettiği beslenme faktörleri sayesinde maturasyon aşamasından biri olan GVBD'ye yardımcı olur. Olgunlaşmamış foliküllerin gelişmiş foliküllere dönüştüğü ve ovulasyon için aday hale geldiği olay folikülogenezis olarak adlandırılmaktadır. Ovaryum üzerinde dört farklı folikül tipi yer

almaktadır. Ovaryum korteksinde yer alan primordiyal foliküller olgunlaşmamış ve mikroskopik boyuttur. Primordiyal folikülün biraz daha gelişmiş hali primer folikül olarak adlandırılır. Dişiler yaşam boyu yetecek kadar primordiyal ve primer folikül ile doğar ve bu primer foliküller başka primer foliküllere dönüşmek yerine daha gelişmiş sekonder foliküllere dönüşür ya da dejenere olur. Sekonder foliküller de mikroskopiktir ve diğerlerine göre iki veya daha fazla epitel katmana sahiptirler ve içinde yer alan oosit kalın bir zona pellusida ile çevrilidir. Antral folikül tersiyer folikül olarak da anılır ve antrum adı verilen bir boşluğa sahiptir. Antrum içerisinde folikül sıvısı bulunmaktadır. Gözle görülebilir boyuttur ve preovulatör hale geldiğinde Graaf folikül olarak adlandırılmaya başlar. Antral foliküller granüloza, teka interna ve teka eksterna olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır. Teka interna hücreleri LH etkisi altında androjen üretirken, granüloza hücreleri FSH reseptörlerine sahiptir ve östrojen, inhibin ve folikül sıvısı üretiminden sorumludur (Senger, 2012, Şekil 1.14.). Oosit maturasyonu, primordiyal germ hücrelerinin mitotik bölünmesi (prenatal dönem), nükleer duraklama (diktiyoten), sitoplazmik büyüme ve mayozun yeniden başlaması olmak üzere dört evrede gerçekleşmektedir ve dişilerin embriyonik gelişimi ile başlayıp yaşam boyu devam etmektedir. Prenatal dönemde primordiyal germ hücreleri (2N) mitoz sonucu diploid oosite dönüşür. Bu diploid oositler ise mayoz bölünme (mayoz I) sonucu haploid oositlere dönüşür. Bu haploid oositler mayoz bölünmenin profaz I aşamasında nükleer duraklama döneminde kalır. Pubertaya geçiş sonrası, LH dalgası ile sekonder oosit ve birinci polar cisim (PB1) oluşur ve ovulasyon şekillendikten sonra ikinci mayoz bölünme gerçekleşerek ikinci polar cisim (PB2) oluşur ve fertilizasyon sonrası erkek ve dişi pronükleuslarının da oluşması ile zigot haline gelmiş olur (Senger, 2012, Şekil 1.15.).



Şekil 1.14. Folikülogenezisin şematik gösterimi (Senger, 2012)



Şekil 1.15. Oositin olgunlaşma ve fertilizasyon süreci (Senger, 2012)

Mezbaha materyallerinden elde edilen oositler germinal vezikül (GV) aşamasındadır. In vitro maturasyonda başarılı olmanın en önemli basamağı oositlerin mayoz bölünmeyi başlatacak boyuta (110 μ m) ulaşmış olmasıdır (Telfer vd., 2020). In vitro koşullarda, oositler yaklaşık 20-24 saat içinde nükleer maturasyonu tamamlamış ve fertilizasyona hazır hale gelmiş olur (Ferré vd., 2020). Oositin in vitro maturasyonunda kumulus hücrelerinin de rolü büyüktür. Kumulus hücreleri medyumdaki metabolitleri ve besinleri oosite yönlendirerek GVBD'ı uyarır ve MII'yi başlatmaya yardımcı olur (Lonergan ve Fair, 2016). Oositlerin alındığı hayvanın fizyolojik durumu, foliküler dalga dönemi ve östrus siklusu, foliküllerin boyutu, kumulus oosit kompleksleri ile oositin morfolojik kalitesi, maturasyon süresi, kullanılan kültür ortamının ozmotik değeri ile pH değeri, yine ortamın sıcaklığı ve nemi, kullanılan kültür medyum ve bu medyuma ilave edilen hormonlar vs. in vitro maturasyona etki etmektedir.

In vitro maturasyon için ilk başlarda fetal sığır serumu (FCS) LH aktivitesi yüksek olan bir folikül stimüle edici hormon (FSH) preparatı eklenmiş Tyrode kültür ortamı

kullanılmaktaydı. Bu kültür ortamları oositin mayoz bölünmenin MII aşamasına gelerek durduğu maturasyon sürecine ulaşmasını sağlıyordu fakat bazı eksiklikler de mevcuttu. Maturasyon kültür ortamına eklenen yüksek konsantrasyondaki FSH ve LH mayoz bölünmenin ve sitoplazmik maturasyonun yeniden başlamasını sağlar ayrıca LH oositlerin ATP'yi kullanma oranını artırmaktadır (Macun ve Kaymaz, 2006).

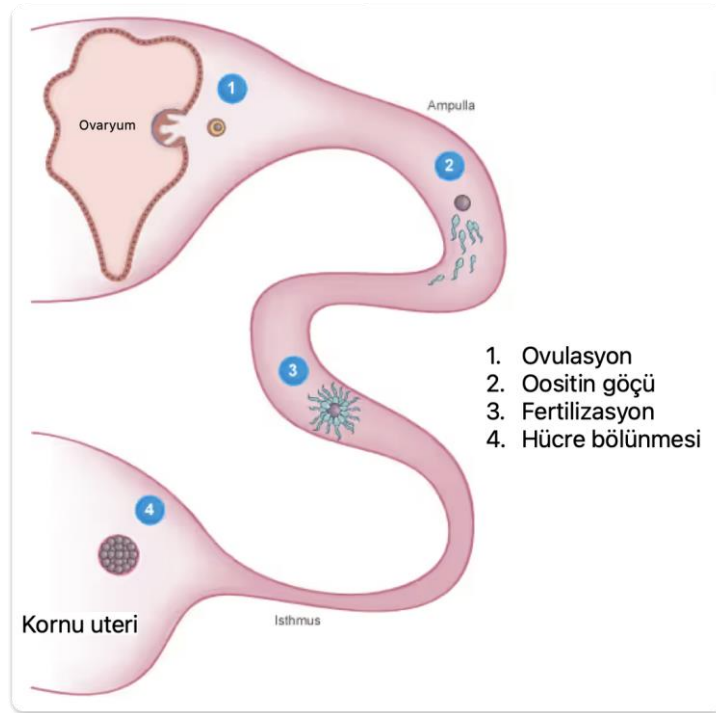
Oositte ilk in vitro maturasyon ve heparin ile muamele edilen spermle fertilizasyon 1984 yılında gerçekleşmiştir. İlerleyen süreçte yapılan çalışmalar sonucu in vitro maturasyon için TCM-199 kültür ortamı ve bu kültür ortamına eklenmiş saflaştırılmış FSH ve LH kullanılması gerektiği düşünülmüştür ve 1986'da bu kültür ortamında in vitro maturasyonu yapılan oositler fertilize edilmiş ve bir buzağı doğmuştur (Parrish, 2014). Sakaguchi ve Nagano (2020), in vitro kültür ortamına eklenen FSH'nın cAMP seviyelerini etkilediğini ve kumulus hücrelerinin ekspansiyonunu uyardığını ve bu sayede oosit olgunlaşmasını olumlu etkilediğini bulmuştur.

Defined medyumlar, TCM-199'a sığır serum albümini (BSA) veya FCS, antibiyotik, gonadotropin veya çeşitli büyüme faktörlerinin eklenmesi ile hazırlanır ve in vitro maturasyonda kullanılır. Sentetik ovidukt sıvısı (SOF) ve çeşitli ticari *undefined* (içeriği açıklanmayan) medyumlar da kullanılabilir. Eklenen FCS ve BSA ile ortamın hidrojen potansiyeli (pH) ile koloidal ozmotik düzenlenmesi sağlanır. Yine solüsyonlara eklenen bikarbonat da pH düzenlenmesini sağlamaktadır. Kültür ortamına eklenen foliküler sıvının içerdiği epidermal büyüme faktörü (EGF) kumulus hücrelerinin ekspansiyonunu uyararak maturasyonu olumlu etkileyebilmektedir. Aoki vd. (2024) ineklerin ovaryumlarından toplanan folikül sıvılarını miR-151-3p ve miR-425-5p içeriğine göre yüksek olanlar iyi, az olanlar kötü olarak derecelendirmiştir. Bu folikül sıvılarından iyi olanlarla kötü olanların maturasyon ve kültür ortamına eklenmesiyle fertilizasyon oranı, bölünme ve blastulasyon oranı karşılaştırılmış, iyi olanlarda yüksek bulunmuştur.

Kültür ortamına eklenen antioksidanların reaktif oksijen birikimini azaltarak maturasyona olumlu etkisi olduğu ortaya konmuştur (Jiang vd., 2023). In vitro yapılan işlemler canlı fizyolojisini taklit üzerine kurulduğu için ilk çalışmalardan beri ineklerin rektal sıcaklığı baz alınarak çalışma sıcaklığı da 38-39°C'de gerçekleştirilmekte ve laboratuvarın bulunduğu rakıma göre değişmekle birlikte genellikle %5 CO₂ içeren inkübatörler kullanılmaktadır (Gordon, 2003).

1.3.2. In Vitro Fertilizasyon

Fertilizasyon, ovulasyon ile atılmış ve maturasyonunu tamamlamış oosit ile spermatozoonun dişi genital kanalında oviduktun ampulla kısmında bir araya gelerek zigotu oluşturması olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.16.). Maturasyonunu tamamlamış oositlerin kapasitasyona uğrayan spermatozoonlarla in vitro koşullarda bir araya getirilerek 18-24 saat inkübe edilmesi ve zigotun oluştuğu süreç ise in vitro fertilizasyon (IVF) olarak tanımlanır. Dişi ve erkek cinsiyet hücrelerinin zigot oluşturabilmesi için her birinin haploid (n) kromozoma sahip olması gerekmektedir. Eğer birden fazla sayıda spermatozoon ooplazmaya ulaşır ise buna polispermik fertilizasyon adı verilir ve in vitro koşullarda daha sık görülmektedir.

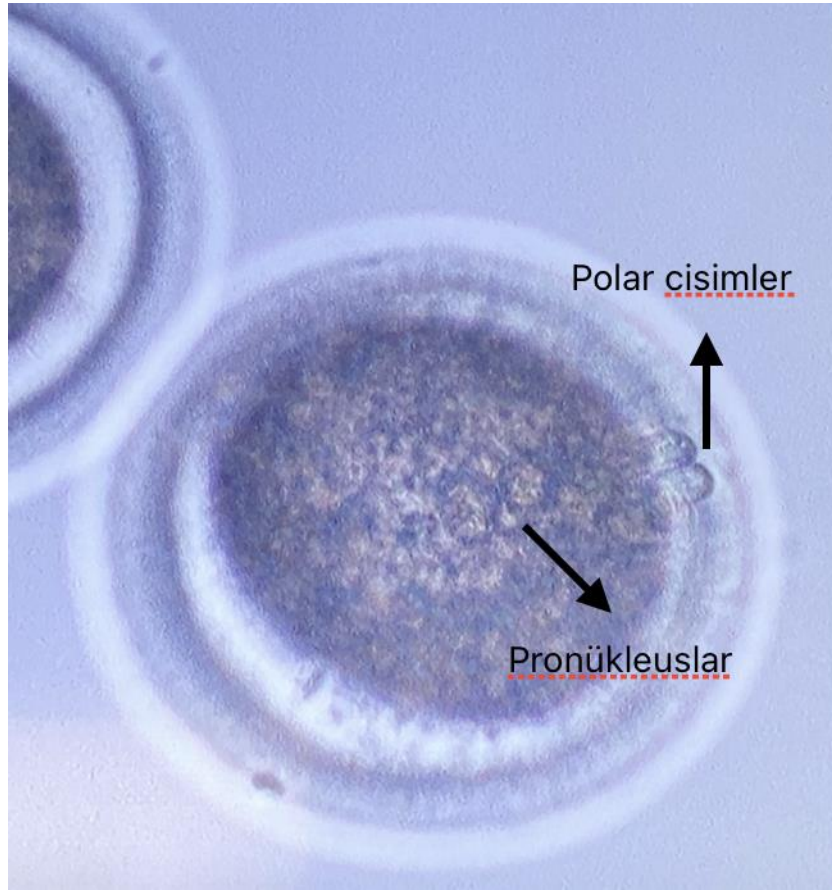


Şekil 1.16. Dişi genital kanalında fertilizasyonun şematize edilmesi
(<https://www.reproducation.com/uk/Cattle-Reproduction/The-reproductive-cycle/Fertilisation>)

Kapasitasyon, spermatozoanın ZP, kumulus hücreleri ve in vitro mature olmuş oositlerle bir araya geldiğinde maruz kaldığı maddeler ile akrozom reaksiyonunun şekillenmesini sağlayan biyokimyasal süreci kapsar. Kapasitasyon tamamlandığında, spermatozoidlerde kolesterol ve fosfolipid miktarı düşer, metabolizma, cAMP, iyon seviyeleri değişir ve kapasitasyon bitiminde hareketlilik azalır (Skinner, 2018).

Akrozom reaksiyonu ise zona pellusidaya bağlanma sırasında spermatozoa plazma membranı ile akrozom dış zarının eriyerek birleşmesi ve spermatozoanın baş kısmında

bulunan spesifik reseptörlerin aktive olması ile akrosin ve hyaluronidaz enzimlerinin aktivasyonunu kapsayan biyokimyasal süreçtir. Zona pellusida'da bulunan glikoproteinler sayesinde akrozom reaksiyonu başlar. Akrosin enzimi ile ZP, hyaluronidaz enzimi ile kumulus hücrelerini geçmesi sağlanır. ZP geçildikten sonra perivitellin boşluktan vitellus zarına yönelir ve spermatozoidin plazma zarı ile mikrovilluslar birleşir (Skinner, 2018). Daha sonra, nükleus membranı parçalanır ve erkeğe ait kromatinler vitellus zarı ile sarılır. Buna erkek pronükleusu denir. Böylece, mayozun MII evresinde duraklamış olan oosit bölünmesi tamamlanmış olur ve ikinci polar cisim (dişi pronükleusu) de dışarı atılır. Daha sonra pronükleus membranları erir, dişi ve erkeğe ait kromozomlar birleşir ve fertilizasyon tamamlanmış olur (Şekil 1.17.). Tüm bu reaksiyonlar bir kez gerçekleşmektedir, ZP geçilemez ise spermatozoid oosite giremez.



Şekil 1.17. Birinci ve ikinci polar cisim ile erkek ve dişi pronükleusların görünümü (Olympus IX73, Japan; Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

İneklerde IVF aşamasında donmuş sperma kullanılmaktadır. Bu nedenle, iyi kaliteli ve motil spermatozoonun ayrılması için *Swim-up* ya da *Percoll Gradient* gibi çeşitli teknikler kullanılabilir. *Swim up* tekniği, spermatozoonların migrasyon prensibine dayanmaktadır ve çözündürülen sperma üzerine eklenen uygun solüsyonlarla 30-60 dk %5 CO₂

ortamda inkübasyona bırakılır. İnkübasyon bitiminde motil olan spermatozoonlar solüsyon üzerine yüzerek çıkmaktadır. *Percoll Gradient* tekniğinde ise, motil spermatozoonlar farklı konsantrasyondaki solüsyonların (%90 ve %45 Percoll) kesişim yerinde birikir ve bu yöntemle en iyi motil spermatozoonlar elde edilmektedir. Fakat, bu yöntemin en büyük dezavantajı Percoll'ün spermatozoonlar üzerine toksik etkilerinin bulunmasıdır (Parrish, 2014). Boğaya ait faktörlere bağlı olsa da IVF'te genellikle minimum ml'de 1 ila 2 milyon spermatozoa konsantrasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir diğer IVF başarı kriteri ise, sıcaklık faktörüdür ve genellikle 38,5 °C'de çalışılmaktadır.

İneklerde in vitro fertilizasyon için sperm kapasitasyonunda yaygın kullanılan kültür ortamları; Bracket-Oliphant (BO), spermatozoaya modifiye edilmiş Tyrode Albümin Laktat Piruvat (sp-TALP), spermatozoaya modifiye edilmiş Tyrode Albümin Laktat Piruvat Heparin (sp-TALP-H) ve çeşitli ticari medyumlardır. Bu solüsyonlara birinci kapasitasyon ajanı olarak heparin eklenmesi ile IVF başarısı artırılmaktadır. Kapasitasyonun uyarılması için solüsyonlara ayrıca kafein, bikarbonat ve adenozin gibi maddeler eklenebilmektedir.

Ooplazma içinde spermatozoonun başının ve kuyruğunun saptanması, erkek ve dişi pronükleusları ile birinci ve ikinci polar cisimlerin ooplazmada belirlenmesi, zona pellusida veya perivitellin boşlukta spermatozoonun görülmesi, oosit aktivasyonunun görülmesi ve bölünmelerin tespit edilmesi in vitro fertilizasyonun şekillenmesinde ölçüt olarak kullanılabilmektedir (Akyol, 2005).

1.3.3. In Vitro Embriyo Kültürü

In vitro embriyo kültürü (IVC), embriyonun zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar çoğunluğunu ovidukta geçirdiği süreci taklit eder. Farklı hayvan türlerinde farklı zamanlarda tamamlanan bu süreç sığırlarda ortalama 7 günde tamamlanmaktadır. Bu nedenle in vitro fertilizasyon sonrası döllenmiş ve zigot olarak tanımlanan oositler blastosist aşamasına gelene kadar ortalama 7 gün boyunca embriyo kültür ortamına alınmaktadır. 2 hücreli morfoloji ile başlayan bölünme süreci, 2ⁿ olarak bölünmeyi sürdürür. 16 hücreli ve üzüme benzeyen yapı "morula" olarak adlandırılırken, 32 hücreli yapı "kompakt morula" olarak adlandırılır. Blastosist kavitesi ve blastosist sıvısının belirginleştiği, ICM (iç hücre kümesi) ve TE'in (trofoektoderm) ayırt edildiği evre ise "blastosist" olarak adlandırılır. İç hücre kümesi, embriyonun geliştiği kısımken, TE plasenta ve embriyonik zarların olduğu kısımdır. Hücrelerin bölünmesi ve farklılaşması ile hücre ölümü süreçleri blastosist aşamasında bir arada gerçekleşmektedir. Blastosist sıvısının miktarı arttıkça "*expanded blastosist*" adını alır ve sıvı artışı ile incelen ZP'dan çıkmakta olan embriyoya "*hatching blastosist*", ZP'den tamamen çıkan embriyoya ise "*hatched blastosist*" adı verilir.

Blastosel, blastosist evresindeki embriyolarda şekillenen içi sıvı dolu boşluğa verilen isimdir ve dinamik bir yapıya sahiptir. $Na^{+}-K^{+}$ pompası mekanizmasında sodyum iyonlarının blastosist içine taşınması ile boşluğa sıvı birikimi gerçekleşir. Trofoblast hücrelerinin blasolateral tarafında sıvı birikimi olur ve bu sıvı blastosist sıvısı olarak isimlendirilir (Hammond vd., 2016).

Embriyo 7. gün kontrol edildiğinde taze olarak transfer yapılacak ise ona uygun prosedürler uygulanır. Transfer işlemi hemen yapılmayacak ise çözündürme sonrası başarı oranının düşmemesi için yüksek kaliteli embriyolar kriyoprezervasyon işlemine alınır. Kriyoprezervasyonda yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri kullanılabilir. Kültüre alınan zigotların %20 ila %40'ı blastosist aşamasına ulaşmaktadır (Demetrio vd., 2022; Lonergan vd., 2001; Rizos vd., 2008). In vitro embriyo üretiminde başarı oranını sitoplazmik maturasyonun tam şekillenmemesi, kültür koşullarındaki eksiklik veya yetersizlik, embriyonik genom aktivasyonunun olmaması ya da DNA parçalanması, donmuş spermanın kullanılması ve sperma konsantrasyonunun yanlış ayarlanması, kültür ortamının pH'sı, inkübatör sıcaklığı ve nemi vd. gibi faktörler etkilemektedir. Kültür koşulları embriyo kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir.

Kültür medyumları olarak TCM-199, TALP, SOF gibi medyumlar ve bunlara eklenen çeşitli katkı maddeleri ile ticari olarak sunulan medyumlar kullanılmaktadır. Genellikle ineklerde in vitro kültür medyumları olarak aminoasitli *Charles Rosencrans Medium* (CR1aa), sodyum bikarbonat, esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler, L-glutamin, pirüvat, antibiyotik, vitamin, antioksidan, fruktoz veya glikoz gibi katkı maddeleri eklenerek kullanılmaktadır. Monokültür veya sıralı kültür solüsyonları kullanılabilir. Sıralı kültürde embriyonun gelişim dönemine göre değişen glikoz ihtiyacına göre solüsyon değişimi yapılırken, monokültürde ise blastosist aşamasına kadar tek bir kültürde embriyonun gelişmesi sağlanır. Monokültürde amaç, embriyonun ihtiyacı olan maddeleri kendisinin seçmesine izin vermektir. Sıralı kültürde pH ve sıcaklık değişimleri nedeniyle oluşan stres riski yüksektir (Stroebech vd., 2018).

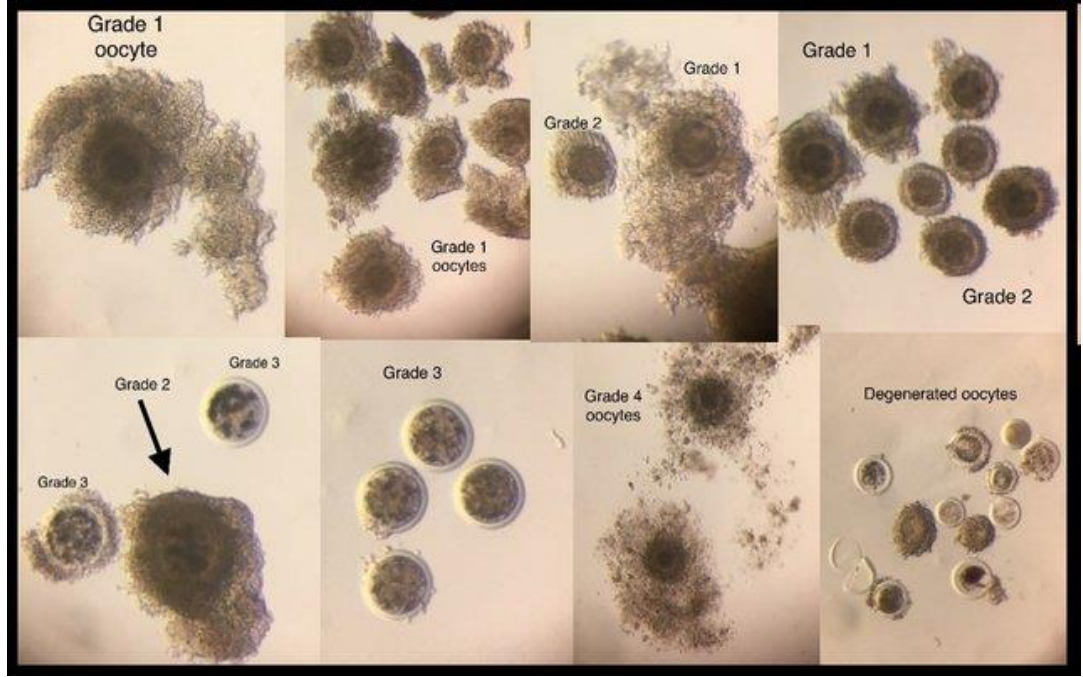
1.4. Oositlerin Değerlendirilme Kriterleri

Mezbaha materyalinde, östrus siklusunun dönemine göre ovaryum üzerinde bulunan foliküllerin ve korpus luteum (Cl) varlığına veya yokluğuna göre elde edilen oositlerin kalitesi etkilenmekte ise de in vitro embriyo üretiminin ilerleyen aşamalarına etkileri henüz netleştirilememiştir. Birçok çalışmada, dominant folikül bulunan ovaryumlardan elde edilen oositlerin kalitesi düşük bulunmuş, CL bulunan ovaryumlardan elde edilen oositlerin daha kaliteli olduğu tespit edilmiştir (Hagemann, 1999; Penitente-Filho vd., 2015; Pirestani vd.,

2011). Bazı çalışmalarda ise, ovaryum üzerinde CL varlığının ipsilateral ovaryum üzerindeki oositlerin kalitesine olumsuz etki yaptığını fakat bu olumsuz etkinin folikül büyüklüğüne bağlı olduğu belirtilmiştir (Hajarian vd., 2016; Shabankareh vd., 2015).

Yeterli ve kaliteli oosit eldesinde kullanılan bir diğer kriter folikül büyüklüğüdür ve genellikle ovaryum üzerinde bulunan 6-10 mm çapındaki foliküllerden elde edilen oositler aspire edilmektedir (Blondin ve Sirard, 1995). Alves vd. (2019) ile Iwata vd. (2004) yaptıkları çalışmada, elektrolit, lipit, glukoz, östrodiol, kolesterol, piruvat, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi maddeler foliküler sıvı miktarı fazla olan folikül mikroçevresinde daha yüksek seviyelerde bulunmuştur.

İntrinsik ve ekstrinsik faktörler KOK kalitesini etkilemektedir. Irk, yaş, reproduktif durum, hormon seviyeleri, östrus siklusunun dönemi ile beslenme ve metabolik durum intrinsik faktörler olarak etkilerken, ovaryumların mezbahadan getirilme sıcaklığı, laboratuvar ortamı, kesimden oosit toplamaya kadar geçen süre, oositlerin toplandığı yöntem ve vakum basıncı ile kullanılan solüsyonlar gibi faktörler ise ekstrinsik olarak etkilemektedir. KOK'ların morfolojik olarak değerlendirilmesinde kumulus hücrelerinin katman sayısı ve görünümü ile oositin sitoplazmik görünüşü kullanılmaktadır. Zona pellusidanın tamamını kaplayan ve üç ya da dört katman olarak görülen kumulus hücrelerine sahip, kompakt yapıda, homojen ooplazmalı ve genel KOK görünümü şeffaf yapıda olan oositler "Kategori 1 (Grade-1 / A kalite)" olarak değerlendirilir. Kumulus hücreleri zona pellusidanın 1/3'ün den daha fazlasını kaplayan, iki ya da daha az katmanlı, kompakt yapıda, homojen ooplazmalı ve genel KOK görünümü daha az şeffaf yapıda olan oositler "Kategori 2 (Grade-2 / B kalite)" olarak değerlendirilir. Kategori 2'ye göre daha az kumulus hücresi bulunan ya da hiç bulunmayan ve düzensiz ooplazmalı, koyu renkli döküntülere sahip oositler "Kategori 3 (Grade-3 / C kalite)" olarak değerlendirilir. Ekspansiyona uğramış kumulus hücreleri olan ya da hiç olmayan, jelatinimsi ağ benzeri yapıda ve düzensiz koyu renkli ooplazmaya sahip oositler "Kategori 4 (Grade-4 / D kalite)" olarak değerlendirilir (Demetrio vd., 2020, Şekil 1.18.).



Şekil 1.18. KOK'ların morfolojik kalite değerlendirmesi (Demetrio vd., 2020)

Oosit seçiminde değerlendirilen bir diğer kriter de ooplazmada bulunan lipitlerdir. Lipit damlacıkları (LD), oosit olgunlaşmasının geç evresinde ve implantasyon öncesi gelişim sırasında enerji rezervi olarak kullanılmaktadır ve bu lipitler kullanılamaz ise, yetersiz nükleer olgunlaşma ile ilişkilendirilmiştir. Ooplazmada yer alan LD sayısı oosit büyüklüğü ile doğru orantılıdır ve koyu renkli kümeler şeklinde görünmektedir (Aguila vd., 2020). Yapılan çalışmalarda, koyu renkli oositlerin blastosist aşamasında ulaşması daha yüksek bulunmuş ek olarak, spermatozoon penetrasyonunun açık renkli olanlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Jeong vd., 2009; Nagano vd., 2006).

In vitro maturasyon kültüründen sonra oosit kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer parametre ise kumulus hücrelerinin ekspansiyonu ve oosit büyüklüğüdür. Kumulus hücrelerinin ekspansiyon derecesi kategori 1 ile 3 arasında değerlendirilir. Kategori 1 az miktarda ekspansiyon ile maturasyon öncesi bazı morfolojik değişikliklere sahiptir. Kısmi ekspansiyon gözlemlenenler Kategori 2 olarak, ekspansiyonu tamamlanmış ya da az miktarda tamamlanmış ve morfolojik değişiklik bulunmayanlar Kategori 3 olarak değerlendirilmektedir. Kumulus ekspansiyonunun derecesi akrozom reaksiyonu için önemlidir (Aguila vd., 2020).

Mezbaha materyalinden elde edilen oositlerin boyutları da kalite kriteri olarak kullanılmaktadır. Buna göre yapılan çalışmalarda, oositler çaplarına göre $<100\ \mu\text{m}$, $100\text{-}110\ \mu\text{m}$, $110\text{-}120\ \mu\text{m}$ ve $>120\ \mu\text{m}$ olarak sınıflandırılmış ve $>110\ \mu\text{m}$ çaptaki oositlerde mayoz

bölünmenin MII aşamasına dönüş oranlarının (Fair vd., 1995), nükleer olgunlaşma oranlarının (Arlotto vd., 1996), bölünme ve blastosiste ulaşma oranlarının (Otoi vd., 1997) yüksek olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak optimal gelişim için 6-10 mm çaptaki foliküllerden elde edilen >110 µm çaptaki oositlerin tercih edilmesi istenilen blastosist oranlarına ulaşmak için önemlidir.

Memeli oositlerinde mayotik olgunlaşmanın bir göstergesi olarak PB1'in (I. Polar cisim) ekstrüzyonu kullanılmaktadır. Fakat, oositlerin nükleer olgunlaşmaya ait morfolojik özelliklere sahip olması ve polar cisimciğinin varlığı veya yokluğu durumu maturasyonu tamamladığını net olarak belirtmez (Holubcová vd., 2019). Sığırlarda PB morfolojisinin oosit maturasyonu üzerine etkisi ile ilgili henüz bir çalışma bulunmamasına rağmen PB1'in ekstrüzyonu IVM'den 16-18 saat sonra başlar ve sitoplazmik olgunlaşma IVM'den 24-30 sonra gerçekleşir (Nandi vd., 2002). Polar cisimlerin (PB) değerlendirilmesinde kumulus hücrelerinin varlığı bir dezavantaj oluşturmaktadır ve bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bir diğer değerlendirme kriteri ise polarize ışık mikroskobu (PLM) ile mayotik iğ ve zona pellusida çift kırılmasının (ZPB) değerlendirilmesidir. Ancak bu yöntemlerin sığır oositlerinde kullanımı diğer türlere göre lipid oranından dolayı kısıtlıdır (Aguila vd., 2020). Parlak Kresil Mavis Boyama (BCB), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz'ın (G6PDH) hücre içi aktivitesini belirlemeye yarar ve G6PDH aktivitesi oosit büyüme fazında artış göstermektedir. Bu nedenle büyüme fazını tamamlamış oositlerde G6PDH aktivitesi düşüktür. BCB+ oositler renkli sitoplazma ve düşük G6PDH'ye sahiptir. Yapılan çalışmalarda, BCB+ oositlerin gelişim yetenekleri daha yüksek bulunmuş ve daha yüksek blastosist oranları bildirilmiştir (Pujol vd., 2004). BCB yöntemi, oosit seçiminde kullanılan morfolojik değerlendirme ve diğer kriterler ile birleştirildiğinde yüksek implantasyon potansiyeline sahip embriyoların eldesi mümkün olacaktır.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar moleküler boyuta odaklanmakta ve noninvaziv yöntemler olarak çalışılmaktadır. Oosit yeterliliğinin belirlenmesinde kullanılan bu yöntemlerden biri, DNA parçalanması, anti-apoptotik (Bcl-2) ve Bax genlerinin ifade oranlarının kumulus hücrelerinde apoptozis seviyesinin belirlenmesinde kullanımıdır (Emanuelli vd., 2019). Bir diğer yöntem ise transkriptomik profilin çıkarılmasıdır. Bu yöntemde, IVM öncesi noninvaziv olarak alınan biyopsi materyali ile gen ifadesinin profili çıkarılır ve oositin embriyonik gelişimi takip edilir. Bu oositin kaderi/geleceği olarak adlandırılır. Yapılan analizler sonucunda hücre döngüsüne katılan genler, steroidogenez ile ilgili genler ve hücre büyümesi ve çoğalması ile ilgili genlerin oosit yeterliliği ile pozitif

korelasyonu olduğu, apoptozis ile ilgili genlerin ise negatif korelasyonu olduğu belirlenmiştir (Aguila vd., 2020). Walter vd. (2020) in vivo ve in vitro şartlarda kumulus hücrelerinin proteomik analizini yapmış ve bu proteinlerden steroid biyosentezi, kompleman ve pıhtılaşma basamağı ve ekstrasellüler matriks (ECM) aşamalarına katılanlar yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu proteom analizi ile oositlerin gelişim potansiyelinin değerlendirilmesi mümkün olmuştur. Bunların dışında, foliküler sıvı (FF) analizi ile ilgili çalışmalarda, sıvı içeriğinin oosit üzerine etkileri araştırılmıştır. Alves vd. (2019) yaptığı çalışmada, FF’de bulunan glukoz ve çeşitli elektrolit ve metabolitlerin miktarı ile oosit kalitesini pozitif anlamda ilişkilendirmiş ancak oosit kaderi/geleceği ile çalışma yapılmamıştır. Ayrıca, oosit tarafından salgılanan büyüme farklılaşma faktörü-9 (GDF-9) ve kemik morfogenetik proteini-15 (BMP-15) düzeyleri FF’da araştırılmış ve yüksek miktarlarının oosit kalitesi ile pozitif korelasyonu olduğu bulunmuştur (Ünal, 2017). Monniaux vd. (2010) ineklerde Anti-Müllerian Hormon (AMH) düzeyinin embriyo üretiminde ve oosit üzerinde bir belirteç olabileceğini öne sürmüştür bu nedenle AMH düzeyi oosit kalitesi ile ilişkilendirilebilmektedir. Son olarak, FF’da bulunan mikroRNA (miRNA) analizi ile miR-24, miR-10a ve miR-320a’nın folikül oluşumunu ve gelişimini destekleyen nörotrofin ile ovaryumlarda peptit hormonlarının üretimini sağlayan transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) yollarının düzenlenmesinde rol oynadıkları bulunmuştur ve oosit seçiminde kullanılabileceği düşünülmektedir (Pasquariello vd., 2020).

1.5. Embriyoların Değerlendirilme Kriterleri

In vitro embriyo üretiminde oositler genellikle mezbaha materyallerinden elde edildiği için kaliteleri karışık olarak belirtilmektedir. Dolayısıyla, oosit kalitesi, in vitro maturasyon ve in vitro fertilizasyon aşamaları in vitro embriyo üretimi ile doğrudan bağlantılıdır. Veteriner ve beşeri tıpta amaç, gelişim potansiyeli en yüksek tek bir embriyonun seçilmesidir. Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri IETS’nin (International Embryo Technology Society) yayınladığı morfolojik kriterlerdir. Bu kriterler, zona pellusidanın kalınlığı, fragmentasyon, blastomerlerin simetrisi ve bölünme oranları gibi birtakım ölçütleri içermektedir. Kültür sonrası 7-9. günlerde elde edilen embriyolar IETS kriterlerine göre 4 kategoride değerlendirilmektedir. Simetrik ve yuvarlak embriyonik kitle ile birlikte büyüklük, renk ve yoğunluk bakımından uniform blastomerleri olan ve yapısı bozulmamış ($\geq$ %85) hücresel materyale sahip olan blastosistler Kalite kodu I (çok iyi-iyi), yapısı bozulmamış $\geq$ %50 hücresel materyal ve canlı embriyonik kütle ile birlikte blastomerlerinin büyüklük, renk ve yoğunluğunda orta derecede düzensizlikler olan ve $\leq$ %25 oranında fragmentasyon gözlenen blastosistler Kalite kodu II (orta), blastomerlerinin

büyüklik, renk ve yoğunluğunda belirgin düzensizlikler olan, yapısı bozulmamış en fazla %25 hücresel materyal ve canlı embriyonik kütle içeren blastosistler Kalite kodu III (kötü), dejenere embriyolar, oositler ve gelişim zamanına göre az sayıda blastomere sahip blastosistler Kalite kodu IV (ölü veya dejenere) olarak değerlendirilmektedir (Wright, 2010). Morfolojik değerlendirme invaziv olmayan ve ucuz bir yöntemdir fakat değerlendiren kişiye göre değişebileceğinden bir başka deyişle gözleme dayalı olduğu için öznel bir değerlendirme sunar (Şekil 1.19.). İyi morfolojiye sahip embriyolarda daha sık anöploidiye rastlanmıştır (Perkel vd., 2015). Buna göre kaliteli iyi morfolojiyi kaliteli embriyo olarak değerlendirmek doğru olmayabilir. Çünkü gelişim boyunca embriyoda şekillenen genetik ve epigenetik değişimler morfolojiye yansımamaktadır.



Şekil 1.19. Sığır embriyolarında gelişim aşamaları ve kalite kodu örnekleri (Bó ve Mapleloft, 2018)

Embriyo biyopsisi, insanlarda daha sık kullanılsa da kromozomal anomalileri, tek gen defektleri ve cinsiyet tayini ile cinsiyete bağılı hastalıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Biyopsi işlemi invaziv bir yöntemdir ve embriyo gelişimi ile canlılığını tehlikeye atabilmektedir. Ek olarak uzun süren ve maliyetli bir işlem olmasıyla birlikte uygulanan yöntem ile biyopsinin yapıldığı zaman oldukça önemlidir.

Time-lapse görüntüleme ile embriyolar inkübatörden çıkarılmadan ve daha az strese maruz bırakılarak bölünme evreleri takip edilebilmektedir. Değerlendirme kriterleri, bölünme hızı, pronükleusların görünümü, ikinci polar cismin atılması, blastomer sayısı ve simetrisi, blastosist kavitesi ve sıvısının oluşması, iç hücre kümesindeki hücrelerin simetrisidir (Perkel vd., 2015). Bu yöntemle yapay zeka entegrasyonu yapılarak öznel olan değerlendirmeler nesnel hale getirilebilir. Morfokinetik parametreler embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu parametreler embriyonik gelişim sırasında oluşan kromozomal veya genom çapında meydana gelen hatalar ile ilişkilendirilmiştir (Angel-Velez vd., 2023).

Bir diğer değerlendirme kriteri ise son yıllarda çalışmaları artan metabolomik analizdir. Metabolitler, metabolik reaksiyonlara katılan hücresel işlevlerde rol oynayan doğal ve küçük yapılı moleküllerdir. Metabolomik ise, hücrelerde bulunan tüm düşük molekül ağırlıklı moleküllerin (<1000 Dalton) yani metabolitlerin ayrıntılı ve kantitatif ölçümüdür. Transkriptom ve proteom analizleri ne olacağını gösterirken metabolom analizleri embriyonun sağlık durumunu anlamak için daha uygundur (Başaran vd., 2010; Goodacre vd., 2004). Erken evre embriyoların kullandığı birincil substrat piruvat ve laktattır. Bu nedenle, piruvat biyobelirteç olarak araştırılmıştır. Oksidatif stres durumunda, piruvat su, karbondioksit ve asetat üretimi için dekarboksile olur. Bunun sonucunda artan asetat üretiminde oksidatif stres oluştuğu ve embriyonun canlılığında azalma meydana geldiği düşünülebilir (Morales vd., 1999). Khurana ve Niemann (2000) yaptığı çalışmada, erken preimplantasyon dönemindeki embriyoların gelişimi sırasında glikoliz yoluyla büyük miktarda enerji gereksinimi olduğunu ve in vitro embriyoların in vivo embriyolara göre daha fazla laktat ürettiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmaya göre embriyonun gelişimi boyunca ürettiği laktat miktarına göre canlılık için belirteç olarak kullanılması mümkündür. Folikül sıvısında bulunan amino asitlerin in vitro embriyo gelişimine etkisi olduğu bilinmektedir (Sinclair vd., 2008). Amino asitler, protein ve nükleotid sentezi, pH'nın düzenlenmesi, osmoregülasyon, beslenme ve enerji üretiminde rol almaktadır. Bu nedenle, embriyo gelişiminde etkili olan spesifik amino asitlerin profilinin çıkarılması embriyonun canlılığı ve gelişimi hakkında bilgi verebilir. Metabolitlerin tek başına değil de diğer metabolitlerle değerlendirilmesi ile daha doğru sonuçlar elde edilebilir.

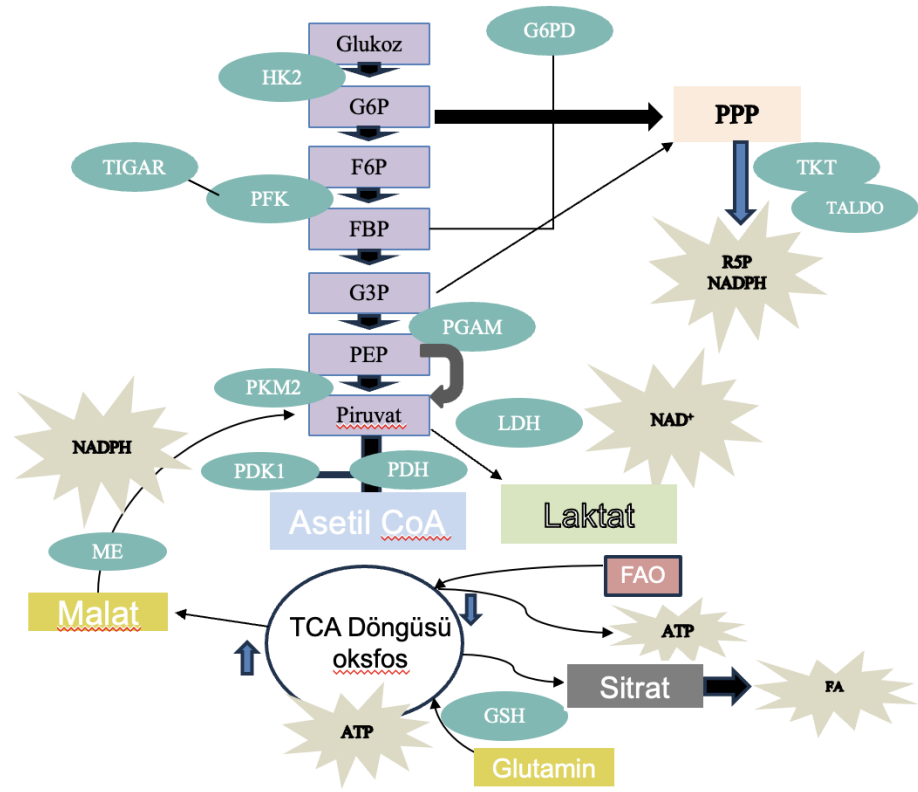
miRNA'lar çoğalma, farklılaşma, apoptozis gibi birçok biyolojik süreçte düzenleyici role sahip, transkripsiyon sonrası gen ifadesini düzenleyen kısa kodlamayan RNA'lardandır (Lu ve Rohenberg, 2018). Hücre içi etkilere sahip olmalarına rağmen, miRNA'lar hücre dışı sıvılarda tespit edilmekte ve biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. miRNA'ların biyokimyasal yapıları ve invaziv olmayan yöntem kullanılması, biyobelirteç olarak önemli bir aday haline getirmektedir. Kısa uzunlukta olmaları, pH değişimlerine karşı dirençli olması, birden fazla defa yapılan dondurma ve çözündürme döngülerinde kararlı ve dirençli bir şekilde kalmaları avantaj sağlamaktadır (Pagoni vd., 2023). Kropp vd. (2014) insan ve sığır preimplantasyon evresindeki embriyoların kültür medyumlarında miRNA varlığını ortaya koymuştur ve bu ortama salınan miRNA'ların embriyonun gen ifadelerini barındırabileceğini ve kaliteli embriyo seçiminde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüştür. Bu çalışmada ayrıca, embriyolar eklenmeden önce ortamda miRNA tespit edilmesi üzerine kültür ortamına eklenen insan serum albümini ve BSA'dan kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Rio vd. (2024), mikro droplarda ürettikleri 2 hücreli, 8 hücreli ve blastosist aşamasındaki embriyoların kullanılan kültür medyumunda miRNA analizi yapmış ve yavaş ve hızlı büyüyen embriyolarda miRNA ekspresyonlarını farklı düzeylerde bulmuştur. Bu alanda yapılacak daha fazla çalışma ile in vitro üretim aşamaları iyileştirilebileceği gibi embriyonun fizyolojisinin anlaşılması, canlılığı ve yaşayabilirliği, gebelik sonrası devamlılığın belirlenmesi ve ploidi durumunun değerlendirilmesi mümkündür.

1.6. Farklı Kültür Solüsyonlarının Kullanılması ve Embriyodaki Metabolik Değişiklikler

Embriyolar erken bölünme evresinde gelişimleri için aspartat, laktat ve piruvat kullanmaktadır bir başka deyişle piruvat oksidasyonuna bağımlıdır. Blastosist evresine ulaşmak ve gelişimini devam ettirmek için glikoz metabolizmasını kullanmaktadır. Bu nedenle morula evresinden sonra glikolize bağımlıdır (Krisher vd., 1999). Normal bir hücresel metabolizmada, glikoz glikoliz ile piruvata dönüştürülür, piruvat ise trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katılarak oksitlenir ve ATP üretilir. Embriyo metabolizmasını anlamak için çalışmalar genellikle glikoza ve ondan üretilen laktat ve piruvata odaklanmıştır. Gardner ve Leese (1990) fare embriyolarında yaptığı çalışmada laktat birikimini suboptimal kültür koşullarına embriyonun adaptasyonu ile ilişkilendirmiştir. Bunun sonucunda, “sessiz embriyo” hipotezi öne atılmıştır. Bu hipoteze göre, strese bağlı oluşabilecek hasara maruz kalmayan embriyoların daha düşük oksidatif fosforilasyon (oksfos) aktivitesine sahip olduğu ve daha az oksijen tüketir. Yani aslında erken evre embriyoların metabolizması hızla çoğalan hücrelere (tümör hücreleri gibi) benzetilmiş ve *Warburg etkisi* (WE) ile uyumlu bir

metabolizma gösterdiği savunulmuştur (Krisher ve Prather, 2012). *Warburg etkisi*, ilk olarak Warburg (1956) tarafından kanser hücrelerinin kökenini araştırırken bulunmuştur. *Warburg etkisi* ya da diğer adıyla aerobik glikoliz, kanser hücrelerindeki piruvatın TCA döngüsünden uzağa yönlendirildiği ve laktatın olduğu bir alternatif metabolizma biçimi olarak tanımlanır. Piruvatın laktata dönüşümü sırasında nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) üretimi anaerobik süreçte gerçekleşir fakat kanser hücrelerinde farklı olarak oksijen fazla olsa bile bu yol kullanılabilir. Oksfor ile ATP üretimi 38 mol üretilirken bu yol kullanıldığında 2 mol ATP üretilmektedir. Bu metabolizma yolağını kanser hücreleri dışında hızlı çoğalma yeteneği olan bütün hücreler kullanabilir. Bu yolağı kullanılırken glikoz karbon kaynağı olarak kullanılır ve TCA döngüsündeki ara metabolitler tüketilir. Bunların yenilenmesi için nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) gerekir. NADPH üretimi için ise bu sefer glikoz pentoz fosfat yoluna (PPP) girer (Şekil 1.20.). Aslında WE hızla çoğalmakta olan hücreler için seçici büyüme imkanı sağlar ve TCA ile ATP için glikoz dışında alternatif olarak kullanılabilecek yağ asitleri ve protein gibi maddelerin ortamda bulunması önem taşır (Krisher ve Prather, 2012).





Şekil 1.20. Glukoz, yağ asitleri ve glutaminin metabolik yolları (Krisher ve Prather, 2012'den uyarlanmıştır) *Yeşil yuvarlaklar; enzimler, yıldızlar; son ürün, pentoz fosfat yolağı (PPP), trikarboksilik asit döngüsü (TCA), oksidatif fosforilasyon (oksfos), yağ asidi oksidasyonu (FAO), glukoz-6-fosfat (G6P), fruktoz-6-fosfat (F6P), fruktoz bis-fosfat (FBP), glukoz-3-fosfat (G3P), fosfoenolpiruvat (PEP), nikotinamid adenin dinükleotit [fosfat](NAD[PH]), oksidatif fosforilasyon (oksfos), malik enzim (ME), piruvat dehidrojenaz kinaz (PDH), glutathione (GSH), hekzokinaz (HK), laktat dehidrojenaz (LDH), fosfoglisarat mutaz (PGAM), fosfat dehidrojenaz kinaz (PDK), fosfofruktozkinaz (PFK), transaldolaz (TALDO), TP53 glikolizis ve apoptozis düzenleyici), piruvat kinaz izoform M2 (PKM2)

Embriyo, glikoz dışında amino asitleri enerji kaynağı olarak kullanmanın yanı sıra karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde de kullanmaktadır. Amino asitler ayrıca embriyo gelişimi sırasında pH'ı tamponlama, antioksidan, şelatör, ozmolit ve blastosistin farklılaşmasında rol oynar (Gardner ve Harvey, 2015). Lane ve Gardner (1998) amino asit bulunmayan kültür ortamına aldığı fare blastosistlerinin fazla laktat ürettiğini ve anormal mekanizma gösterdiğini, ortama amino asit ve vitamin eklendiğinde ise bu stresi azalttığını ortaya koymuştur.

Yağ asitleri, hücreler arası sinyal yollarında ve hücre zarının yapısına katılan önemli moleküllerdir ve ATP üretimi için de bir kaynaktır. Kullanılan kültür medyumunda yağ asidi içermiyor ise embriyolar için ilk kaynak hücre içi lipidler olacaktır. Embriyonik genom aktivasyonunun olduğu dönemde yani morula evresinden sonra biyosentez ve hücre çoğalması artar, blastosel kavitesi belirginleşmeye başlar. Blastosist, ekstra embriyonik dokuların olduğu trofektoderm ve embriyonik dokuların şekillendiği iç hücre kümesi olmak üzere iki

tip hücre ve blastosist sıvısından oluşur. Bu iki hücre oranı türe ve gelişim evresine göre değişse de ortalama 3:1 (TE:ICM) şeklindedir. Embriyo bu dönemde ciddi bir ATP ihtiyacı ve oksijen ihtiyacı duyar. Esansiyel aminoasitler ICM farklılaşmasında görev alırken, esansiyel olmayan amino asitler ve glutamin ise blastosist sıvısının oluşumu ve hatching evresinde görev almaktadır (Pasquariello vd., 2023). Glikoz kullanımının artması ile bağlantılı olarak glutamin de alınır ve metabolize edilir (Krisher ve Prather, 2012). Trofektoderm hücrelerinde üretilen ATP, blastosist kavitesi ve sıvı birikimi için sodyum-potasyum adenoazin trifosfat (Na⁺-K⁺ ATPaz) pompası için kullanılır (Donnay ve Leese, 1999).

Kültür ortamlarının oluşturulmasında ilk yaklaşım canlı ortamını taklit etme üzerine olmuştur. Bu yaklaşımda geliştirilen kültür ortamlarından biri SOF'tur ve ilk olarak koyun oviduktal sıvısının biyokimyasal analizi elde edilmiş daha sonra farklı versiyonları geliştirilmiştir. Sentetik ovidukt sıvısının tek adımlı ve ardışık kültür versiyonları bulunmaktadır ve bunların geliştirilmesinde embriyonun erken dönem ve geç dönem ihtiyaç duyduğu besinler örnek alınmıştır. Buna göre amaç, embriyonun ihtiyacı olan besinlerin kültür süresince yenilenebilmesi ve yenilenemeyecek bir kültür ortamının yaratılması üzerine olmuştur. "Embriyonun seçmesine izin ver" stratejisi ile kültürde embriyonun hangi besinleri kullanıp hangilerini kullanmayacağını seçmesine izin verilmektedir. Böylece SOF versiyonları geliştirilirken, amino asit takviyesinin yapılması, glikozun çıkarılması, sitratın eklenmesi, kültürün ilk 72 saatinde etilendiamintetraasetik asit (EDTA) eklenmesi gibi yaklaşımlar denenmiştir. Bu denemelerin sonucunda CR1aa'nın formülasyonu oluşmaya başlamıştır. Rosenkrans Jr. ve First (1994) CR1aa'ya Bazal Medyum Eagle (BME) ve Minimum Esansiyel Medyum (MEM) eklendiğinde sığır embriyolarının gelişim ve bölünme oranlarının yüksek olduğunu bulmuştur. Potasyum simplex optimize edilmiş medyum ise ilk olarak fare embriyolarındaki embriyo gelişiminin durmasını engellemek için geliştirilmiş ve daha sonra inekler için optimize edilmiştir (Krisher ve Herrick, 2024). CR1aa ve KSOM tek adımlı bir kültür ortamı iken, SOF ardışık sistemli bir ortamdır ve her kültür ortamının avantaj ve dezavantajı mevcuttur bu nedenle de hala tartışmalar devam etmektedir.

Sığır embriyoları için ilk embriyo kültürü olarak farklı somatik hücre kültürü ortamları kullanılmıştır. Goto vd. (1992) birinci grup olarak, sığır granüloza hücresi, ovidukt hücresi ya da uterus hücresi tek katmanlı kullanarak 4-8 hücreli embriyoların blastosiste gelişim oranlarını sırasıyla %26,9, %37,5, %39,2 olarak bulmuş; ikinci grup olarak ise, granüloza hücresi ile birlikte, 10 günlük tavuk embriyosuna ait deri hücresi, 10 günlük fareye ait testis hücresi ve 10 günlük tavuk embriyosuna ait karaciğer hücresi tek katmanlı kullanmış ve blastosist olma oranını sırasıyla %53,3, %42,9, %49,3 ve %44,3 olarak bulmuştur. Krisher vd. (1999) yaptığı

çalışmada, BSA eklemenin etkilerine bakmış ve kültürün son evresinde BSA eklenmeden kültüre alınan embriyolar daha düşük gelişim göstermiş, ilk aşamada BSA eklenmeyenler sürekli BSA içeren kültür ortamında gelişenler kadar iyi gelişim göstermiştir. Bu çalışmaya göre, erken evre embriyoların bölünme aşamasında proteine ihtiyaç duymadığı, moruladan sonra protein eksikliğinde gelişimlerinin yetersiz olduğu ortaya çıkmıştır. Kültür ortamına BSA'nın eklenmesi ile embriyo gelişimine etki eden stres faktörleri tamponlanabilmekte fakat kriyoprezervasyona duyarlılık ve implantasyonda azalma gibi etkileri de bulunmaktadır (Amaral vd., 2022). Dos Santos vd. (2021) embriyonun ihtiyacına uygun olarak geliştirdiği kültür ortamı (ECS100), besin maddelerinin azaltıldığı (ECS50) kültür ortamı ve SOF kültür ortamındaki blastosist gelişimini karşılaştırmış ve benzer bulmuştur. Herrick vd. (2020) benzer bir çalışma ile azalan besin konsantrasyonlarındaki gelişimi karşılaştırmış ve besin konsantrasyonları %6.25'e düşene kadar blastosist oluşumu ve hatching devam etmiştir. Bu çalışmalar ile, azaltılmış besin içeren kültür ortamının blastosist gelişimini etkilemediği hatta iyileştirdiği ve aslında in vitro sığır blastosistlerinin gelişim için zengin besin içeren bir ortama ihtiyaç duymadığı öne sürülmüştür. Günümüzde en sık kullanılan kültür ortamları; SOF, CR1aa, potasyum simplex optimize edilmiş medyum (KSOM) ve ticari medyumlar (Stroebech vd., 2018) kullanılmaktadır. Kültür ortamının seçiminde genellikle laboratuvarın kendi işleyişi ve maliyet ön planda tutulmaktadır. Ayrıca, ineklerde in vitro embriyo üretiminde kullanılan kültür medyumlarının yalnızca blastosist evresine getirmesi değil blastosistlerin kalitesi, canlılığı ve alıcıya transferi sonrasındaki gebelik ve canlı yavru doğum oranları da seçim için önemli bir kriterdir.

Kültür ortamına eklenen BSA ve amino asitler blastosist oranını etkilemez fakat kriyotolerans üzerine olumlu etkisi vardır (Mucci vd., 2006). Farklı in vitro kültür koşullarında gen ekspresyonları farklı bulunmuştur. Rizos vd. (2003) kültür koşullarına eklenen serum nedeniyle mn-SOD, SOX, Bax, LIF ve LIF-Rb ekspresyonlarında artış olduğunu, Cx43 ile INT- t'de ise azalma olduğunu kanıtlamıştır. Başka bir çalışma ise kültür ortamına eklenen serumun veya BSA'nın HSP70.1, Cu/ZN-SOD, Glut-3, bFGF ve IGFI-R'nin ekspresyonlarında artış olduğunu ve bu artışın buzağılarda doğum ağırlığını artırarak "Büyük yavru sendromu" (LOS)'na neden olduğunu bulmuştur (Lazzari vd., 2002). Erkek embriyolar dişilere göre daha hızlı gelişim göstermektedir. Bu nedenle, kültür ortamına eklenen glikozun embriyonun cinsiyeti üzerine etkisi olabileceği ve erkek embriyoların gelişimini hızlandırabileceği öne sürülmüştür (Rizos vd., 2008).

Embriyoların manipülasyonu sırasında karşılaştığı sıcaklık ve pH değişimleri, kültür ortamında biriken metabolik ürünler, kültür ortamının yanlış konsantrasyonda hazırlanması ve

atmosferik oksijen konsantrasyonlarının düzeyi embriyonun in vitro karşılaştığı stres faktörlerindendir. Bu streslere maruz kalan embriyonun metabolik yanıtları etkilenir ve adaptif yanıtlara ya da embriyonik canlılık kaybına neden olur.

Embriyoların gelişimi üzerine etki eden en kritik faktörlerden birisi de inkübatör içerisindeki oksijen miktarıdır. Thompson vd. (1990) oksijen konsantrasyonunun sığır ve koyun embriyoları üzerine etkisini araştırmış ve normal atmosferik seviyeye (%20) göre inkübatörde azaltılmış oksijen konsantrasyonunun (<%10) embriyo gelişimine olumlu etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca inkübatörler içerisine yerleştirilmiş olan time-lapse kameralar ile embriyoların morfolojik değerlendirilmesi, bölünmelerinin takibi vs. mümkün hale gelmiştir (Ferré vd., 2020).

1.7. Embriyonik Genom Aktivasyonu

Embriyonik genom aktivasyonu aslında MZT adı verilen süreçte başlamaktadır. Maternal transkriptlerin seçici olarak bozulması, oositin mayoz bölünmeden blastomerlerin mitoz bölünme evresine geçişi gibi süreçleri kapsar. Bu bozulan maternal transkriptler aslında zigotik genomun transkripsiyonel aktivasyonu için ilk basamaktır (Yu vd., 2016). DNA replikasyonunun olmadığı durumlarda epigenetik mekanizmalara dahil olan histon modifikasyonları ve histon değişimleri oogeneze sırasında genlerin ifadelerini düzenler ve bu sayede zigotik genomu fertilizasyon sonrası transkripsiyonel aktivasyona hazırlar (LaVoie, 2005). Polycomb grubu proteinler, embriyonik gelişim sırasında seçili bazı genlerin transkripsiyonel susturulmasında görevlidir. Memelilerde polycomb resesif kompleks 1 ve 2 (PRC1 ve PRC2) olmak üzere iki ana kompleksi vardır. Bu PRC'ler oositlerde ifade edilmekte ve embriyoya maternal olarak aktarılmaktadır. PRC1'in alt birimlerinden olan RING1 ve RNF2 uygun zigotik genom aktivasyonu (ZGA) için görev yapar. PRC2'nin bir üyesi olan EZH2 ise kromozomların düzenlenmesinde rol oynar ve yeterli miktarda ifade edilemez ise anöploidiye sebep olur (Vidal, 2009).

Trofektoderm, ilkel endoderm (PE) ve epiblast (EPI) olmak üzere üç farklı hücre tipiyle sonuçlanan geç blastosist evresine kadar olan süreçte embriyolar ardışık iki farklı soy ayrımı geçirmektedir. Erken soy ayrımı, dış hücrelerin iç hücrelerden ayrılıp TE'ye farklılaştığı morula aşamasında gerçekleşir. İkinci soy ayrımı, ICM blastosist aşamasında PE ve EPI'ye farklılaştığında gerçekleşir (Wei vd., 2017).

Preimplantasyon evresinde, embriyo hücreleri trofektoderm veya pluripotent iç hücre kümesine farklılaşmaktadır ve bu bazı transkripsiyon faktörlerinin ifadesiyle belirlenmektedir. Erken soy ayrımı, hücre kaderinin belirlenmesi ve spesifik transkripsiyon faktörlerinin

ifadesindeki değişiklikleri kapsar. İlk soy ayrımı, morula evresinden blastosiste geçişte, ikinci soy ayrımı ise *hatching* evresi civarında başlar. Trofektoderm belirteci olarak, CDX2, Gata bağlayıcı protein 3 (GATA3) ve TEA alanı aile üyesi 4 (TEAD4) tanımlanmıştır. İç hücre kümesi için ise, POU alanı sınıf 5 transkripsiyon faktörü 1 (POU5F1), homeobox transkripsiyon faktörü Nanog (NANOG) ve SRY (cinsiyet belirleme bölgesi Y)-box2 (SOX-2) tanımlanmıştır. İneklerde diğer hayvanlardan farklı olarak POU5F1 hem TE hem de ICM'de eksprese edilir. Bu nedenle, erken soy ayrımındaki fark türler arasında farklıdır. İkinci soy birleşiminde ise NANOG pluripotensinin sürdürülmesinde ve belirlenmesinde belirteç olarak kullanılabilmektedir (Ming vd., 2021; Ortega vd., 2020). Goossens vd. (2013) miR-218'in NANOG ifadesini düzenlediğini, ayrıca *kadherin 2* (CDH2) ile etkileşimi olduğunu bulmuştur.

Totipotensi (hücrenin farklılaşabilme yeteneği), bir embriyonik hücrenin normal ve fertil bir bireye dönüşme yeteneği ile karakterize, nadir ve geçici bir özelliktir. Döllenme, oldukça farklılaşmış iki hücrenin haploid genomlarını, gametleri oosit sitoplazmasında bir araya getirir (). Döllenmiş embriyonun ilk işlevlerinden biri, yeni oluşan embriyonik genomu totipotent bir duruma yeniden programlamaktır. Totipotensi sadece memelilerde fertilize olmuş oositler ve erken dönem embriyolar tarafından sergilenir, birkaç hücre döngüsüne yayılır ve blastosist aşamasında ise zaten kaybolur. Bu tür bir yeniden programlama, nükleer-sitoplazmik etkileşimleri koordine eden genomun kapsamlı epigenetik değişikliklerine dayanır. Fertilizasyon sırasında gametik genomlar başlangıçta transkripsiyonel olarak sessizdir; gen yeniden programlaması bu nedenle embriyonik genom transkripsiyonel aktivasyonu ile eşzamanlıdır (Aguila vd., 2022).

Erken embriyonik genom yeniden programlamaya olan ilgi, memeli oosit sitoplazmasının sadece gametik genomları değil, aynı zamanda somatik hücre genomlarını da daha düşük bir verimlilikle yeniden programlayabildiğinin farkına varılmasıyla önemli ölçüde artmıştır. Oosit sitoplazmik içeriğinin hem genetik değişiklikleri hem de esas olarak farelere ve ineklere uygulanan nükleer transfer deneyleri, oositin bu benzersiz özelliğini anlamak için yeni yaklaşımlar sağlamıştır. Preimplantasyon dönemdeki gelişim süreci, ciddi bir şekilde düzenlenmiş bir gen ekspresyon programının başlaması ile yeni oluşan embriyonik genomun kapsamlı epigenetik modifikasyonlarıyla karakterizedir. Bu program, fonksiyonel implantasyon yetkin bir blastosist oluşumuna yönelik olsa da ilk adımlarındaki değişiklikler bu aşamanın çok ötesinde embriyo gelişimini etkiler (Kravchenko ve Tachibana, 2024).

Erken embriyonik gelişim, oogenez sırasında üretilen ve depolanan maternal transkriptler ve proteinler tarafından kontrol edilir. Fertilizasyondan sonra erkek genomunun

işlenmesi, maternal RNA ve proteinlerin parçalanması ve embriyonik genomun aktivasyonu gerçekleşir (Graf vd., 2014). Fertilizasyonda, paternal (sperm) DNA aktif olarak demetile edilirken dişi (oosit) DNA'sı pasif demetilasyona uğrar ve yeni bir CpG metilasyon dalgası öncesinde türe özgü zamanlaması olan embriyonik genomun tamamını etkiler (Santos vd., 2002). Genom çapında demetilasyondan remetilasyona bu geçiş, transkripsiyonel aktivitenin ana başlangıcı ile ilişkilidir (Niemann ve Wrenzycki, 2000). Birinci hücre bölünmesinin zamanlaması, embriyonik genomun aktivasyonu, kompaktlaşma, blastosist oluşumu, ekspansiyon ve hatching gibi erken gelişimin kritik aşamaları, kısmen DNA metilasyonundaki değişiklikleri yansıtan gen ekspresyonundaki iyi düzenlenmiş değişikliklere bağlıdır (Rajam vd., 2022).

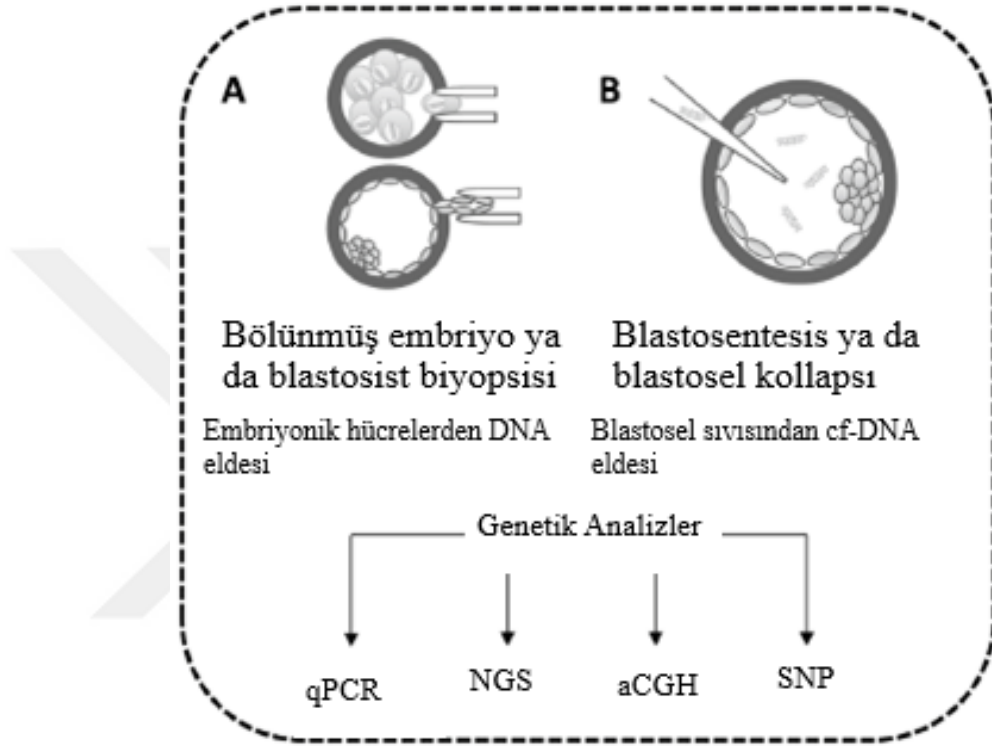
1.8. Preimplantasyon Genetik Test

Terim olarak önceden kullanılan preimplantasyon genetik tanı (PGD) ve preimplantasyon genetik tarama (PGS)'nin yerine preimplantasyon genetik test (PGT) terimi kullanılmaya başlamıştır. Anöploidi için preimplantasyon genetik testi (PGT-A), embriyoların kromozomal tamamlayıcısını tanımlamayı amaçlayan bir yöntemdir. Daha sonra uterusu transfer için öncelik verilecek öploid embriyoları tanımlamak için PGT-A'nın kullanımı, önemli tartışma ve anlaşmazlık konusu olmuştur. Yardımcı Üreme Teknolojilerini İzleme Uluslararası Komitesi (ICMART) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) monogenik durumlar için PGT-M, yapısal yeniden düzenlemeler için PGT-SR ve anöploidiler için PGT-A terimlerinin uygun olduğunu ortaya koymuştur (Ding vd., 2022).

Preimplantasyon genetik test, oositlerde (polar cisim) ya da embriyolarda (bölünme aşaması veya blastosist) biyopsi ile alınan hücrelerin DNA analizinin yapılması ve genetik abnormalliklerin tanısında kullanılan bir testtir. Ayrıca anöploidi tanısı için, monogenik ya da tek gen defektlerinin tanısı için ve kromozomal yapıların yeniden düzenlenmesi için kullanılmaktadır. Test, 1990'larda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kökenli cinsiyet belirlenmesi ve monogenik hastalıkların tespiti amacıyla deneysel olarak kullanılmıştır. Geleneksel PCR ile tek veya birden fazla genetik bozukluğu tespit etmek mümkündür. Biyopsi örneklerinden elde edilen DNA miktarı çok az olduğu için öncelikle tüm genom amplifikasyonu (WGA) ile tüm genom kopyalanarak nanogram olarak DNA mikrogram düzeyine çıkarılır ve bu DNA ile PCR ya da PGT yapılır. Süreç, embriyo biyopsisinin yapılması, biyopsi örneklerine tüm genom amplifikasyonu yapılması, genetik belirteç olarak kullanılan SNP dizilerinin belirlenmesi gibi DNA'nın genetik analizleri ve bu analiz sonuçlarına biyoinformatik analizin yapılması, son olarak embriyonun transfer edilip edilmeyeceğine karar verilmesi şeklinde ilerlemektedir (Şekil 1.21.). Preimplantasyon genetik

test, ister kromozom dengesi taraması isterse spesifik gen(ler)in analizi olsun, test edilecek embriyoyu temsil eden bir DNA örneğini gerektirir. Şu anda PGT, IVF ile oluşturulan embriyolardan DNA elde etmek için invaziv yaklaşımlara dayanmaktadır (Brouillet vd., 2020).

İnvaziv PGT



Şekil 1.21. Biyopsi ve blastosist sıvısından yapılan genetik analizler (qPCR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu, NGS: Sonraki Nesil Dizileme, aCGH: Komparatif genomik hibridizasyon, SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi, Brouillet vd., 2020)

Mikrodizi, plastik veya cam yüzey şeklindeki çiplere bağlanmış binlerce veya milyonlarca bilinen kısa DNA dizileridir. Beşeri ve veteriner tıpta mikrodiziler, aCGH ve SNP yöntemleri PGT için kullanılmaktadır (Griffin ve Ogur, 2023).

Kromozomal dengesizliklerin tespiti ve biyopsiden elde edilen DNA ile kontrol örneğine ait DNA'nın karşılaştırılması ve ploidi durumunun belirlenmesi için CGH yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde biyopsiden elde edilen DNA kırmızı floresan boya ile referans olarak kullanılan kontrol DNA'sı ise yeşil floresan boya ile etiketlenir. Mikrodizi analizi sonrası biyopsideki DNA doğru miktarda ise sarı renkli, delesyon veya çoğaltma var ise yeşil ya da kırmızı renkli olarak belirlenir. Genomda bulunan tek bir nükleotidin (Adenin, Guanin,

Timin veya Sitozin) varyasyonu SNP olarak tanımlanır ve bir fenotipi belirleyen her genotipin SNP kümesi vardır. Bu yöntemde embriyonik DNA çipler üzerinde bilinen SNP'ler ile hibritlenir ve fenotiplerle ilişkisi bilinen SNP çipleri ile karşılaştırılarak embriyonun fenotipi belirlenir. Bu yöntem ile, ineklerde et ve süt üretiminde etkili olan bölgeler belirlenerek istenen fenotipi gösterecek embriyolar seçilmiş olur (Herrera, 2016).

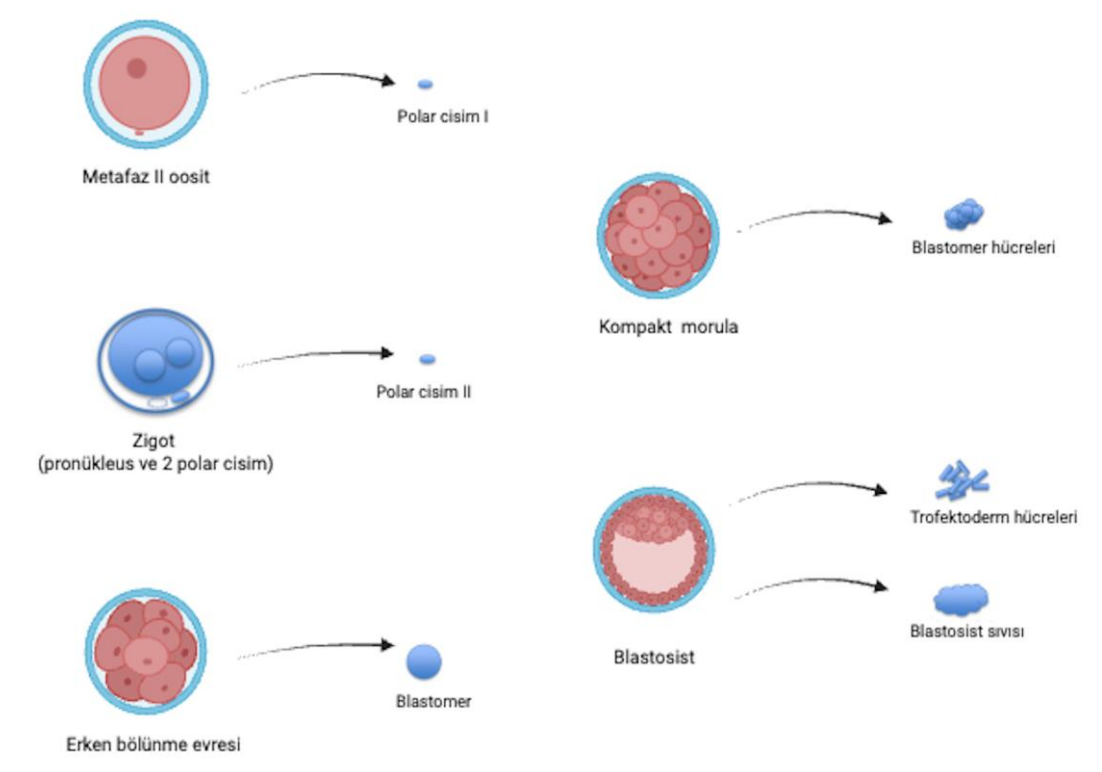
Preimplantasyon aşamasına gelmiş embriyo çalışmalarında insanlardan sonra en çok çalışılan memeli türü sığırdır. Bunun en büyük nedeni, artan insan nüfusu ile et ve süt ürünlerine olan talebin pozitif korelasyonudur. İnsanlarda PGT, embriyodaki genetik bozuklukları belirlemek için, ineklerde ise istenen fenotipe sahip yavruların seçilmesine odaklanmıştır. Hayvanların genomik tahmini üreme değerleri (GEBV) doğumdan sonra belirlenmektedir fakat bunun embriyo aşamasında yapılması ile nesil sürelerinin kısaltılması ve seçim yoğunluğunu artırmak mümkün olacaktır. Embriyo kalitesi ve kullanılan kültür sistemlerine bağlı olarak IVP üretilen embriyoların transfer sonrası canlı doğum oranı yaklaşık %50 oranındadır (Hansen, 2020). Oliveira vd. (2023a) Gir ırkı süt ineklerinde embriyo biyopsisi ve canlı doğumlar arasındaki süt verimi (305MY) için GEBV değerleri arasındaki uyumu ve doğruluğunu araştırmışlar ve aynı çiftlikten elde edilen embriyolarda GEBV 305MY'de 800 kg'a varan farklılıklar olduğunu bulmuşlardır. Griffin vd. (2019) preimplantasyon sığır embriyolarına trofektoderm biyopsisi ile karyomapping yapmış ve embriyoların %68,8'inde öploidi, %2,10 trizomi, %0,31 monozomi tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda 4 canlı doğum ve SNP tiplmesi ile anöploid taraması arasında uyum bildirilmiştir. Bu çalışma, sığır yetiştiriciliğinde mayoz ve anöploidiyi anlamada ilk adım olmuştur. Daha sonra SNP analizleri ile, ineklerde kromozomal anormalliklerin %14,1 'i (Silvestri vd., 2021), %5 'i (Bouwman ve Mullaart, 2023) tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca Silvestri vd. (2021) transfer sonrası gebelik şansının anöploid ve öploid durumuna göre değiştiğini ve sırasıyla %59,6 ile %5,8 olduğunu bulmuştur. Angel-Velez vd. (2023) ilk defa vitrifiye edilmiş sığır oositlerinden üretilen embriyolarda morfokinetik analiz yapmış ve anöploidinin embriyoların morfokinetiğine yansıdığını ve bu sonuçların bireysel transfer kararları için kullanılabileceğini bulmuştur.

1.9. Embriyo Biyopsisi

Embriyo biyopsisi, tek yumurta ikizleri elde etmek için embriyo bölme işleminden geliştirilmiştir (Bredbacka, 1995). Embriyo bölme işlemi, bir embriyonun 2, 4 veya 8 hücreli aşamalara bölünmesi için in vitro ikiz veya çoklu embriyoların oluşumudur ve özdeş ikizler yaratma süreci ile aynıdır (Betteridge, 2003). Bu işlemin pek çok avantajı vardır. İlki, ovaryum rezervleri yetersiz olduğunda ya da oosit kalitesi düşük olduğunda uterusu transfer etmek için

yeterli embriyo eldesinde kullanmaktır. İkinci avantajı, bir embriyo bölünerek ikiz oluşturulur ve birisi implantasyon öncesi genetik tanıda kullanılır, diğeri ise kültüre alınarak implantasyona uygun hale getirilir. Üçüncü avantajı, embriyo gelişiminin en erkeninde gen tedavisi ile genetik hastalıkların tedavisinde kullanılmasıdır. Dördüncü avantajı ise, nakil için doku ve organların in vitro üretilmesinde kullanılabilir (Rahbaran vd., 2021). Embriyo biyopsisine ilgi daha sonra artarak, transferden önce cinsiyetin belirlenmesi için kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde ise biyopsi, genetik bozuklukların ve GEBV'nin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Oliveira vd., 2023a).

Başarılı bir PGT için ilk basamak doğru biyopsi yönteminin kullanılmasıdır. Oosit ve embriyo biyopsi işleminin doğru yapılabilmesi için ise bu konuda eğitimli bir personel ve özel ekipmanlar gerekir. Biyopside amaç, yeterli DNA elde etmek ve embriyonun yaşayabilirliğini etkilememektir. Biyopsi; oosit, erken bölünme evresindeki embriyo, morula ve blastosist evresinde yapılabilir. Oosit ve zigottan birinci ve/veya ikinci polar cismin çıkarılması, erken bölünme evresinde tek bir blastomer hücresinin çıkarılması, morula evresinde blastomerlerin çıkarılması ve blastosist evresinde TE hücrelerinin çıkarılması veya blastosist sıvısının aspirasyonu olmak üzere farklı yöntemlerle biyopsi işlemi gerçekleştirilmektedir (Palini vd., 2013; Xu ve Montag, 2012, Şekil 1.22.).



Şekil 1.22. Biyopsi yöntemleri (Palini vd., 2013; Xu ve Montag, 2012, BioRender’da yapılmıştır)

Biyopsi işlemi için laboratuvar altyapısı ve eğitimli kişilerin çalışması önemlidir. Biyopsi işleminin yapılacağı oda hava kalitesi, pozitif basınç, laboratuvar erişimi gibi konulara dikkat edilerek tasarlanmalıdır. Biyopsinin yapıldığı invert mikroskop; ısıtma tablası, mikro manipülatör, hava ve yağ ile çalışan mikro enjektörleri içerir ve mikroskop anti-vibrasyon özelliğe sahip bir tabla üzerine yerleştirilir. Yine mikroskopa eklenebilen lazer, ayak pedalı ya da elle kontrol edilebilir ekipmanlara sahiptir. Yakınında ise biyopsi yapılacak oosit veya embriyoların aktarılma işlemi için bir stereo mikroskop ve ısıtıcı tabla ile inkübatör yer almalıdır. Uygulama yapılan her türlü ekipmanın kalibrasyonu ve bakımı zamanında yapılmalıdır. Biyopsi prosedürü uygun eğitimden geçmiş ve yeterli prosedür sayısına sahip kişiler tarafından yapılmalı ve yanında bir adet yedek uygulayıcı bulunmalıdır. Standart çalışma prosedürleri (SOP) takip edilerek işlem yapılmalı olası bir protokol dışı uygulama yapıldı ise mutlaka not edilmeli ve belgelenmelidir (Kokkali vd., 2020).

Mikro *blade* biyopsi, aspirasyon biyopsisi ve iğne tekniği olmak üzere 3 tip biyopsi yöntemi vardır. Mikro *blade* biyopsisinde, mikromanipülatöre bir mikro bıçak yerleştirilir ve 5-15 embriyo hücrelerini ayırmak için aşağı doğru hareket ettirilir. Morula aşamasında, hücreler embriyonun herhangi bir kısmından kesilebilir. Bununla birlikte, bir embriyo blastosist aşamasında iken biyopsi yapıldığında, tercihen trofektoderm hücreleri çıkarılmalıdır. Bununla birlikte, bir tutma pipeti ile embriyonun pozisyonunu korumak, daha standart ve daha küçük bir biyopsiye izin verebilir. Embriyolar arasında gDNA kontaminasyonunu önlemek için mikro bıçak ve tutma pipeti etanol-asetik asit kullanılarak yıkanmalı ve biyopsiler arasında bir su banyosunda durulanmalıdır (Ponsart vd., 2014).

Aspirasyon biyopsisinde embriyo bir tutma pipeti ile yerinde sabitlenerek 20 µm çaplı bir aspirasyon pipeti ile zona pellusida delinir ve hücreler (moruladan iki veya üç hücre, blastosistlerin trofektoderminden dört veya beş hücre) pipet ile nazikçe aspire edilir. İğne tekniğinde ise biyopsi için bir iğne kullanılmadan önce, embriyolar, % 0,4 BSA eklenmiş fosfat tamponlu salin'e (PBS) yerleştirilir, bir tutma pipeti ile yerinde tutulur ve daha sonra blastomerlere zarar vermemek için zona pellusida, sokulan ince bir iğne ile delinir. Küçük bir zona pellusida parçası biyopsi pipetini yerleştirmek için yırtılır ve aspirasyon biyopsisi için açıklandığı gibi hücreler nazikçe aspire edilir. Biyopsi yapılırken, yöntemle bağlı olarak embriyo başına ortalama 5-15 hücre çıkarılır ve genotiplendirmeden önce gDNA amplifikasyonu için kullanılır (Cenariu vd., 2012).

Veteriner hekimliği alanında genellikle morula ve blastosist evresindeki embriyolara biyopsi işlemi uygulanır, polar cisim biyopsisi rutinde kullanılmamaktadır. İneklerde, blastosist veya morula evresinde mikro *blade* kullanılarak TE hücreleri kesilebilir (Peippo vd.,

2007), zona pellusida mikropipet yardımı ile delinerek birkaç hücre aspire edilebilir (Polisseni vd., 2010) ya da zona pellusida lazer ile mikro açıklık oluşturularak birkaç hücre aspire (Tutt vd., 2020) edilebilir. Her yöntemin kendi içinde avantaj ve dezavantajları mevcuttur (Sciorio ve Dattilo, 2020, Çizelge 1.3.). Birinci ve ikinci polar cisim biyopsi yöntemi diğerlerine göre daha az invaziv olmasına rağmen paternal genomun etkisi belirlenemediği için elde edilen bilgilerin doğruluğu düşüktür. Mozaisizm bölünme evresindeki embriyolarda daha yüksektir bu da sonuçlar açısından yanıltıcı olabilmektedir. Bölünme aşamasındaki embriyoda blastosist sıvısı bulunmadığı için ICM'ye hasar verme riski yüksektir ve TE farklılaşması tam olarak gerçekleşmemiştir. Blastosist aşamasında gelişim ilerlemiş, hücre farklılaşması başlamış, hücre sayıları artmış ve ICM ile TE sınırı belirginleşmiştir. Bölünme aşamasında yapılan biyopsi ile blastosist aşamasında yapılan biyopsi embriyonik gelişimi ve transfer sonrası başarı oranını etkilemektedir (Herrera, 2016).

Çizelge 1.3. Polar cisim biyopsisi, blastomer biyopsisi, TE biyopsisi ve blastosentezin karşılaştırılması (Not: Bu prosedürler üç farklı aşamada aynı oosit-embriyo üzerinde gerçekleştirilebilir, Sciorio ve Dattilo, 2020)

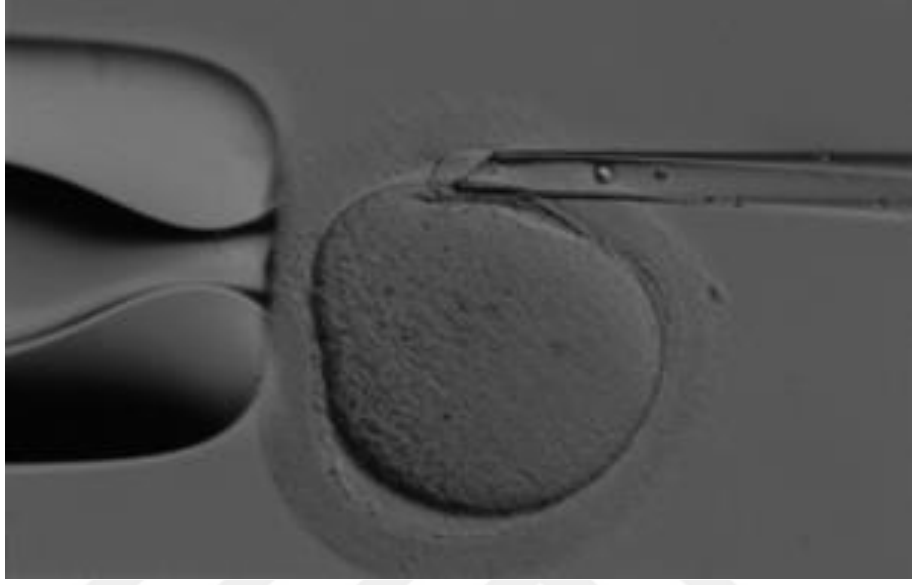
Gelişim Aşaması	Prefertilizasyon aşamasındaki oosit	Bölünme aşamasındaki embriyo	5-7 günlük Blastosist	6-7-8 günlük Blastosist
Teknik				
Örnek	Birinci ve ikinci polar cisimler	1 ya da 2 blastomer	~ 5 ya da 6 trofektoderm hücresi	Blastosist sıvısı
Avantajlar	Zorunlu embriyo kriyoprezervasyonu gerektirmeden genetik test yapmak için daha uzun süre sağlar	Daha fazla deneyim gerektirir. İyi değerlendirilen bir metodolojidir.	Analiz için yüksek miktarda DNA içerir. Mozaisizmin tespiti ve miktarının ölçülmesi mümkündür. Gecikmiş embriyo transferine olanak sağlar.	Daha az invaziv ve güvenlidir. DNA hem iç hücre kümesi hem de trofektoderm kaynaklıdır.
Dezavantajlar	Yalnızca maternal kökenli anöploidinin ve hasarlı DNA'nın tespiti	Embriyonun viabilitesini engelleyebilir. Yüksek oranda (geçici) mozaisizm ihtimali vardır.	İç hücre kütesini yansıtmayabilir. Mozaisizm zor yorumlanır.	Genellikle analiz için yeterli DNA içermez. Biyopsi sonuçları ile uyumu düşüktür.

Biyopsi de iki basamak vardır. Birincisi zona pellusidanın açılması, ikincisi ise hücrelerin alınmasıdır. Zona pellusidanın açılma işlemi, mekanik, kimyasal ya da lazer aracılığı ile yapılmaktadır. Mekanik yöntemde, eğik uçlu bir pipet kullanılarak zonadan iğne gibi geçilir ve bu pipetle aspirasyon işlemi yapılabilir. Geleneksel kısmi zona diseksiyonu (PZD), keskin bir mikroiğne ile zona zona pellusidada yarık açma yöntemidir. Kısmi zona diseksiyonu, mikroiğnenin ucunun kapalı olması ve düzensiz kesiler elde edilmesi sebebiyle çok sık kullanılmamaktadır. Kimyasal yöntem, pH'ı 2,3 olan asidik *Tyrode* solüsyonu kullanılarak yapılır. Bu yöntem PZD'ye göre zonada kontrol edilemeyen büyük ve yuvarlak bir delik oluşturur. Kültür ortamına bırakılan solüsyon ve yine bu solüsyonun perivitellin boşlukta birikmesi nedeniyle hücrelerde hasar veya ölüm meydana gelebilir. Bu da gelişimi ve implantasyonu olumsuz yönde etkiler. Bu yöntem mekanik yöntemle göre daha düşük gebelik oranlarına sahiptir. Son yöntem olan lazer destekli zona pellusida delme ise, lazer ışınları ile minimal yüzeysel hasar vererek gerçekleştirilir. Lazer yöntemi minimal düzeyde hasar verdiği için fertilizasyon oranı,atching ve implantasyon oranı üzerine etkisi düşüktür. Lazer ışınları, dalga boyları kırmızı, yeşil veya mavi olarak görünür aralıkta, ultraviyole (UV) ya da kızılötesi (IR) aralıktaki elektromanyetik dalgalar. Uzun dalga boylarına sahip lazer ışınlarının daha pratik olduğu belirlenmiştir. Ultraviyole ışınlarının en büyük dezavantajı mutajenik etkisidir. Kızılötesi ışınlarda, 2,9 mm erbiyum-YAG temas lazeri ile 1,48 mm temassız diyet lazeri bulunmaktadır ve diyet lazer mekanik, termal veya mutajenik etkiler olmadan bu işlemi gerçekleştirebilmektedir (De Vos ve Van Steirteghem, 2001). Germond vd. (1996) diyet lazer kullanımını tanımlamış ve delik boyutunun ışınlama süresi ile değiştirilebileceğini bulmuştur. Son olarak, biyopside alınan hücre sayısı, embriyonun gelişim evresi ve kalitesi genotipleme için alınan örnek kalitesini ve dolayısıyla analizleri etkilemektedir.

1.9.1. Polar Cisim Biyopsisi

Polar cisim biyopsisi, profaz I'den metafaz II'ye geçen oositin, küçük bir maternal DNA içeren PB1'in perivitellin boşluğa ekstrüde edildiğinde ya da fertilizasyon sonrası PB2 çıkarılarak gerçekleştirilir (Montag vd., 2009, Şekil 1.23.). Polar cisim saat 11-12 pozisyonunda olacak şekilde oosit holding pipet ile tutulur. Zona pellusidanın açılması lazer ile veya mekanik olarak mikro pipet yardımı ile yapılır (Gianaroli, 2000). Biyopsi işleminden sonra oosit ya da zigot kültüre tekrar alınır ya da kriyoprezervasyona alınır. Hangi maternal kaynaklı genlerin miras alındığı, mayotik hatalar, maternal anöploidiler ve maternal kaynaklı patojenik varyantlar hakkında polar cisim biyopsisi önemli bilgiler sağlar. Embriyo gelişimi hakkında bilgi bu aşamada yapılan biyopsi ile öngörülemez. Laboratuvar iş yükü bu biyopsi

de yüksektir. İşlem sırasında PB parçalanması veya dejenerasyonu gibi riskler orta düzeydedir ayrıca elde edilen DNA miktarı sınırlıdır çünkü tek hücreden analiz yapılmaktadır (Kokkali vd., 2020).

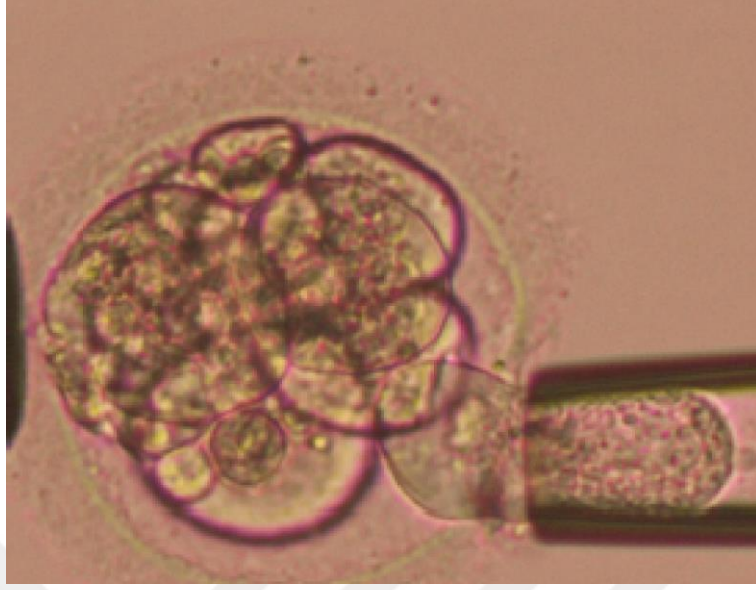


Şekil 1.23. Polar cisim biyopsisi (Montag vd., 2009)

Bu yöntem, babanın genetik katkısının değerlendirilmesine izin vermediği için PGT için kullanılabilirliği hala tartışma konusudur. Aynı zamanda bu pahalı ve süreci uzun olan bir yöntemdir çünkü birçoğu fertilize olamayacak veya blastosist aşamasına ulaşamayacak çok sayıda oosite biyopsi yapılması gerekir. Ayrıca, mayoz bölünme sonrası kromozom anormalliklerinin yüksek insidansı sebebiyle yanlış tanı riski vardır. Bu nedenlerden dolayı oosit ve zigot biyopsisi günümüzde nadiren kullanılmaktadır (Cimadomo vd., 2016).

1.9.2. Bölünme Aşamasındaki Embriyo Biyopsisi

Bu biyopsi işlemi, 8 ila 16 hücreli kompakt morula öncesindeki embriyolara uygulanır ve bu embriyolardan 1 ya da 2 blastomer çıkarılır. Sonuçlar paternal ve maternal genetik katkılar hakkında bilgi verir (De Vos ve Van Steirteghem, 2001; Gianaroli, 2000; Swanson vd., 2007). Biyopsi işlemi, ya Ca^{2+}/Mg^{2+} bulunmayan ticari biyopsi medyumları içerisinde ya da biyopsi medyumunda inkübasyon sonrası Hidroksietil piperazin etan sülfonik asit (HEPES) tamponlu medyum içerisinde gerçekleştirilebilir. Embriyonun pozisyonu aspire edilecek blastomer saat 3 yönüne gelecek şekilde ayarlanır, zona pellusidanın açılması lazer ya da mekanik olarak mikropipet ile yapılır ve genellikle 1 blastomer aspire edilir (Milachich, 2014, Şekil 1.24.).



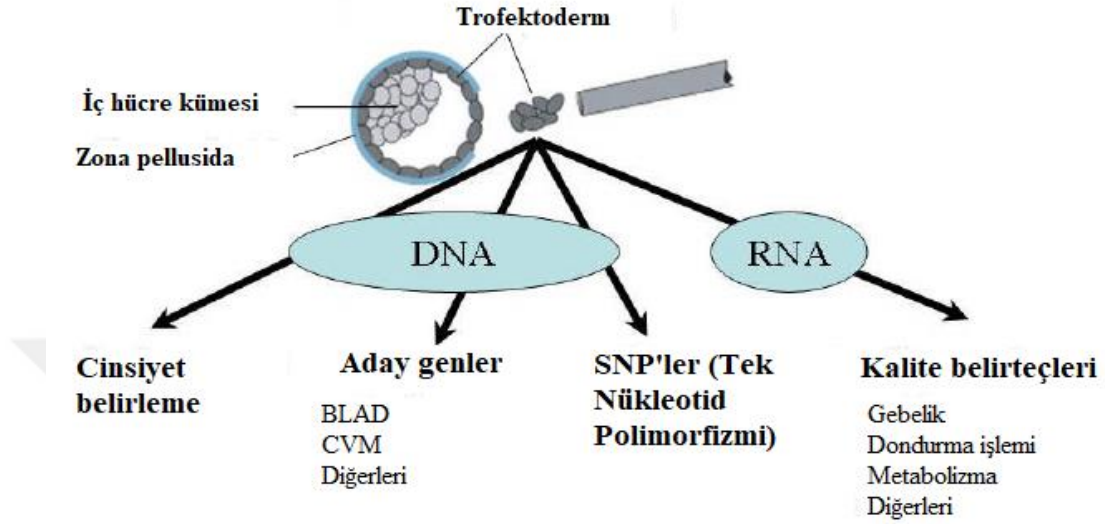
Şekil 1.24. Biyopsi pipeti ile blastomerlerin aspirasyonu (Milachich, 2014)

Biyopsi işleminden sonra embriyo yıkanarak kültüre tekrar alınır. Blastomer biyopsisi, aralarında çoğu blastosist aşamasına ulaşmayacak çok sayıda bölünmüş olan embriyonun mikromanipülasyonunu içerir. Bu biyopsi yönteminde sadece belirli morfolojik kaliteye sahip bölünmüş embriyolar kullanılır ve alınan hücreler totipotenttir. Hem maternal hem de paternal mayotik hatalar tespit edilebilmektedir fakat tek bir hücre alındığı için kromozomal mozaizm tespiti oldukça zor olmaktadır (Sciorio ve Dattilo, 2020).

1.9.3. Trofektoderm Biyopsisi

Blastosist evresine gelmiş embriyolarda TE ve ICM hücreleri net bir şekilde ayırt edilebilmektedir. Bu yöntemde embriyo ICM hücrelerinin olduğu taraftan saat 7 ila 11 yönünde holding pipet ile tutularak birkaç TE hücresinin çıkarılması şeklinde yapılır. Embriyonun tutma açısı ICM hücrelerinin aspirasyonunun önlenmesi için önemlidir. Bu yöntemle, ZP'de açılan delikten TE hücreleri aspire edilirken lazer atışı ile hücreler uzaklaştırılmış olur. Genellikle 5 ila 10 TE hücresi aspire edilir (Aoyama ve Kato, 2020). Ekstra embriyonik yapılar yani plasenta ve embriyo dış zarların kökeni hakkında bilgi verir. Alınan hücre sayısı olduğundan mozaiklik oranı doğru bir şekilde belirlenememektedir. Ayrıca ICM hücrelerindeki mozaiklik ile TE hücrelerindeki mozaiklik farklı seviyelerde olabilir (Skinner vd., 2023). Mao vd. (2024) insanlarda yaptığı meta analiz çalışmasında TE biyopsisi yapılanlar ile sadece IVF veya ICSI uygulanan hastalarda erken doğum, düşük doğum ağırlığı, sezaryen, konjenital malformasyonlar gibi bazı parametreleri karşılaştırmış ve anlamlı bir fark bulamamıştır.

Daha fazla hücre alındığı için bu yöntem diğerlerine oranla daha yüksek güvenilirlik sağlar ve altın standart olarak günümüzde uygulanmaktadır. Elde edilen DNA ve RNA ile cinsiyet belirleme, gen analizleri, SNP analizleri ve kalite belirteçlerini belirlemek mümkündür (Şekil 1.25.).



Şekil 1.25. İnek blastosistlerin TE biyopsisi sonrası yapılabilecek analizlerin özeti (Canva'da yapılmıştır)

1.9.4. Blastosentez

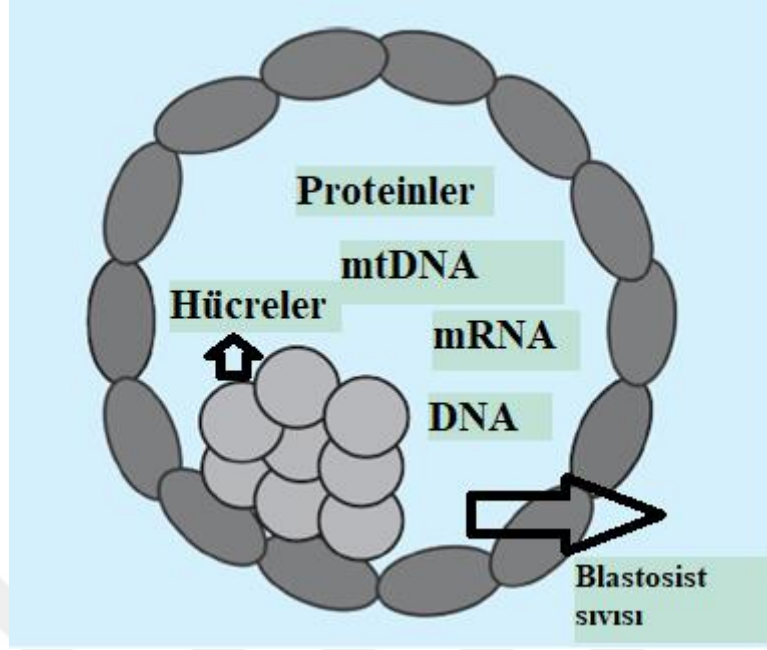
Blastosist evresindeki embriyonun blastosist sıvısının aspire edilmesidir. Minimal invaziv olarak kabul edilen bu yöntemde sıvı, hücresiz DNA (cell-free, cf-DNA) içerir. Elde edilen sıvı miktarı düşük olduğu için DNA'nın saflaştırılması ve çoğaltılması gerekmektedir. Blastosist sıvısında (BF) cf-DNA, Palini vd. (2013) tarafından tespit edilmiştir. Bununla birlikte, cf-DNA için blastosist sıvısı örneklemesi bazı potansiyel dezavantajlara sahiptir. Aslında, bu yaklaşım minimal invaziv bir yöntemdir çünkü blastosist sıvısı aspirasyonu için intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) iğnesi ile girilmesi veya blastosist sıvısının kültür ortamına salınması için lazer kullanıldığında trofektoderm tabakasının bütünlüğü bozulmaktadır. Ayrıca, yeterli hacimde blastosist sıvısının aspirasyonu veya kültür ortamına salınması için bu yöntem expanded blastosistlerde gerçekleştirilmelidir.

Kullanılmış kültür ortamında veya blastosist sıvısında bulunan cf-DNA'nın doğası ve kaynağının, bireysel embriyo genetiğiyle yeterince uyumlu olduğu anlaşıp onaylanana kadar, mevcut olan diğer tek uygun DNA kaynağı, embriyonun kendisinden alınan hücresel materyal olacaktır. Tarihsel olarak bu, her iki polar cismin çok erken bir embriyodan veya kültürün 3.

gününde bölünme aşamasındaki bir embriyodan bir blastomerin çıkarılmasını içeriyordu, ancak trofektoderm biyopsisinin daha yüksek implantasyon sonuçları vardır. Erken evrede yapılan biyopsilerin implantasyon oranlarını yaklaşık %40 oranında azalttığı, sonraki evre trofektoderm biyopsisinin ise %2' den çok daha düşük implantasyonda başarısızlık oranlarına sahip olduğu görülmüştür (Leigh, 2019).

Sesina vd. (2018)' nın yaptığı çalışmada, blastosist kavitesindeki DNA'nın kalitesini kesinlikle etkileyebilecek en düşük kalitedeki 7 günlük embriyolar kullanmış ve bu kadar düşük kalitedeki embriyoların bile, blastosistin invaziv olmayan biyopsisi için uygun olabileceği, ardından analiz için uygun DNA elde edilebileceği öne sürülmüştür.

Blastosist sıvısından yapılan biyopsi yöntemi tartışmasız daha fazla geliştirilmeye ihtiyaç duymaktadır, ancak daha invaziv yöntemlere göre birtakım avantajlara da sahiptir. Herşeyden önce, invazivlik derecesi diğer yöntemlere göre oldukça düşüktür. Blastosentez doğru yapıldığında blastosistte oluşan tek değişiklik doğal bir süreç olan kollapstır. Bu yöntemin ikinci önemli avantajı, düşük maliyeti ve erişilebilirliğidir. Ayrıca, suni olarak oluşturulacak kollaps sayesinde blastosist aşamasındaki embriyoyu dondurmak sıvı içeren blastosisti dondurmaktan daha başarılı sonuçlar alınmasına yol açacaktır. Blastosist sıvısının aspirasyonu yaparken, mikromanipülasyon sistemi için sadece ICSI pipeti gerekirken, trofektoderm biyopsisi için özel bıçaklar veya lazer gibi pahalı ekipmanlar gereklidir. Şu anda, blastosentez yöntemi yalnızca düşük bilgi içeriği nedeniyle uygulanamamakta, ancak kuşkusuz teknolojinin daha da gelişmesiyle rutin uygulamaya kesin olarak girebileceği düşünülmektedir. Blastosentez ile moleküler genetik yöntemlerle analize uygun DNA elde etmek mümkündür (Gianaroli vd., 2019, Şekil 1.26.). Blastosist sıvısının aspirasyonu sonucu elde edilen DNA' yı incelemek için tüm genom amplifikasyonu ile multipleks kantitatif PCR (QF-PCR) yönteminin kullanılması tavsiye edilmektedir. Blastosentez sonucu elde edilen DNA' nın hem monogenik hastalıkların teşhisinde hem de preimplantasyon genetik taramalarında kullanılması mümkündür (Sesina vd., 2018). Blastosentez yöntemi geniş bir uygulama yelpazesinde uygulanması açısından büyük umutlar vaat etmektedir, ancak yöntemin güvenilirliğini ve verimliliğini artırmak için ek çalışmalara ve araştırmalara ihtiyaç vardır.



Şekil 1.26. Blastosist sıvısında, proteinler, DNA ve RNA varlığı (Gianaroli vd., 2019)

Perloe vd. (2013) yaptığı çalışmada insan embriyolarından alınan dokuz adet blastosist sıvısı örneğinden sadece %33,3'ünün TE biyopsisi ile uyumlu olmasına rağmen, bazı embriyoların blastosist sıvısında embriyonik DNA'nın tespit edilebileceğini bildirmiştir. Genetik değerlendirme polar cisimlerin, blastomerlerin veya TE hücrelerinin biyopsisi yoluyla yapılabilir. Mevcut bilimsel literatüre göre, blastosist aşamasında kromozom analizi, embriyonik genomun en güvenilir temsilini sağlar (Tşuiko vd., 2018). Genetik analiz için blastosist sıvısında bulunan cf-DNA doğrulanır ise, blastosist sıvısının aspirasyonu kolaylıkla tercih edilen rutin bir biyopsi yöntemi haline gelebilir (Gianaroli vd., 2014). Blastosist sıvı aspirasyonu aslında blastosistin kriyoprezervasyonu için geliştirilmiştir. Blastosist vitrifikasyonu, yalnızca embriyonun blastosist aşamasında dondurarak saklanması ve hatta tüm hücresel döngüleri durdurmayı sağlar. Eğer bu yöntem her zamankinden daha yaygın hale gelirse ve doğru analitik araçlar kullanılırsa elde edilen blastosist sıvısı bol miktarda ve potansiyel olarak daha yararlı olacaktır. Blastosist sıvısından DNA elde etmenin amacı, daha az invaziv bir PGT analizi oluşturmak olsa da bu prosedürün, potansiyel olarak embriyo dinamiklerini değiştirebileceği düşünülmektedir fakat embriyodan birden fazla hücrenin çıkarılmasıyla embriyoya daha yoğun stres uygulayan ve şu anda rutin olarak kullanılan blastosist trofektoderm biyopsisi ile karşılaştırıldığında aslında daha az invaziv bir yöntem olduğu görülmektedir.

Gianaroli vd. (2019) cf-DNA' nın reproduksiyon alanında kullanımını doğrulamak için bu DNA'nın gerçekten embriyonik hücreleri temsil edip etmediğini belirlemek amacıyla

mevcut kanıtları eleştirel bir şekilde analiz etmiştir ve elde edilen mevcut sonuçlar biraz çelişkili bulunmuştur. Bu uyumsuzluğun olası nedenleri arasında, embriyo popülasyonundaki farklılık veya bu kadar küçük bir sıvı hacminin (çoğunlukla nanolitre) alınmasıyla ilgili teknik problemler yer almaktadır. İlk çıkış noktası ile ilgili olarak, düşük miktarda DNA elde edilmesinin büyük olasılıkla, blastosist sıvısına salınırken çekirdek bozulması ve ardından nükleer DNA parçalanması veya blastosist farklılaşması sırasında çekirdeklerin blastosist sıvısına herhangi bir hareketinin olmaması olarak düşünülmektedir (Tobler vd., 2015). Bu biyolojik etki, mevcut hataların kendi kendine düzeltilmesine veya preimplantasyon gelişimi sırasında yeni kromozomal hataların üretilmesine bağlı olabilir (Taylor vd., 2014).

1.9.5. Biyopsi Yöntemlerinde Diğer Güncel Yaklaşımlar

Günümüzde, biyopsi yöntemlerinde non-invaziv yöntemlere yönelim olmuştur. Bu yöntemlerden biri de kullanılan kültür medyumundan elde edilen cf-DNA'nın kullanılmasıdır. Stigliani vd. (2013) blastosistin geliştiği kullanılan kültür medyumunda (SCM) ilk kez cf-DNA'yı tespit etmiştir. Shamonki vd. (2016) insan IVF çalışmalarında blastosistler tarafından kültür ortamına salınan cf-DNA analizi ile embriyoların kromozomal haritasının çıkarılabileceğini ve TE biyopsi ile sonuçların uyumlu olduğunu kanıtlamıştır.

Genomik DNA'nın ana kaynakları TE ve ICM iken, kültür ortamındaki DNA'nın kaynağı aslında hücresel mekanizmalar sonucu ortaya çıkan apoptozis ve nekroz ürünleridir. Buna göre, yapılan analizler ile aslında embriyonun apoptozis süreçleri hakkında bilgi edinmek mümkündür. Yani aslında anöploid döküntüleri içermektedir (Del Collado vd., 2023). Fakat, cf-DNA'nın epiblast ya da TE ile kökeninin araştırılması ve mekanizmaların anlaşılması için daha fazla çalışma gerekmektedir.

İnek embriyolarının, gelişim sürecinde önemli düzenleyici yolların keşfedilmesi ile bu alanda çalışmalar daha da artacaktır. Özellikle ekstraselüler veziküller ve bunların taşıdığı mikroRNA ve proteinler, embriyo ile çevresi arasındaki iletişimde kritik bir rol oynar ve implantasyon öncesi ile sonrası gelişim süreçlerinde önemli işlevler üstlenir. Bu veziküller, embriyo gelişimini etkileyebilir ve stres altında olan embriyoların gen ifadesini düzenleyebilir, potansiyel olarak embriyonun kalitesi ve yaşayabilirliği hakkında ipuçları sağlayabilir. Bu durum, invaziv olmayan tanı testlerinin geliştirilmesine olanak tanıyabilir. Ayrıca genişletilmiş embriyo kültürü ve sentetik embriyo modelleri, blastosist aşamasından sonra embriyo gelişimindeki fizyolojik süreçleri daha iyi anlamamıza yardımcı olmaktadır. Bu, canlı organizmalarla yapılan araştırmalarda zor olan bir dönemin incelenmesini sağlar. Uzun vadede, bu yenilikler daha düşük maliyetle embriyo üretimi sağlarken, yüksek kalitenin korunmasına ve sonuçların iyileştirilmesine olanak tanıyacaktır.

Bu tez çalışmasında, farklı kültür solüsyonlarında in vitro olarak üretilen sığır blastosistlerine trofektoderm, iç hücre kümesi biyopsisi ve blastosist sıvı aspirasyonu yapılması ve blastosist sıvısındaki genomik DNA'nın (gDNA) araştırılması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca farklı kültür medyumlarının kullanılması ile blastosist elde etme başarısı ile elde edilen gDNA'nın kalitelerine etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. *Defined* ve *undefined* kültür medyumları ile in vitro elde edilen 7.-9. günde blastosistlere mikromanipülatör ile blastosist sıvı aspirasyonu, iç hücre kümesi biyopsisi ve trofektoderm biyopsi işlemi yapıldı. Bu alınan biyopsi örneklerine DNA zenginleştirme işlemi yapıldı ve DNA miktarları ölçüldü. Embriyolardan alınan biyopsi örnekleri ile anneden gelen allelerin karşılaştırılması amacıyla embriyo eldesinde kullanılan hayvanların uterus dokularından biyopsi örnekleri alındı ve biyopsi alınan dokulardan DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA'lar 19 primer içeren kısa tandem tekrar dizileri (STR) analizine alınarak biyopsi sonuçları ile doku örnekleri karşılaştırıldı. Blastosist sıvı aspirasyonu işlemi günümüzde altın standart kabul edilen trofektoderm biyopsi işlemine göre daha az invaziv bir işlemdir. Embriyodan hücre alımını içermez ve kriyoprezervasyon öncesi vitrifikasyon işlemi yapılan embriyolardan blastosist sıvısı aspire edilmektedir. Yani, embriyolar direkt transfer edilmeyecek ise blastosist sıvı aspirasyonu aslında in vitro üretim döngüsünün bir parçasıdır. Blastosist sıvısı miktarının azlığı nedeniyle genetik analizlerden standart bir sonuç elde edilememektedir. Biyopsi örnekleri ile yapılan genetik analizlerde yüksek verimli hayvanların seçilmesi ve kısa sürede daha fazla yavru elde edilmesi mümkündür. Son yıllarda invaziv olmayan biyopsi tekniklerinin geliştirilmesine yönelim olmuştur bunlardan birisi de diğer tekniklerine göre daha az invaziv kabul edilen blastosist sıvı aspirasyonudur. Bu çalışma ile diğer biyopsi yöntemlerine alternatif olarak blastosist sıvısından genetik analizlerin yapılması ve rutin biyopsi yöntemlerinin yerini alması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Ovaryumların Toplanması

Çalışma sırasında Ankara ve Konya illerinde bulunan mezbahalarda kesilen düve veya ineklerin ovaryumlarından (Grup I, n:30; Grup II, n:54) elde edilen oositler (Grup I, n:112; Grup II, n:226) kullanıldı. Embriyo eldesindeki tüm aşamalar Grup I için Mazzoni vd. (2017), Nielsen vd. (2014) ve Pryor vd. (2016)'nin belirttiği şekilde yapıldı. Grup II için ise IVF-Bioscience protokolünde belirtildiği şekilde yapıldı. Mezbahalardan toplanan farklı ırklara ait sığır ve düve ovaryumları, hayvanların kesimini takip eden 2 saatlik süre içerisinde, her bir düveye/ineğe ait ovaryum dokuları ayrı ayrı poşetlenerek içerisine antimikotik-antibiyotik solüsyon (Sigma, A5955; 10000 IU penisilin, 100 mg streptomisin ve 25 µg amfoterisin B/mL) eklenmiş 20-25 °C'deki laktat ringer içerisinde laboratuvara ulaştırıldı ve her ovaryum numaralandırıldı (Şekil 2.1.). Laboratuvara getirilen ovaryumlar, çevre dokulardan ve taşıma vasatından uzaklaştırılmak amacıyla laktat ringer ile iki kez yıkama işlemine tabi tutuldu. Yıkanan ovaryumlar aspirasyon yapılana kadar su banyosu içerisinde laktat ringer solüsyonu içerisine bırakıldı ve sonra aspirasyon işlemine başlandı.



Şekil 2.1. Ovaryumların laboratuvara ulaştırılması (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.2 Oosit Eldesi ve Uterustan Doku Örneğinin Alınması

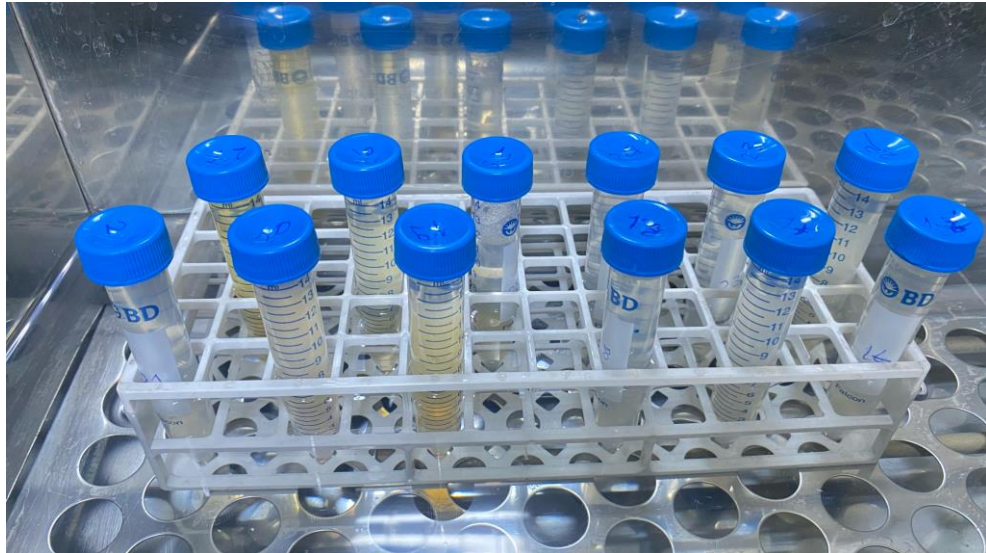
Kumulus-oosit komplekslerini (KOK) içeren folikül sıvısı ovaryumlar üzerinde bulunan 2-8 mm çapındaki periferik foliküllerden, basınç ayarlı (180-200 mmHg) aspirasyon pompası (Labotech Aspirator 4014, Almanya) veya lastik contasız 10 ml'lik enjektörler kullanılarak 18 gauge iğne ile aspire edildi (Şekil 2.2., Şekil 2.3.). Toplanan folikül sıvıları konik tabanlı numaralandırılmış eppendorf tüplerine alındı ve oositlerin tüpün tabanına birikmesi beklendi (Şekil 2.4.). Tüpün tabanında biriken oositler daha sonra stereo mikroskop (Leica M205, C, Almanya) altında (Şekil 2.5.) kalite yönünden değerlendirmeye alınmak üzere bireysel olarak işaretlenmiş 35 mm'lik petrilere aktarıldı (Şekil 2.6.).



Şekil 2.2. Ovaryumlardan folikül sıvısının aspirasyonu (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)



Şekil 2.3. Ovaryumlardan folikül sıvısının aspirasyonu (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)



Şekil 2.4. Numaralandırılmış santrifüj tüplerine alınan folikül sıvıları (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)



Şekil 2.5. 35 mm petrilere aktarılan oositlerin stereo mikroskopta kalitelerinin değerlendirilmesi (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)



Şekil 2.6. Oosit arama için numaralandırılan ve karelere bölünen 35 mm petrilere (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

Folikül aspirasyonu yapıldıktan sonra her sığıra ait uterustan doku parçaları kesildi. Kesme işlemi sırasında distile su ile yıkama yapıldı ve kesilen doku parçaları önceden numaralandırılmış 1,5 ml godelere alınarak genetik analizi yapılmak üzere -20 °C’de saklandı (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. İneklere ait uterustan alınan doku örnekleri (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.3. Oositlerin Morfolojik Değerlendirilmesi

Aspire edilen oositlerin kalite yönünden değerlendirilmesi Brackett ve Zuelke (1993), De Loos vd. (1992) ve Semacan vd. (2019)’nin belirttiği şekilde dört ayrı kategoride yapıldı (Şekil 2.8.);

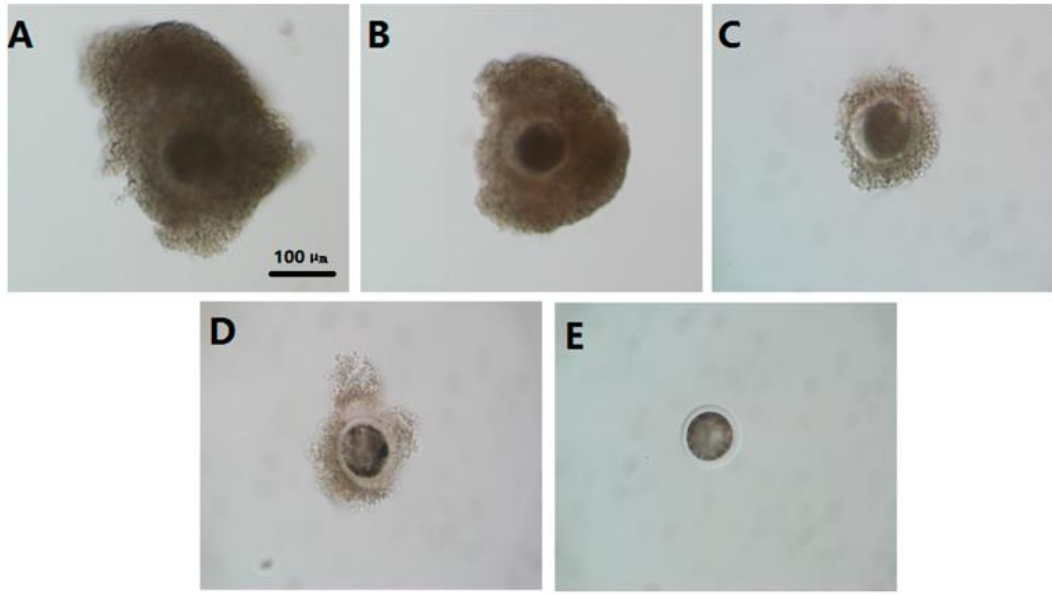
Kategori 1 (Grade I- A kalite) oositler: Kumulus hücreleri *zona pellusida*’nın tamamını kaplayan kompakt yapıda, üç ya da daha fazla katlı kumulus hücreleri olarak görülen, homojen ooplazmalı, genel KOK görünümü şeffaf yapıda olan,

Kategori 2 (Grade II- B kalite) oositler: Kumulus hücreleri *zona pellusida*’nın 1/3’ünden fazlasını kaplayan kompakt ya da 2 ya da daha az katlı olan, homojen ooplazma görünümüne sahip olsa da kaba görümlü ve kategori 1 oositlere göre daha az transparan KOK’a sahip olan,

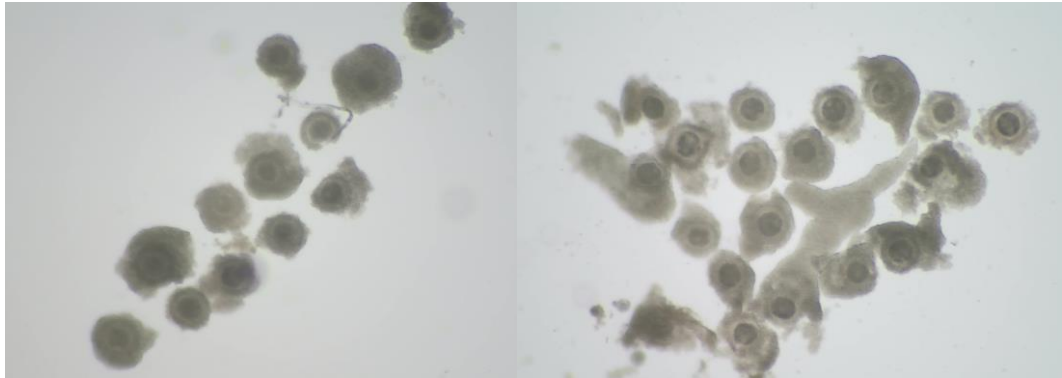
Kategori 3 (Grade III- C kalite) oositler: Kategori 2’den daha az kumulus hücrelerine ya da hiç kumulus hücreleri bulunmayan ve koyu renkli döküntüler içeren düzensiz ooplazmaya sahip olan ve

Kategori 4 (Grade IV- D kalite) oositler: Kumulus hücrelerinde ekspansiyon görülen, yırtık olan veya hiç KOK'a sahip olmayan, jelatinimsi yapıda ağ benzeri görünümde olan ve düzensiz koyu renkli ooplazmaya sahip olan oositlerdir.

Yukarıda detaylandırılan açıklamaların ışığı altında folikül aspirasyonu sonrası elde edilen Kategori I'de yer alan oositlerden 110 μm 'nin üzerinde olanlar (Gordon, 2003) (Grup I, n:112; Grup II, n:226) çalışmaya dahil edildi (Şekil 2.9.). Bu kapsamda embriyo üretimi *undefined* (IVF Bioscience) medyum ile Alkan vd. (2023) tarafından belirtildiği şekilde *defined* (CR1aa+ %5 buzağı serumu (CS)) medyum ile Kobayashi (2007) tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.8. Brackett ve Zuelke (1993) ve De Loos vd. (1992)'nin belirttiği şekilde aspire edilen oositlerin kalite yönünden değerlendirilmesi (A ve B: Kategori 1, C: Kategori 2, D: Kategori 3, E: Kategori 4)



Şekil 2.9. Kumulus oosit kompleksleri (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı).

2.4. In Vitro Maturasyon

2.4.1. Defined Medyum Kullanarak In Vitro Maturasyon

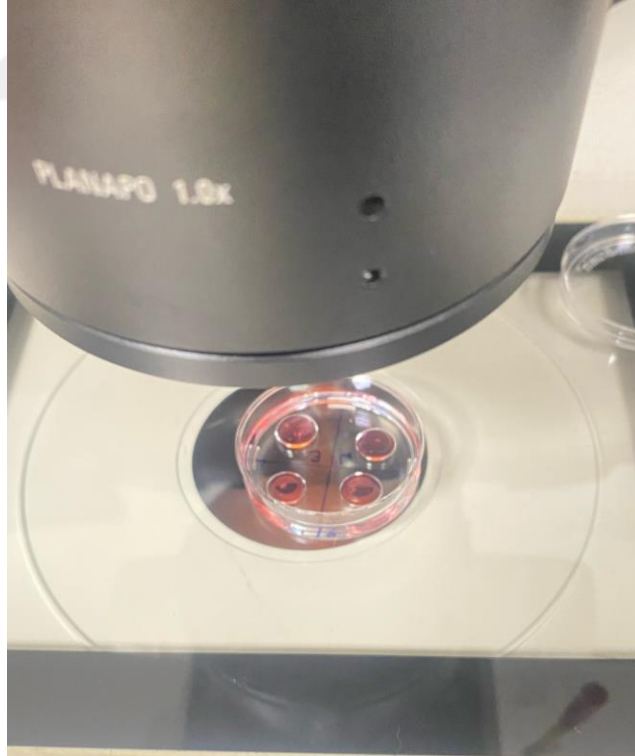
Mikroskop altında belirlenen tüm KOK'lar uçları oosit çapına uygun hale getirilmiş steril pasteur pipetleri (Eppendorf, ABD) ile toplanarak içerisinde TCM-199+ %5 CS bulunan 35 mm'lik petrilere alındı ve petrinin farklı noktalarında en az beş defa yıkandıktan sonra başka bir 35 mm'lik petriye alındı ve bu işlem burada da tekrar edildikten sonra diğer hücre kalıntılarından tamamen temizlenmiş bir şekilde içerisinde TCM-199 + %5 CS (Çizelge 2.1., Şekil 2.10.) içeren maturasyon vasatı bulunan 35 mm'lik petrilere aktarıldı. KOK'ların oosti kültür vasatına alışması amacıyla petri içerisinde nazik bir şekilde yıkama yapıldı ve üzeri mineral yağ ile kaplanmış olan maturasyon *dropletlerine* alındı. Maturasyon *dropletleri* genellikle 100 µl'lik miktarda içerisine 20 oosit konulacak şekilde hazırlandı ve her hayvandan elde edilen oositler ayrı ayrı droplara konuldu (Şekil 2.11.). Vasata konulan oositler %5 CO₂ içeren 38,5 °C'deki maksimum nemli ortamda (Sanyo MCO-18AIC (UV) CO₂ Incubator, Japonya) 22-24 saat maturasyona tabi tutuldu.

Çizelge 2.1. In vitro Maturasyon solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (20 ml)
TCM-199	19 ml
CS	1 ml
FSH	0,02 mg
Gentamisin	20 µl



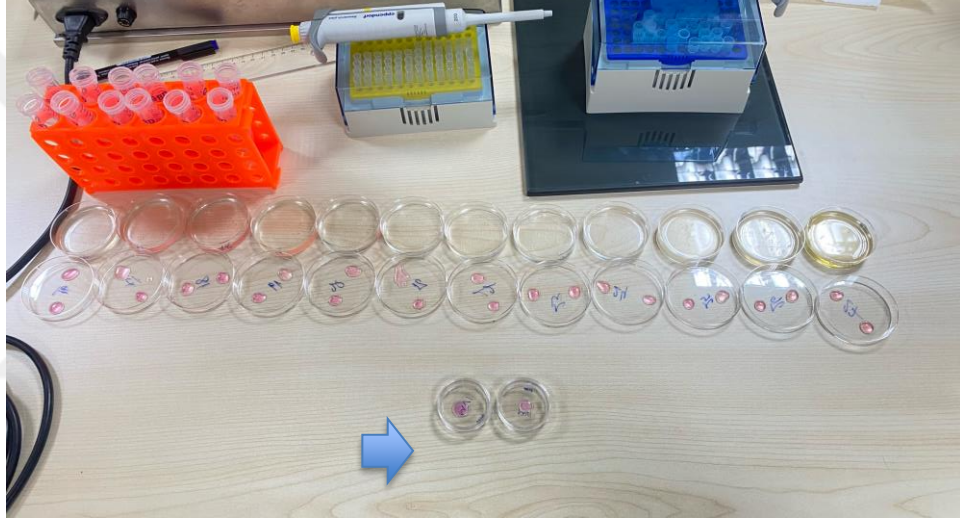
Şekil 2.10. In vitro maturasyon için hazırlanan TCM-199 + %5 CS (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)



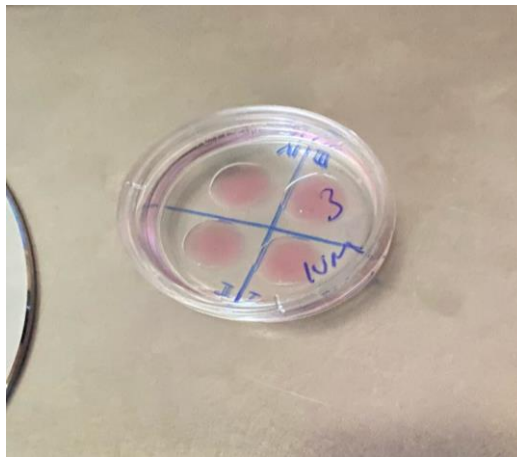
Şekil 2.11. TCM-199 + %5 CS ile hazırlanan in vitro maturasyon dropları (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.4.2. Undefined Medyum Kullanarak In Vitro Maturasyon

Uygun özellikteki tüm KOK'lar, BO-WASH solüsyonuyla (IVF Bioscience, İngiltere) en az 10 defa olmak üzere steril pasteur pipeti yardımıyla yıkanarak çevre hücrelerden temizlendi (Şekil 2.12.). KOK'lar, içerisinde Bovine-in vitro maturasyon (BO-IVM) solüsyonu (IVF Bioscience, İngiltere) bulunan 35 mm'lik petrilere aktarıldı ve ekilibrasyonun sağlanması amacıyla farklı iki dropta en az 10 defa pipetlenerek yıkandı (Şekil 2.12.). Ekilibrasyonu tamamlanan oositler 35 mm petrilere oluşturulan 100 µl/BO-IVM solüsyonu bulunan droplara aktarıldı (Şekil 2.13.) ve %6 CO₂ içeren inkübatörde 38,5 °C'deki maksimum nemli ortamda 21-24 saat maturasyona tabi tutuldu (Sanyo MCO-18AIC (UV) CO₂ Incubator, Japonya).



Şekil 2.12. BO-WASH ve BO-IVM (mavi ok) yıkama dropları (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)



Şekil 2.13. 35 mm petrilere oluşturulan 100 µl/BO-IVM solüsyonu (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.5. Spermanın Fertilizasyon için Hazırlanması

2.5.1. Defined Medyum Kullanarak Hazırlama

Sperm yıkama solüsyonu (SWS) (Çizelge 2.2.), sperm dilüe etme solüsyonu (SDS) (Çizelge 2.3.), %90 *Percoll Gradient* solüsyonu (Çizelge 2.4.), %45 *Percoll Gradient* solüsyonu (Çizelge 2.5.), 10X sperm TL stok solüsyonu (Çizelge 2.6.), BO-A (Çizelge 2.7.), BO-B (Çizelge 2.8.) ve *Brackett and Oliphant Solution* (BO) (Çizelge 2.9.) solüsyonları in vitro fertilizasyon günü hazırlandı. In vitro fertilizasyon aşamasından önce, motil spermatozoonların seçilmesi için spermaya %45-90'lık *Percoll Gradient Tekniği* uygulandı (Machado vd., 2009). Bu amaçla, test edilmiş bir boğaya ait payetler içerisinde dondurulmuş sperma sıvı nitrojen içerisinde alınarak 37°C'lik su banyosunda 30 sn süreyle çözdürüldü. Çözdürülen payetteki sperma, içerisinde 3 ml *Percoll* (Sigma Aldrich Merck, Almanya) solüsyonu bulunan 15 ml'lik test tüpüne aktarıldı. Spermada bulunan canlı spermatozoitlerin ayrılması amacıyla 38,5 °C'deki ısıtmalı santrifüj (KUBOTA 5500, Japonya) kullanılarak 2100 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutuldu. Bu işlemten sonra tüpte kalan süpernatant vakum yoluyla uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan pelet (canlı spermatozoitler) üzerine 6 ml sperm yıkama solüsyonu (SWS) eklenip kapasite olmaları için 38,5 °C'de 1800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Benzer bir şekilde santrifüj sonrası tüpteki süpernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine 1 ml SWS eklendi (sperm süspansiyonu – ml) ve pipetasyonla nazikçe karıştırıldı. Elde edilen volüm daha sonra kullanılacak olan formülde S kodu olarak not edildi. Bu solüsyondan 50 µl'lik bir kısım daha sonra çift kamaralı Thoma lamında sayılmak üzere 4950 µl %3'lük NaCl solüsyonun içerisine alındı. Karışım vortex ve pipetleme yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra yaklaşık 20 µl'lik bir kısmı Thoma lamına aktarıldı (Şekil 2.14.). Mililitredeki spermatozoit konsantrasyonu hesaplandıktan sonra ilk sulandırmada 6×10^6 / ml olacak şekilde SWS eklendi. SWS miktarı (ml) formüle göre hesaplandı: $SWS (ml) = (Ortalama\ spermatozoit\ sayısı / 6) \times S-S$.

Hesaplama sonucuna göre SWS'nin eklenmesiyle ilk sulandırma olarak adlandırılan işlem yapıldı. Spermanın final konsantrasyonu olan 1×10^6 / ml'ye ulaşılabilmesi için ilk sulandırmadaki miktar kadar sperm dilüsyon solüsyonu (SDS) eklendi ve bu şekilde elde edilen karışımdaki spermatozoit konsantrasyonu 1×10^6 / ml oldu. Hazırlanan solüsyonlar fertilizasyondan üç saat önce 38,5 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde %80 nem ortamında ekilibre edildi.

Çizelge 2.2. SWS solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (10 ml)
BO solüsyonu	10 ml
Hipotaurin	0,01091 g
Heparin (Novo Heparin 1000 IU/ml)	100 µl

Çizelge 2.3. SDS solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (10 ml)
BO solüsyonu	10 ml
Kristalize ve liyofilize BSA	0,2 g

Çizelge 2.4. %90 Percoll Gradient solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (50 ml)
Percoll (%90)	45 ml
10X Sperm TL	5 ml
1 M Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	98,5 µl
0.1 M Magnezyum Klorid Hekzahidrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	197 µl
DL-laktik asit	184 µl
Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	0,1045 g
%0,5 Fenol Red	10 µl

Çizelge 2.5. %45 Percoll Gradient solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (10 ml)
BO	5 ml
%90 Percoll	5 ml

Çizelge 2.6. 10X Sperm TL stok solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (50 ml)
Sodyum klorür (NaCl)	4,675 g
Potasyum klorür (KCl)	0,23 g

Çizelge 2.6. Devam. 10X Sperm TL stok solüsyonunun hazırlanması

Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH_2PO_4)	0,035 g
HEPES	2,38 g

Çizelge 2.7. BO-A solüsyonunun hazırlanması

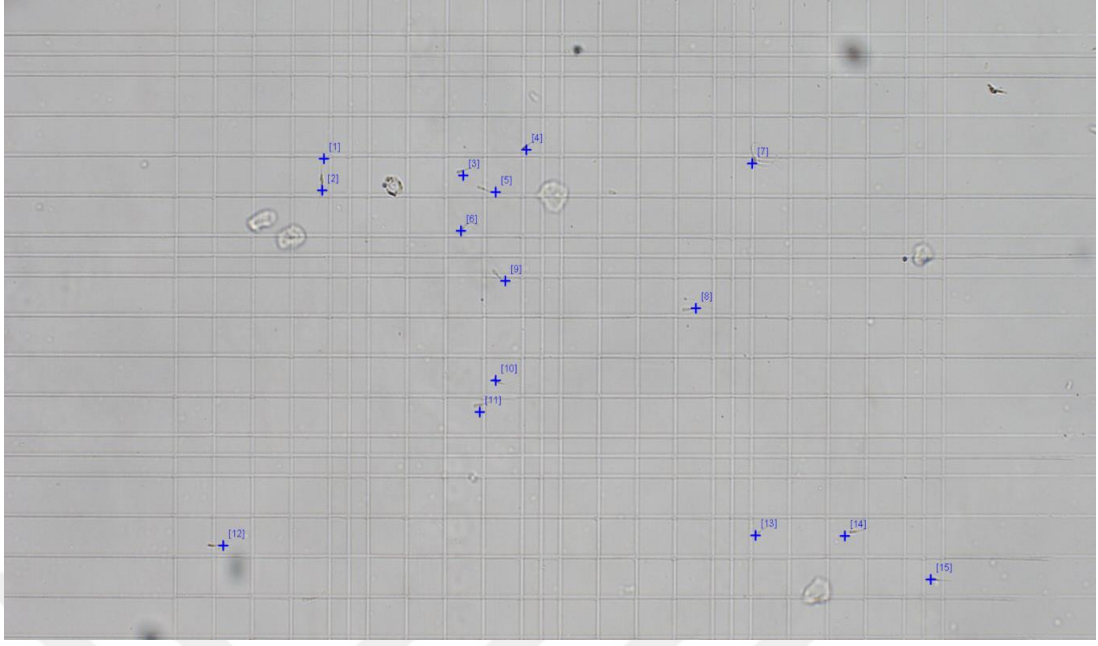
Kimyasal	Miktarı (500 ml)
NaCl	4,3092 g
KCl	0,1974 g
Kalsiyum Klorid Dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,2171 g
Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,0840 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0697 g
%0,5 Fenol Red	100 μl

Çizelge 2.8. BO-B solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (200 ml)
NaHCO_3	2,5873 g
%0,5 Fenol Red	40 μl

Çizelge 2.9. BO solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (100 ml)
Sodyum Piruvat	0,01375 g
BO-A solüsyonu	76 ml
BO-B solüsyonu	24 ml
Antibiyotik (penisilin-streptomisin)	100 μl



Şekil 2.14. Spermatozoonların Thoma lamında sayımı (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.5.2. Undefined Medyum Kullanarak Hazırlama

Motil spermatozoonların ayrılması için; test edilmiş bir boğaya ait 2 payet donmuş sperma sıvı nitrojen içerisinde alınarak 37 °C'lik su banyosunda 30 sn süreyle çözündürüldü. Çözündürülen payetteki sperma, içerisinde 2-4 ml BO-SemenPrep (IVF Bioscience-İngiltere) bulunan 15 ml'lik test tüpüne aktarıldı ve canlı spermatozoidlerin ayrılması amacıyla 24-25 °C'de 328 G'de 5 dakika (dk) süre ile santrifüj (KUBOTA 5500, Japonya) edildi. Bu işlemten sonra tüpte kalan süpernatant vakum yoluyla uzaklaştırıldı. Spermanın kapasitasyonu için; tüpte kalan pelet, üzerine 2-4 ml BO-SemenPrep eklendi, 24-25 °C'de 328 G'de tekrar 5 dk santrifüj edildi (Şekil 2.15.). Benzer şekilde santrifüj sonrası üste kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Spermatozoit sayısının belirlenmesi amacıyla; kalan spermatozoidlerden 25 µl alınarak üzerine 25 µl soğuk distile su eklendi ve yavaşça pipetlendi. Pipete edilen spermadan 10 µl alınarak Makler Counting Chamber'da (Sefi-Medical Instruments, İsrail) 10 adet karede sayıldı. Test tüpünde kalan sperm süspansiyonu ölçülerek (C) kayıt altına alındı. Bu sayma yönteminde hesaplanan sperm sayısı (A), milyon olarak ml başına düşen sperm sayısını vermiştir. Final sperm konsantrasyonu (B) 2×10^6 olacak şekilde sulandırma oranı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı: Sperm konsantrasyonu (A) = Final Konsantrasyonu (B) (2×10^6) x 500 µl / Sperm Süspansiyonu (C) ml ya da $A = B \times 500 \mu l / C$ şeklindedir.



Şekil 2.15. BO-SemenPrep ile spermanın hazırlanması (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

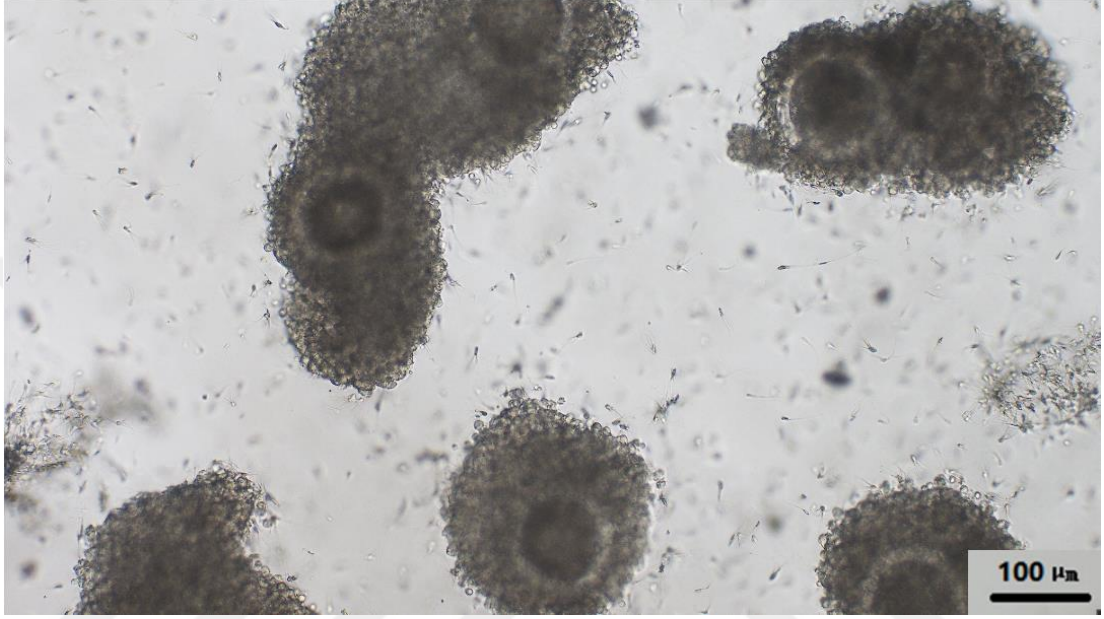
2.6. In Vitro Fertilizasyon

2.6.1. Defined Medyum Kullanarak In Vitro Fertilizasyon

Bu amaçla ilk olarak 35 mm çapındaki petri kaplarına 5 µl oosit yıkama solüsyonu (OWS, Çizelge 2.10.) mikro drop hazırlandıktan sonra daha sonra içerisinde 3×10^6 / ml spermatozoon bulunan süspansiyondan OWS drobunun üzerine 95 µl eklenerek damlacıkların volümünün 100 µl olması sağlandı. Hazırlanan damlacıkların üzeri mineral yağ ile kaplandıktan sonra oositler eklenene kadar %5 CO₂'li ortamda tekrar inkübe edildi. Bu sırada maturasyon vasatında bulunan oositler daha sonra OWS içerisine alındı ve kumulus ekspansiyonu değerlendirildi. Oositler bir önceki vasattan uzaklaştırılmaları amacıyla her bir petride en az 5 ayrı noktada yıkanmak kaydıyla 2 farklı petride yıkandı. Fertilizasyonun yapılacağı petride sperm aktivitesi kontrol edildikten sonra her bir damlacığa maksimum 20 oosit gelecek şekilde oositler fertilizasyon damlacıklarına aktarıldı ve fertilizasyon vasatına geçiş sırasında mümkün olduğunca az miktarda OWS aktarılmasına özen gösterildi. Oositler fertilizasyon vasatına yerleştirildikten sonra petri %5 CO₂'li inkübatör 38,5°C'de maksimum nemli ortamda 5 saat inkübe edildi (Şekil 2.16.).

Çizelge 2.10. OWS solüsyonunun hazırlanması

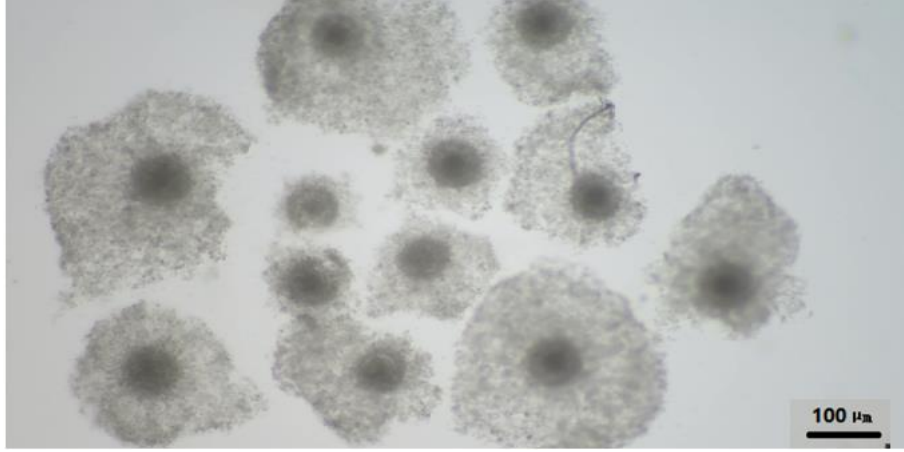
Kimyasal	Miktarı (50 ml)
BO solüsyonu	50 ml
Kristalize ve liyofilize BSA	0,5 g



Şekil 2.16. Spermatozoonlar ve oositlerin bir araya gelmesi (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.6.2. *Undefined* Medyum Kullanarak In Vitro Fertilizasyon

Maturasyon medyumundan alınan KOK'lar kumulus ekspansiyonu açısından değerlendirildi (Şekil 2.17.). Fertilizasyon için 100 µl Bovine-in vitro fertilizasyon (BO-IVF) (IVF Bioscience-İngiltere) dropları oluşturuldu. Oluşturulan drop içerisine bireysel olarak maturasyona alınan droplardaki kumulus oosit kompleksleri alındı ve üzerine 10 µl sperm eklendi (Şekil 2.18.) ve %6 CO₂ gaz içeren inkübatörde, 38,5 °C'de, maksimum nemli ortamda ve bir gece inkübe edildi.



Şekil 2.17. Maturasyon sonrası kumulus ekspansiyonu (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)



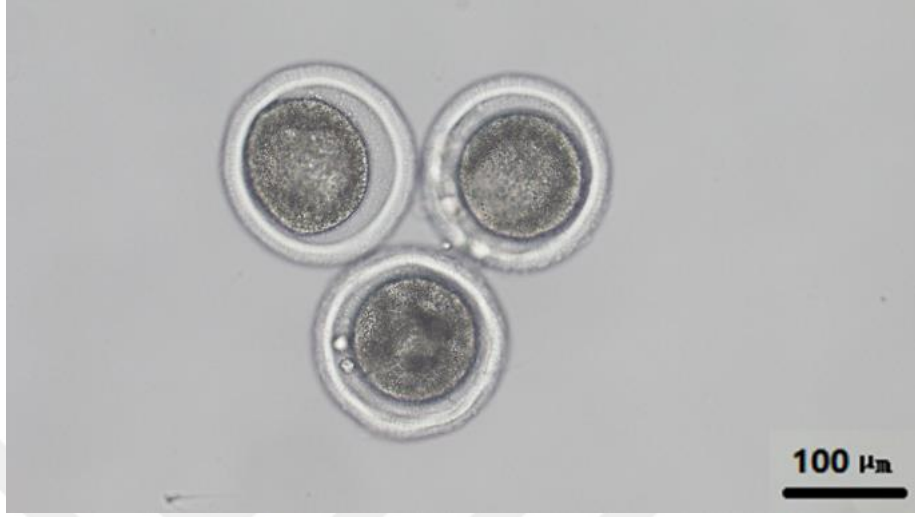
Şekil 2.18. In vitro fertilizasyon için oluşturulan BO-IVF dropları (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.7. Fertilizasyon Sonrası Oositlerin Denadüasyonu

2.7.1. Defined Medyum Kullanarak Fertilizasyon Sonrası Oositlerin Denadüasyonu

Fertilizasyon sürecinde kumulus hücreleri ve spermanın oosite yapışması nedeniyle döllenmiş oositler veya olası zigotlar, embriyo kültür medyumunda yukarıda anlatıldığı gibi iki farklı petride iki aşamada yıkandı. İç çapı bu embriyolar için özel olarak ayarlanmış olan denudasyon pipeti ve holderı (Vitrolife, İsveç) kullanılarak olası zigotların kumulus hücrelerinden ve spermadan uzaklaşması sağlandı (Şekil 2.19.). Zona pellusida'sı tamamen soyulmuş olan olası zigotlar daha sonra kültür medyumlarına aktarıldı. Kumulus hücrelerini

zona pellusida'dan ayırmak için pipetleme işlemi yapıldı, bu amaçla herhangi bir enzim uygulaması yapılmadı.



Şekil 2.19. Kumulus hücreleri uzaklaştırılmış oositler (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.7.2. Undefined Medyum Kullanarak Fertilizasyon Sonrası Oositlerin Denadüasyonu

16-20 saat döllenme işleminden sonra IVF petrisi inkübatörden çıkarıldı. Önceden ısıtılmış BO-WASH ile 100 µl'lik mikro droplar hazırlandı ve olası zigotlar bu mikro droplara aktarıldı. Zigotlar kumulus hücrelerinden tamamen arınana kadar denudasyon pipeti ve holderı (Vitrolife, İsveç) ile pipetleme işlemine tabi tutuldu. Bu işlem BO-WASH mikro droplarında kumuluslar tamamen soyulana kadar devam edildi. Olası zigotlar iki farklı petride BO-WASH solüsyonuyla pipetlenerek yıkandı ve daha sonra ekilibrasyon amacıyla Bovine-in vitro kültür (BO-IVC) (IVF Bioscience-İngiltere) içeren 35 mm'lik petriye alındı. Farklı droplarda fertilizasyona alınan olası zigotlar, kültür öncesinde minimum 2 saat ekilibre edilip BO-IVC solüsyonundan hazırlanan 100 µl'lik mikro droplara aktarıldı.

Ooplazma içinde spermatozoonun başının ve kuyruğunun saptanması, erkek ve dişi pronükleusları ile birinci ve ikinci polar cisimlerin ooplazmada belirlenmesi, zona pellusida veya perivitellin boşlukta spermatozoonun görülmesi, oosit aktivasyonunun görülmesi ve bölünmelerin tespit edilmesi in vitro fertilizasyonun şekillenmesinde ölçüt olarak kullanıldı.

2.8. In Vitro Embriyo Kùltürü

2.8.1. Defined Medyum Kullanarak In Vitro Embriyo Kùltürü

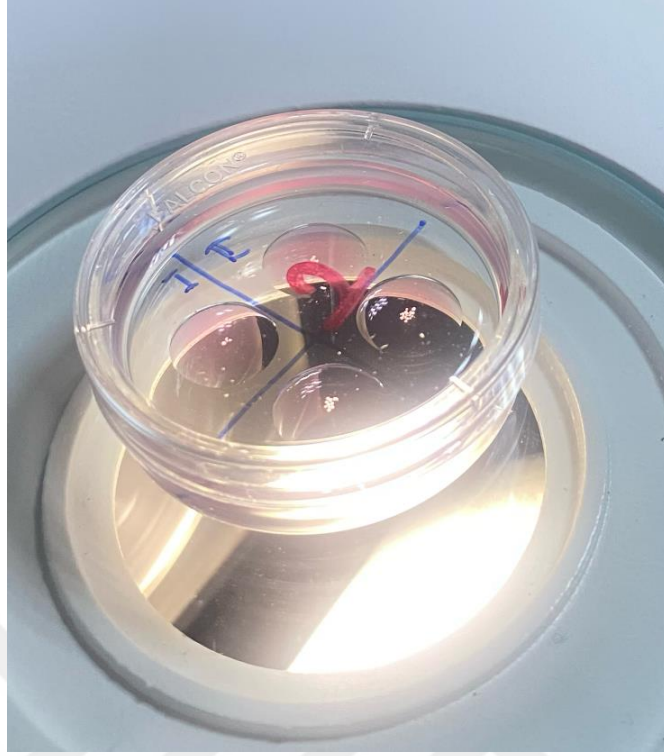
Embriyo kùltürü amacıyla önce CR1aa (Çizelge 2.11.) sonra CR1aa + %5 CS (Çizelge 2.12.) medyumunu kullanıldı. CR1aa medyumunu kùltür amacıyla hiç değıştirilmeden 7 gün süreyle kullanıldı. Hazırlanan ve %5 CO₂ inkübatörde inkübe edilen medyumlardan 35 mm'lik petri kaplarına 100'er µl kùltür medyumunu alındı, mikro droplar halinde eklendi ve üzeri mineral yağ ile kaplandı (Şekil 2.20.). Fertilizasyon medyumundan çıkarıldıktan sonra kùltür medyumuyla yıkanan embriyolar her bir damlacığa 20 muhtemel zigot olacak şekilde hazırlanan bu mikrodroplara aktarıldı. Kùltürün 48. saatinde inkübatörden alınan petriler stereo mikroskop altında incelendi ve bu inceleme sırasında tabana yapışmış olan embriyo varsa bunların ayrılması sağlandı ve gelişim evreleri kayıt altına alındı.

Çizelge 2.11. CR1aa solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (760 ml)
CR1-A solüsyonu	76 ml
CR1-B solüsyonu	20 ml
BME esansiyel amino asitler (X50)	2 ml
MEM esansiyel olmayan amino asitler (x100)	1 ml
L-glutamik asit	1 ml
BSA (yağ asiti içermeyen)	0,3 g
Antibiyotik (penisilin-streptomisin)	100 µl

Çizelge 2.12. CR1aa+%5 CS solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (105.26 ml)
CR1-aa	100 ml
CS	5,26 ml



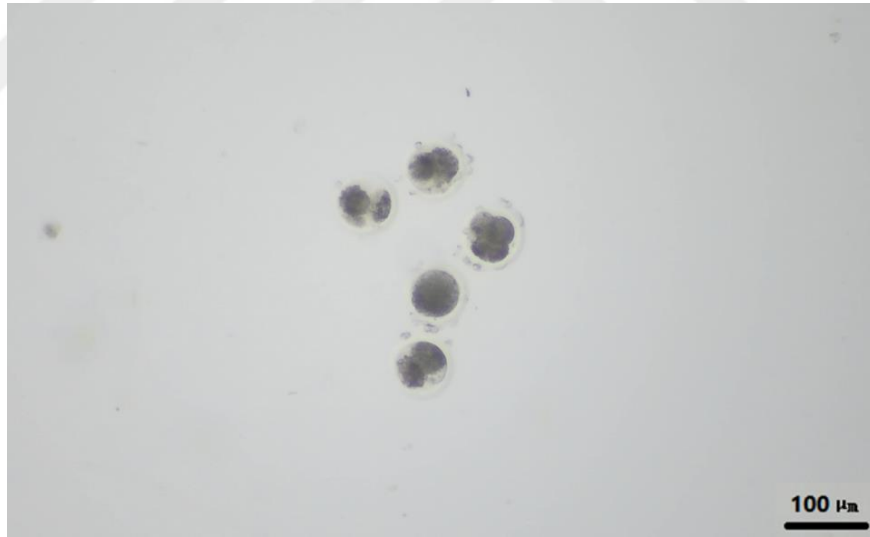
Şekil 2.20. In vitro kültür için oluşturulan droplar (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.8.2. Undefined Medyum Kullanarak In Vitro Embriyo Kültürü

50-100 µl BO-IVC içeren mikro droplar hazırlandı üzeri BO-OIL ile kaplandı. Hazırlanan bu solüsyon 38,8 °C'de, %6 oksijen (O₂), %6 CO₂ ve %88 N₂ içeren üç gazlı inkübatörde (Eppendorf CellXpert C170, ABD) en az 2 saat ekilibrasyona bırakıldı. 100 µl BO-IVC mikro dropları hazırlandı ve drop sayısı ile eşit sayıda olacak şekilde yıkama dropletleri hazırlandı (Şekil 2.21.). Kumulusları soyulan zigotlar yıkanarak ekilibre edilen BO-IVC solüsyonuna alındı. Embriyo kültürü 38,8 °C'de, %6 O₂, %6 CO₂ ve % 88 N₂ içeren üç gazlı inkübatörde BO-IVC solüsyonu kullanılarak 7 gün süreyle gerçekleştirildi. BO-IVC vasatı kültür sırasında hiç değiştirilmeden 7 gün süreyle kullanıldı. IVC sırasında embriyolar 24-48 saat sonra (Şekil 2.22.) ve 7-9 günde stereo mikroskop altında değerlendirildi ve kayıt altına alındı.



Şekil 2.21. BO-IVC kültür ve yıkama dropları (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)



Şekil 2.22. BO-IVC in vitro kültürde ilk 48 saat bölünme aşamasındaki embriyolar (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

Selçuk Üniversitesinde *undefined* medyum ile üretilen embriyolar kültür medyumunda payetlendi (Şekil 2.23.) ve payetler 37°C’de sıcaklığı sabit tutan embriyo transportunda kullanılan taşıma çantası (Minitube, Almanya) içerisine yerleştirildi ve 2-4 saat içerisinde laboratuvara getirildi. Payet içerisindeki embriyolar 35 mm petrilere oluşturulan BO-IVC (IVF Bioscience, İngiltere) kültür droplarına aktarıldı. Biyopsi medyumuna ileştirme işlemi sonrası embriyolar biyopsi işlemine alındı.

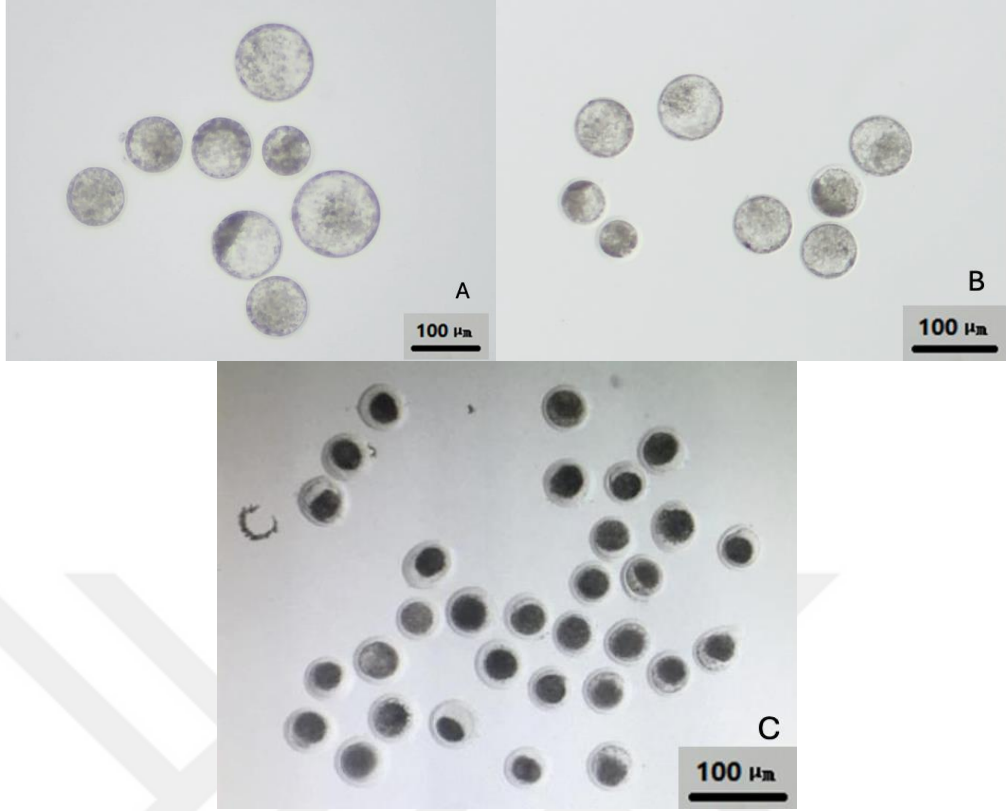


Şekil 2.23. Embriyoların taşıma için kültür medyumu içerisinde payetlenmesi ve mikroskop görünümü (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.9. Blastosistlerin Morfolojik Değerlendirilmesi

Kültür sonrası 7-9. günlerde elde edilen embriyolar IETS kriterlerine göre (Wright, 2010) inverted mikroskop (*Olympus IX-73*, Japonya) kullanılarak 4 kategoride sınıflandırıldı ve kalite kodu I olan blastosistler kullanıldı (Şekil 2.24.).

- Kalite kodu I (Çok iyi-iyi): Simetrik ve yuvarlak embriyonik kütle ile büyüklük, renk ve yoğunluk bakımından uniform blastomerleri olan ve yapısı bozulmamış ($\geq \%85$) hücresel materyale sahip olan blastosistler;
- Kalite kodu II (Orta): Yapısı bozulmamış $\geq \%50$ hücresel materyal ve canlı embriyonik kütle ile blastomerlerinin büyüklük, renk ve yoğunluğunda orta derecede düzensizlikler olan ve $\leq \%25$ oranında fragmantasyon gözlenen blastosistler;
- Kalite kodu III (Kötü): Blastomerlerinin büyüklük, renk ve yoğunluğunda belirgin düzensizlikler olan, yapısı bozulmamış en fazla $\%25$ hücresel materyal ve canlı embriyonik kütle içeren blastosistler;
- Kalite kodu IV (Ölü veya Dejenere): Dejenere embriyolar, oositler ve gelişim zamanına göre az sayıda blastomere sahip blastosistler olmak üzere embriyo sınıflandırması yapıldı.



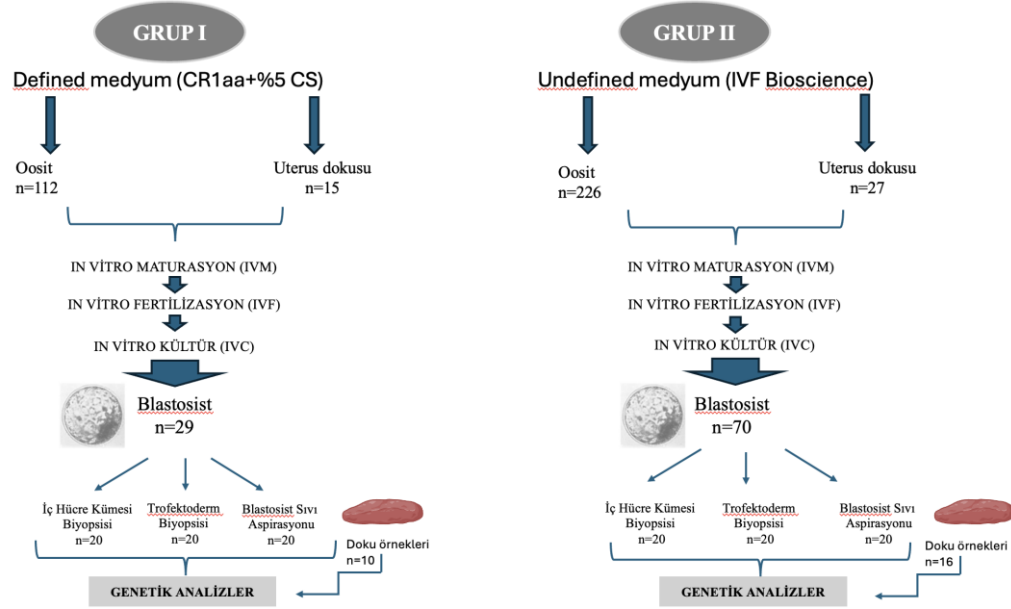
Şekil 2.24. BO-IVC in vitro kültür 7. Gün blastosist ve dejenere blastosist görüntüleri (A,B) (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı), CR1aa+ %5 CS in vitro kültür 7. Gün blastosist ve dejenere blastosist görüntüleri (C) (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.10. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Mezbaha materyalinden elde edilen oositler laboratuvara getirme, oosit aspirasyonu, in vitro maturasyon, in vitro fertilizasyon ve in vitro kültür aşamalarında bireysel olarak çalışıldı ve oositleri toplanan sığır örnekleri ile uyumlu numaralandırma işlemi yapıldı.

Grup I *defined* medyum ile üretilen embriyolara iç hücre kümesi biyopsisi (n=20), trofektoderm biyopsisi (n=20) ve blastosist sıvı aspirasyonu (n=20) yapıldı. *Defined* medyum ile üretilen embriyoların elde edildiği hayvanların uterus dokularından (n=15) örnek alındı. Fakat embriyoların kalite sınıflandırması, *expanded* blastosistlerin biyopsi işlemine alınması ve bazı ineklerden birden fazla *expanded* blastosist elde edilesi sebebiyle toplam 10 adet doku örneği analize alınmıştır. Grup II *undefined* medyum ile üretilen embriyolara iç hücre kümesi biyopsisi (n=20), trofektoderm biyopsisi (n=20) ve blastosist sıvı aspirasyonu (n=20) yapıldı. *Undefined* medyum ile üretilen embriyoların elde edildiği ovaryum dokularından (n=27) örnek alındı. Fakat embriyoların kalite sınıflandırması, *expanded* blastosistlerin biyopsi işlemine alınması ve bazı ineklerden birden fazla *expanded* blastosist elde edilesi sebebiyle toplam 16 adet doku örneği analize alınmıştır (Şekil 2.25.).

Grup I ve Grup II’de seçilen embriyolara sırasıyla blastosist sıvı aspirasyonu, trofektoderm ve iç hücre kümesi biyopsi işlemleri yapıldı. Trofektoderm ve iç hücre kümesi biyopsisi blastosist sıvı aspirasyonu için kontrol grubu olarak kabul edildi.

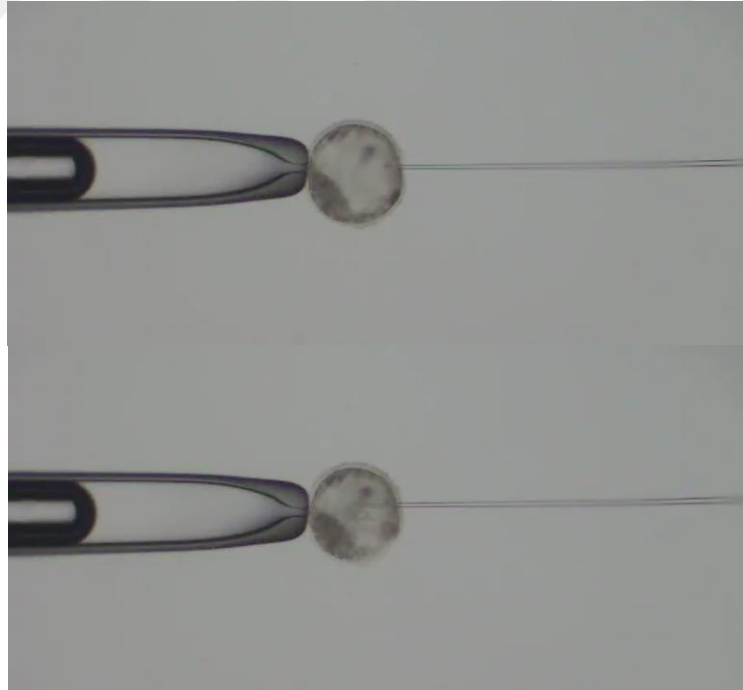


Şekil 2.25. Grupların oluşturulması

2.11. Blastosist Sıvı Aspirasyonu ve Re-ekspansiyon

Blastosist sıvı aspirasyonu Jensen vd. (2014)’nin belirttiği şekilde yapıldı. Buna göre; blastosist sıvısı, inverted mikroskopta Eppendorf Transferrmann®4R mikromanipülatör kullanılarak aspire edildi. Bu işlem sırasında embriyoların sabitlenmesi amacıyla Cook Holding pipet (K-HPIP 2135) ve aspirasyon için Cook mikroenjeksiyon pipetleri (K-MPIP 3135) kullanıldı (Şekil 2.26.) . İlk önce 90 mm’lik petri kabına *defined* medyum ile üretilen embriyolar için 5-10 µl’lik IVC dropları hazırlandı, bu dropların yanına ise 3 µl’lik fosfat tamponlu solüsyonu (PBS) içeren droplar yerleştirilerek üzerleri mineral yağ ile kaplandı. PBS drop sayısı IVC drobuna ilave edilen embriyo sayısı kadar olacak şekilde hazırlandı. ICSI pipetine bir miktar PBS çekilerek pipetin PBS ile kaplanması sağlandı. IVC medyumuna aktarılan embriyolardan biri, ICM holding pipet tarafına gelecek şekilde sabitlendi. ICSI pipeti ile nazikçe blastosist kavitesine girildikten sonra, blastosist tamamen kollabe oluncaya kadar aspirasyon işlemine devam edildi. ICSI pipeti PBS drobuna yönlendirilerek aspire edilen blastosel sıvısı buraya aktarıldı. Sıvı aspirasyonu yapılan her bir embriyo için ayrı birer ICSI pipeti kullanıldı. Tüm embriyolar aspire edildikten sonra, blastosel sıvısı içeren PBS dropları bu sefer stereo mikroskop altında otomatik pipet yardımıyla alınarak 500 µl’lik protein free eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüpler analizler yapılınca kadar -20°C’de dondurularak

saklandı. Blastosist sıvısı aspire edilen ve kollabe olan blastosistler 3-5 saat tekrar kültüre alındı ve re-ekspansiyon gözlenenler için bir sonraki biyopsi basamağına devam edildi. *Undefined* medyum ile üretilen embriyolar için 5-10 µl'lik BO-IVC dropları hazırlandı, bu dropların yanına ise 3 µl'lik BO-BIOPSY içeren droplar yerleştirilerek üzerleri mineral yağ ile kaplandı. BO-BIOPSY drop sayısı BO-IVC drobuna ilave edilen embriyo sayısı kadar olacak şekilde hazırlandı. ICSI pipetine bir miktar BO-BIOPSY çekilerek pipetin kaplanması sağlandı. BO-IVC medyumuna aktarılan embriyolardan biri, iç hücre kümesi ICM holding pipet tarafına gelecek şekilde sabitlendi. ICSI pipeti ile nazıkçe blastosist kavitesine girildikten sonra, blastosist tamamen kollabe oluncaya kadar aspirasyon işlemine devam edildi. ICSI pipeti BO-BIOPSY drobuna yönlendirilerek aspire edilen blastosel sıvısı buraya aktarıldı. Sıvı aspirasyonu yapılan her bir embriyo için ayrı birer ICSI pipeti kullanıldı. Tüm embriyolar aspire edildikten sonra, blastosel sıvısı içeren BO-BIOPSY dropları bu sefer stereo mikroskop altında otomatik pipet yardımıyla alınarak 500 µl'lik protein free eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüpler analizler yapılncaya kadar -20°C'de dondurularak saklandı. Blastosist sıvısı aspire edilen ve kollabe olan blastosistler 3-5 saat tekrar kültüre alındı ve re-ekspansiyon gözlenenler için bir sonraki biyopsi basamağına devam edildi.

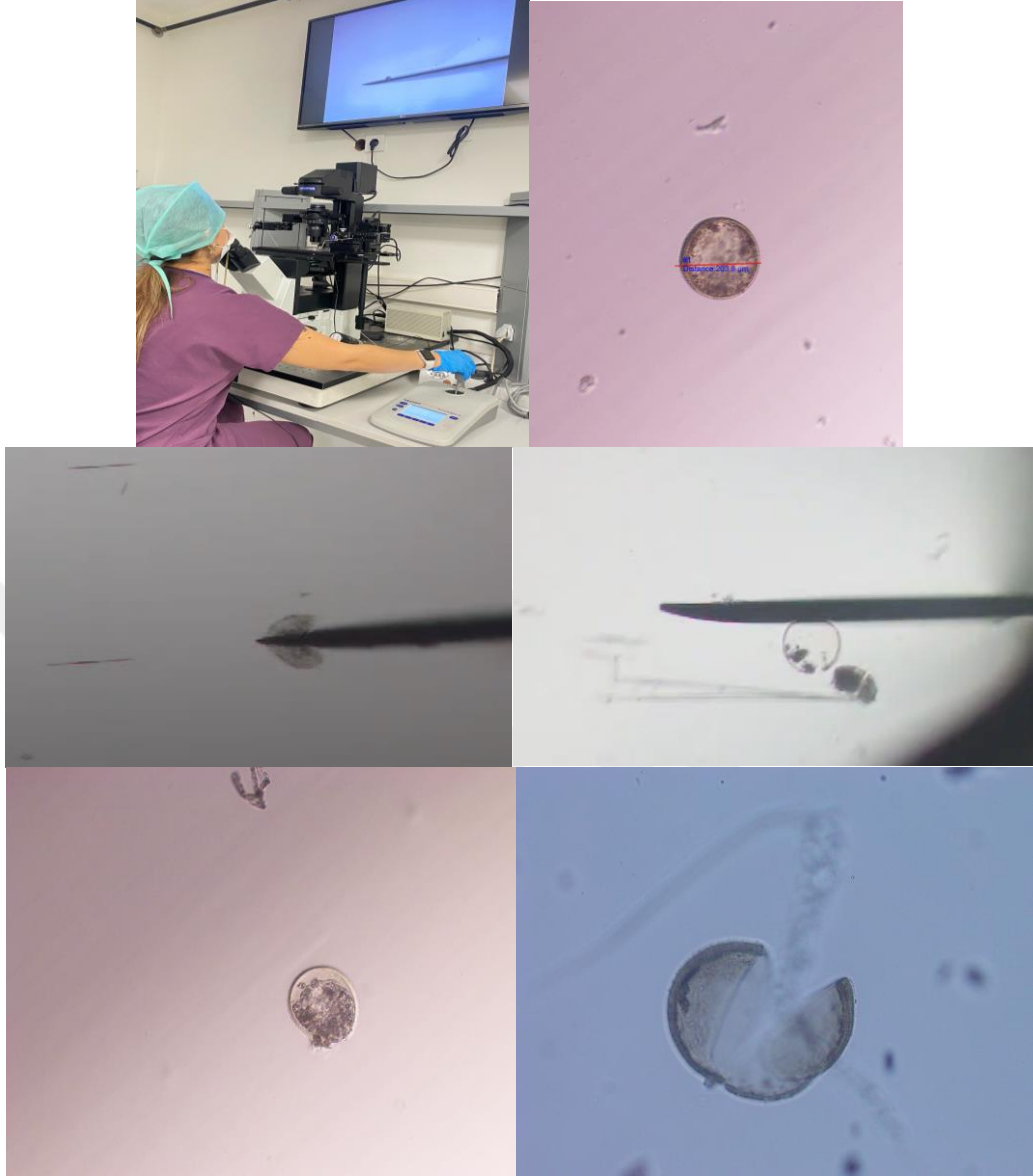


Şekil 2.26. Blastosist sıvısının ICSI pipeti ile aspire edilmesi (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

2.12. Trofektoderm (TE) ve İç Hücre Kümesi (ICM) Biyopsisi

Trofoblast ve ICM biyopsisi, blastosist sıvı aspirasyonunun doğruluğunu teyit etmek amacıyla de Sousa vd. (2017)'nin belirttiği şekilde normalizasyon sağlanıncaya kadar uygulandı. *Defined* medyum kullanarak elde edilen ve blastosist sıvı aspirasyonu yapıldıktan sonra re-ekspansiyon görülen blastosistlerin trofoblast hücreleri mikromanipülatör vasıtasıyla, 15° mikro *blade* (Bio cut blade, Feather Safety Razor Co Ltd, Osaka, Japonya) ile PBS solüsyonu içerisinde kesildi (Şekil 2.27.). *Undefined* medyum kullanarak elde edilen ve blastosist sıvı aspirasyonu yapıldıktan sonra re-ekspansiyon görülen blastosistlerin trofoblast hücreleri mikromanipülatör vasıtasıyla, 15° mikro *blade* (Bio cut blade, Feather Safety Razor Co Ltd, Osaka, Japonya) ile BO-BIOPSY solüsyonu içerisinde kesildi. Bu işlem sırasında embriyoların sabitlenmesi amacıyla *holding* pipet (Cook, K-HPIP 2135) ve kesme işlemi için 15° mikro *blade* (Bio cut blade, Feather Safety Razor Co Ltd, Osaka, Japonya) kullanıldı. *Holding* pipet (Cook, K-HPIP 2135 ile sabitlenen embriyonun bir kenarına 15° mikro *blade* (Bio cut blade, Feather Safety Razor Co Ltd, Osaka, Japonya) hafifçe bastırılarak sağa sola yavaş hareketlerle embriyonun bir kısmı kesilene kadar devam edildi. Kesilen parçanın embriyonun %20'sinden az veya %20'si kadar olmasına ve ICM'ye zıt bölgeden alınmasına dikkat edildi.

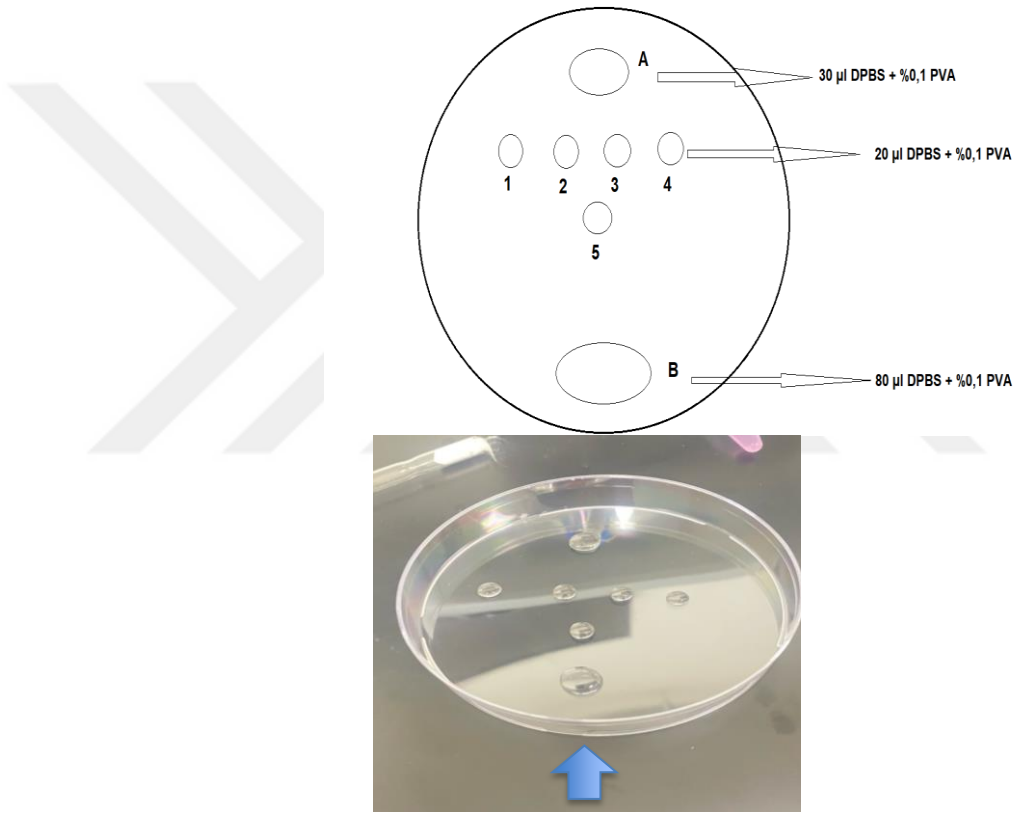
İç hücre kümesi ise trofoektoderm biyopsisi yapıldıktan sonra yukarıda anlatıldığı gibi 15° mikro *blade* ve blastomer aspirasyon pipeti (Cook, K-EBPH-3035) kullanılarak elde edildi. *Defined* medyum ile üretilen blastosistler PBS içerisinde *holding* pipet (Cook, K-HPIP 2135) ile ICM olan bölgesi saat dokuz yönünde sabitlendi. TE biyopsisi sonucu oluşan açıklıktan blastomer aspirasyon pipeti (Cook, K-EBPH-3035) ile ICM hücrelerinden ~ 10 adet alındı. *Undefined* medyum ile üretilen blastosistler BO-BIOPSY (IVF Bioscience-İngiltere) içerisinde Cook *Holding* pipet (K-HPIP 2135) ile ICM olan bölgesi saat dokuz yönünde sabitlendi. Trofektoderm biyopsisi sonucu oluşan açıklıktan blastomer aspirasyon pipeti (Cook, K-EBPH-3035) ile ICM hücrelerinden alındı.



Şekil 2.27. Mikro blade ile embriyo biyopsisi (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji IVF Laboratuvarı)

Embriyo biyopsisi yapıldıktan sonra biyopsi materyali *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) ve polivinil alkol (PVA) içeren A damlacığına bırakıldı. Pipet ucu B damlacığı kullanılarak 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra 1 numaralı damlacıktan yaklaşık 2 µl sıvı alınarak biyopsi materyali A damlacığından alınarak 1 numaralı damlacığa bırakıldı. Pipet ucu B damlacığı kullanılarak 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra 2 numaralı damlacıktan yaklaşık 2 µl sıvı alınarak biyopsi materyali 1 numaradan alınarak 2 numaralı damlacığa bırakıldı. Pipet ucu B damlacığı kullanılarak 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra 3 numaralı damlacıktan yaklaşık 2 µl sıvı alınarak biyopsi materyali 2 numaradan alınarak 3 numaralı damlacığa bırakıldı. Pipet ucu B damlacığı kullanılarak 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra 4 numaralı damlacıktan yaklaşık 2 µl sıvı alınarak biyopsi

materyali 3 numaradan alınarak 4 numaralı damlacığa bırakıldı. Pipet ucu B damlacığı kullanılarak 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra 5 numaralı damlacıktan yaklaşık 2 µl sıvı alınarak biyopsi materyali 0,2 ml'lik PCR tüplerine köpürtme yapılmadan aktarıldı. Pipet ucu yıkanmadan 4 numaralı damlacıktan 2 µl sıvı daha alınarak başka bir 0,2 ml'lik PCR tüpüne köpürtme yapılmadan aktarıldı ve örneğe ait negatif kontrol grubu olarak not edildi. Örnekler -20 °C'de saklandı. Başka embriyo ile çalışma yapılmadan önce pipet ucu değiştirildi, her biyopsi için farklı petrilere yıkama tekrarı yapıldı (Şekil 2.28.).



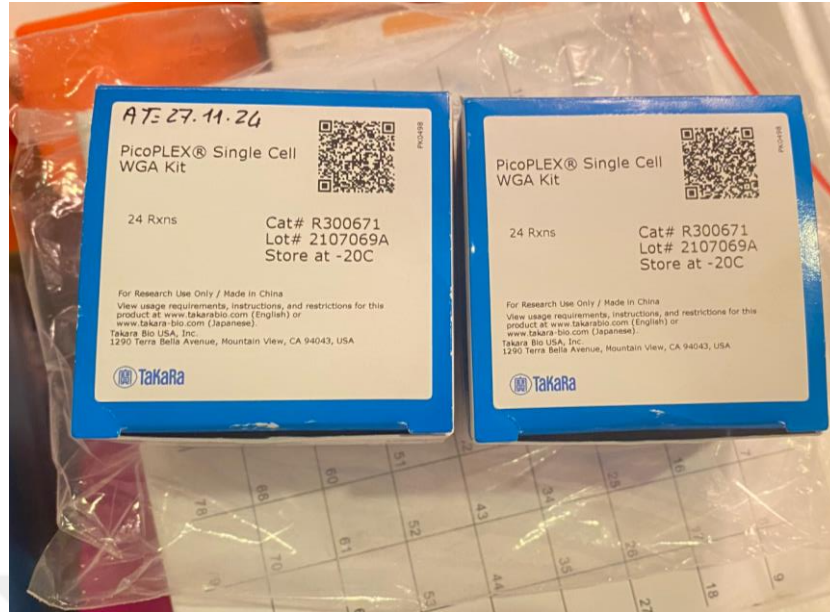
Şekil 2.28. Embriyolardan alınan TE ve ICM biyopsi materyallerinin yıkama yapıldığı dropların şematik ve petrideki (mavi ok) görünümü

2.13. Biyopsi Materyalinden DNA İzolasyonu ve Zenginleştirme

Blastosentez ile elde edilen blastosist sıvısı, trofoblast ve iç hücre kümesi örneklerini içeren tüpler buz üzerinde genetik laboratuvarına ulaştırıldı. DNA zenginleştirilmesi amacıyla pikogram seviyesinde DNA miktarını ileri analizlerde kullanılabilecek mikrogram seviyesine çıkartabilen bir ticari kit (PicoPLEX Single Cell WGA Kit, Takara Bio USA Sığır, ABD) (Şekil 2.29.) ve kitin önerileri doğrultusunda protokol uygulanması planlandı (Şekil 2.30.). Zenginleştirme işlemi PCR'a benzer mekanizması nedeniyle ısı döngü cihazında (Eppendorf,

MasterCycler, Almanya) yapıldı. Düşük miktarda DNA içeren blastosist sıvısı ve trofoblast örneklerinde DNA izolasyonu ve zenginleştirme için kullanılan işlemler sırayla DNA ekstraksiyon işlemi, ön amplifikasyon ve amplifikasyondur. DNA ekstraksiyon işleminde 5 örnek için master mix ekstraksiyon enzim bufferı (24 µl) ve hücre ekstraksiyon enzimi (1 µl) olacak şekilde bir tüpte karıştırılıp örnek başı 5 µl olacak şekilde dağıtıldı. Ardından örnekler ısı döngü cihazına konulup 75 °C'de 10 dk ve 95 °C'de 4 dk tutuldu. Örnekler santrifüj edildikten sonra bir tüpte ön amplifikasyon için Pre-Amp Buffer (24 µl) ve Pre-Amp enzimi (1µl) karıştırılıp örnek başı 5 µl olacak şekilde dağıtıldı. Örnekler ısı döngü cihazına konulup 95 °C'de ilk denaturasyonun ardından 12 kere 95 °C'de 15 sn, 15 °C'de 50 sn, 25 °C'de 40 sn, 35 °C'de 30 sn, 65 °C'de 40 sn, 75 °C'de 40 sn döngüye girdi ardından 4 °C'de reaksiyon sonlandırıldı (Şekil 2.32.). Cihazdan alınan örnekler kısa bir santrifüj işleminin ardından buza alınarak amplifikasyona geçildi. Amplifikasyon master karışımı amplifikasyon bufferı (125 µl), amplifikasyon enzimi (4 µl) ve nükleazdan arı su (171 µl) şeklinde hazırlanarak örnek başı 60 µl olacak şekilde dağıtıldı. Isı döngü cihazına konulan örneklere önce 95 °C'de 2 dk denatürasyonun ardından 14 kere 95 °C'de 15 sn, 65°C'de 1 dk ve 75 °C'de 1 dk sıcaklık koşulları uygulandı. Zenginleştirme işlemi sonucunda toplamda 75 µl DNA elde edilmesi öngörüldü. Elde edilen bu DNA eşit hacimde iki ayrı tüpe bölündü ve analizler yapılınca kadar -20 °C'de saklandı. İzolasyon sonrasında elde edilen DNA'nın miktarı ve PCR inhibitörlerinin uzaklaştırma başarısını test etmek için elde edilen DNA kalitesi 260/280 nm ve 260/230 nm dalga boyunda Nanodrop ND-2000 ile kontrol edildi (Şekil 2.33.).

Uterustan alınan doku örnekleri küçük parçalar (≤ 25 mg) halinde kesilerek mikrosantrifüj tüpüne alındı. Dokulardan DNA izolasyonu, spin kolon temelli ticari bir kit (Qiagen DNA Mini Kit, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Dokuların üzerine 180 µl Buffer ATL ve 20 µl Proteinaz K eklendi, vorteks işlemi yapıldı ve 56 °C'de dokular lize olana kadar 1-3 saat inkübasyona alındı (Şekil 2.31.). İnkübasyon sırasında birkaç kez daha vorteks işlemi yapıldı. Daha sonra 200 µl Buffer AL eklendi ve 15 sn vorteks işlemi yapıldı. 70°C'de 10 dakika inkübasyona alındı. 5-10 dk santrifüj edildi. Üzerine %96 etanolden 200 µl eklendi ve 15 sn vorteks işlemi yapıldı. Karışım 2 ml toplama tüpü içine yerleştirilen QIAamp mini spin kolon saflaştırma tüpüne alındı ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Akış tüpü ve toplama tüpü uzaklaştırıldı. Yeni bir 2 ml toplama tüpü içine QIAamp mini spin kolon saflaştırma tüpü yerleştirildi ve 500 µl Buffer AW1 eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Akış tüpü ve toplama tüpü uzaklaştırıldı. Yeni bir 2 ml toplama tüpü içine QIAamp mini spin kolon saflaştırma tüpü yerleştirildi ve 500 µl Buffer AW2 eklenerek 14,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Akış tüpü ve toplama tüpü uzaklaştırıldı.

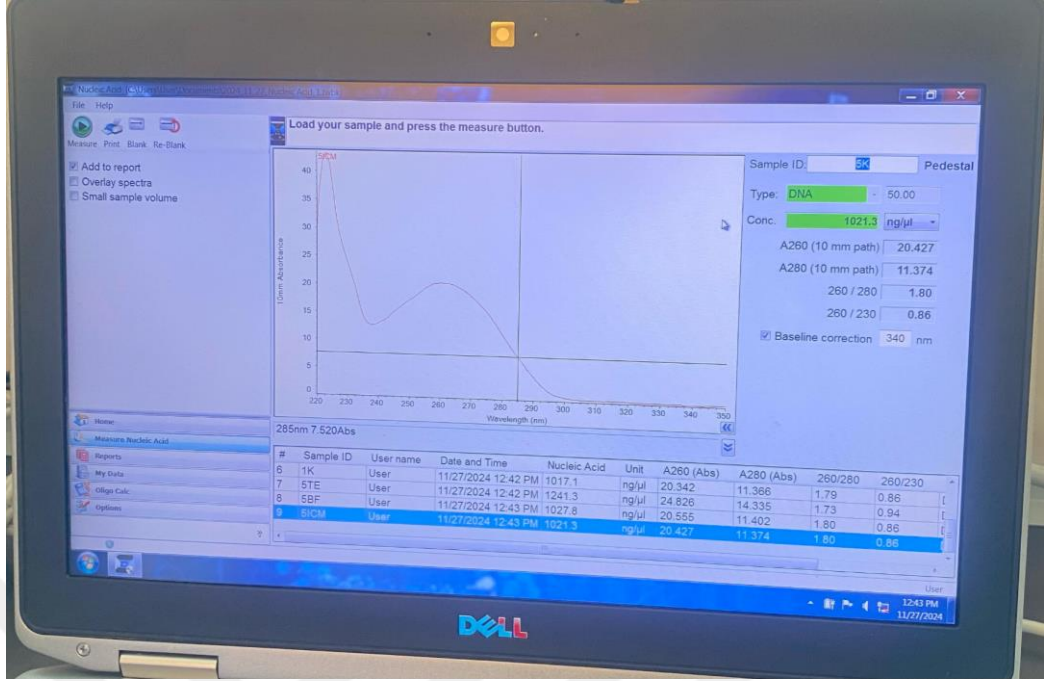




Şekil 2.31. İnek doku örneklerinden DNA izolasyonu (Genoks, Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi, Ankara)



Şekil 2.32. Embriyo biyopsi örneklerine pre-amplifikasyon aşaması (Genoks, Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi, Ankara)



Şekil 2.33. DNA kalitesinin 260/280nm dalga boyunda kontrolü (Genoks, Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi, Ankara)

2.14. Kısa Tandem Tekrar Dizilerinin Analizi

Genom üzerinde bulunan ve oldukça polimorfik olan kısa ardışık dizilerin ya da bir diğer adıyla STR lokuslarının PCR yoluyla çoğaltılmasıyla bireylerin DNA profilleri oluşturulur. Bu STR lokusları dizi-spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır ve elde edilen DNA parçaları elektroforez ile ayrıştırılarak tespit edilir. Erken dönem embriyogenezis aşamasında genomik esneklik söz konusu olduğundan blastosist sıvısındaki genetik materyalin kökeninin aydınlatılması gerekmektedir. Bu nedenle, kültür ortamından veya hücresel geçiş yoluyla farklı bir genetik materyalin blastosist sıvısında bulunup bulunmadığı tespit edilmelidir. 2-10 baz çifti tekrarlarından oluşan “mikrosatellit” olarak adlandırılan kısa ardışık tekrar dizileridir. STR dizilerinin tekrar sayısı bireysel olarak farklıdır. Otozomal STR’ler adli tıpta, gonozomal STR’ler ise akrabalık tayininde kullanılmaktadır. Sığır genomunun kodlamayan intronik bölgelerinde bulunur ve genetik çalışmalar için önemli belirteçlerdir. Bu allellerdeki mikrosatellit tekrarların analizi ile ebeveyn kökenlerinin belirlenmesi, genetik değişkenlik, genom haritalama, akrabalık ilişkilerinin değerlendirilmesi, bazı hastalıkların belirlenmesi ve verim özelliklerindeki varyasyonların belirlenmesi mümkündür (Teneva vd., 2018). Tanımlanmış STR lokusları; TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, BM1818, ETH225, BM1824, HAUT27, ETH3, CSRM60, CSSM66, ILSTS006 şeklindedir (Van de Goor vd., 2009).

Bu çalışmada, annenin ovaryumundan elde edilen DNA ile embriyo biyopsisinden elde edilen DNA örneklerine STR analizi yapıldı ve annenin genetik materyali ile embriyonun genetik materyali karşılaştırıldı. Önerilen tez çalışmasında sığır numuneleri için; Seqline Bovine 19-plex Genotyping Kit kullanılarak Proflex Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında üreticinin talimatlarına uygun olarak amplifiye edildi (Şekil 2.34.). Kapiller elektroforez ile analiz işlemi Applied Biosystems® Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzers (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında "GeneScan software" kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 2.35.). Bu çalışmada farklı izolasyon yöntemleri ile elde edilen DNA'lardan DNA profili oluşturma başarısı test edildi. İzole edilen DNA'lar ile oluşturulan profillerin doğruluğunu test etmek için embriyo biyopsi materyalleri, blastosist sıvı örnekleri ve oositleri toplanarak embriyo elde edilen hayvanların ovaryum doku örnekleri ile DNA profili oluşturuldu.



Şekil 2.34. DNA zenginleştirme işlemi yapılan biyopsi örnekleri ve DNA izolasyonu yapılan sığır dokularına Seqline Bovine 19-plex Genotyping Kit ile amplifikasyon işlemi (EYS Medikal&Laboratuvar Projeleri, İstanbul)



Şekil 2.35. Amplifikasyon işlemi yapılan örneklerin kapiller elektroforez ile analizi (EYS Medikal&Laboratuvar Projeleri, İstanbul)



Şekil 2.36. Amplifikasyon işlemi yapılan örneklerin kapiller elektroforez ile analizi sonucu STR lokuslarının belirlenmesi (EYS Medikal&Laboratuvar Projeleri, İstanbul)

3. BULGULAR

Bu çalışmada, *defined* ve *undefined* medyum kullanılarak in vitro üretilen sığır embriyolarına *expanded* blastosist evresinde trofektoderm, iç hücre kümesi ve blastosist sıvı aspirasyonu olmak üzere üç farklı biyopsi yöntemi uygulanmıştır ve blastosist sıvısından genomik DNA elde edilmesi ve diğer biyopsi yöntemleri ile doğrulanması amaçlanmıştır. Sunulan tez çalışmasında, *defined* medyum ile toplam 30 adet ovaryum toplanmış ve toplam 112 adet kumulus oosit kompleksi aspirasyonu yapılmıştır. Aspirasyonu yapılan 112 adet kumulus oosit kompleksinden in vitro fertilizasyon sonrası 7., 8., ve 9. günlerde yapılan gelişim evresi kontrollerinde toplam 29 adet blastosist elde edilmiştir. Bu grupta kalite kodu I olan 20 adet blastosist biyopsi işlemine alınmıştır. Embriyo eldesinde kullanılan ovaryumlardan ve yine aynı hayvana ait uterus dokularından ayrı ayrı olmak üzere toplam 10 adet doku örneği alınmıştır. *Undefined* medyum ile toplam 54 adet ovaryum toplanmış ve toplam 226 adet kumulus oosit kompleksi aspirasyonu yapılmıştır. Aspirasyonu yapılan 226 adet kumulus oosit kompleksinden in vitro fertilizasyon sonrası 7., 8., ve 9. günlerde yapılan gelişim evresi kontrollerinde toplam 70 adet blastosist elde edilmiştir. Bu grupta kalite kodu I olan 20 adet blastosist biyopsi işlemine alınmıştır. Embriyo eldesinde kullanılan ovaryumlardan ve yine aynı hayvana ait uterus dokularından ayrı ayrı olmak üzere toplam 16 adet doku örneği alınmıştır. Grup I için blastosist oranı %25,9 olarak bulunmuş, Grup II için ise %30,97 olarak bulunmuştur. Grup I ve Grup II'ye dahil edilen embriyoların elde edildikleri sığra ait ovaryumların her birinden oosit aspirasyonu yapılmış ve bireysel kültür droplarında gelişim takip edilmiş ve bireysel ile toplam blastosist gelişim oranları değerlendirilmiştir (Çizelge 3.1., Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.1. Grup I (*defined* medyum) bireysel ve toplam kumulus oosit kompleksi (KOK) sayısı, blastosist sayısı, biyopsi sayısı ve blastosist oranı yüzdesi

DENEY NO.	DROP BAŞINA KOK SAYISI	7-9 GÜN TOPLAM BLASTOSİST SAYISI	BİYOPSİ SAYISI	BLASTOSİST ORANI %
1	6	1	1	%16,66
2	4	2	1	%50,00
3	14	4	4	%28,57
4	9	3	1	%33,33
5	4	1	0	%25,00
6	7	3	2	%42,85
7	10	3	3	%30,00
8	12	2	2	%16,66
9	5	1	1	%20,00
10	12	3	2	%25,00
11	4	1	0	%25,00
12	7	2	0	%28,57
13	12	3	3	%25,00
14	3	0	0	%00,00
15	3	0	0	%00,00
TOPLAM:	112	29	20	%25,89

Çizelge 3.2. Grup II (*undefined* medyum) bireysel ve toplam kumulus oosit kompleksi (KOK) sayısı, blastosist sayısı, biyopsi sayısı ve blastosist oranı yüzdesi

DENEY NO.	DROP BAŞINA KOK SAYISI	7-9 GÜN TOPLAM BLASTOSİST SAYISI	BİYOPSİ SAYISI	BLASTOSİST ORANI %
1	9	1	1	%11,10
2	8	5	3	%62,50
3	19	3	3	%15,78
4	15	3	1	%20,00
5	4	1	0	%25,00
6	10	0	0	%00,00
7	10	3	3	%30,00
8	14	2	2	%20,00
9	12	3	2	%25,00
10	4	0	0	%00,00
11	2	0	0	%00,00
12	7	0	0	%00,00
13	8	3	3	%37,50
14	3	1	0	%33,30
15	7	1	0	%14,28
16	3	0	0	%00,00
17	15	4	3	%26,66
18	5	4	1	%80,00
19	12	8	2	%66,60
20	7	5	1	%71,42
21	11	3	2	%27,27
22	6	2	1	%33,33
23	3	2	0	%66,60
24	4	1	1	%25,00
25	12	8	8	%66,66
26	11	5	5	%45,45
27	5	2	0	%40,00
TOPLAM:	226	70	42	%30,97

Grup I ve Grup II biyopsi örnekleri için DNA zenginleştirme işlemi yapıldı ve DNA zenginleştirme sonrası nanodrop konsantrasyonları ölçüldü. Aynı hayvanlara ait ovaryum dokularından oosit aspirasyonu sonucu birden fazla blastosist elde edildiği için biyopsi örneklerinin bazıları aynı anneden elde edilmiştir. Bu nedenle Grup I ve Grup II’de toplam 26 adet dokudan DNA izolasyonu yapıldı. Bu işlemlerden sonra elde edilen DNA’lardan tüm genom amplifikasyonu yapılabilir hale gelmesi beklenmiştir. Biyopsi örnekleri ve doku örneklerine 19 farklı primer ile kısa tandem tekrar dizileri analizi yapıldı ve DNA profilleri oluşturuldu. Bu analiz ile anne-embriyo arasındaki akrabalık uyumu ile farklı bir DNA

kontaminasyonu olup olmadığı değerlendirildi. Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4 ‘te Grup I ve Grup II nanodrop ölçümleri ve STR analizi ile anne-embriyo uyumu verilmiştir. Bu analiz sonucunda TE ve ICM örnekleri ile doku örnekleri arasında primerlerin bağlandığı ve anneden gelen allel genlerle uyum olduğu bulunmuş, blastosist sıvısında iki örnek hariç anneden gelen allel genlerin oranı %0 bulunmuştur. Blastosist sıvı aspirasyonu sonucu DNA zenginleştirme ile NanoDrop ölçümler DNA varlığına işaret etmiş olsa da WGA analizinde (üç örnekte TE, ICM ve blastosist sıvısı WGA başarısız) toplam 37 örnekte DNA izolasyonu başarısı %2,7 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.3. Grup I (*defined* medyum) DNA zenginleştirme sonrası Nanodrop ölçümleri ile STR analizi anne-embriyo uyumu (TE-DM: Trofektoderm-*Defined* Medyum; BF-DM: Blastosist sıvısı-*Defined* medyum; ICM-DM: İç hücre kümesi-*Defined* Medyum; WGA: Tüm Genom Amplifikasyonu)

Örnek No.	Nanodrop Konsantrasyonu	260/280	260/230	STR Anne-Embriyo Uyumu
Blastosist 1 (TE-DM)	1012,8	1,79	0,85	Uyum Var
Blastosist 1 (BF-DM)	1007,5	1,81	0,85	Primer Bağlanmadı
Blastosist 1 (ICM-DM)	1073,1	1,78	0,89	Uyum Var
Blastosist 2 (TE-DM)	914,8	1,79	0,79	Uyum Var
Blastosist 2 (BF-DM)	900	1,79	0,79	Primer Bağlanmadı
Blastosist 2 (ICM-DM)	905,3	1,78	0,79	Uyum Var
Blastosist 3 (TE-DM)	883,8	1,8	0,79	Uyum Var
Blastosist 3 (BF-DM)	860,3	1,79	0,79	Primer Bağlanmadı
Blastosist 3 (ICM-DM)	864	1,8	0,78	Uyum Var
Blastosist 4 (TE-DM)	869,4	1,79	0,79	Uyum Var
Blastosist 4 (BF-DM)	860,8	1,79	0,77	Primer Bağlanmadı
Blastosist 4 (ICM-DM)	883,2	1,77	0,78	Uyum Var
Blastosist 5 (TE-DM)	796,5	1,76	0,7	Uyum Var
Blastosist 5 (BF-DM)	852,6	1,78	0,78	Primer Bağlanmadı
Blastosist 5 (ICM-DM)	855,5	1,79	0,79	Uyum Var
Blastosist 6 (TE-DM)	896,8	1,79	0,79	Uyum Var
Blastosist 6 (BF-DM)	894,9	1,78	0,75	Primer Bağlanmadı
Blastosist 6 (ICM-DM)	901,8	1,79	0,79	Uyum Var
Blastosist 7 (TE-DM)	852	1,78	0,78	Uyum Var
Blastosist 7 (BF-DM)	886,9	1,76	0,77	Primer Bağlanmadı
Blastosist 7 (ICM-DM)	899,3	1,78	0,78	Uyum Var
Blastosist 8 (TE-DM)	868	1,81	0,78	Uyum Var
Blastosist 8 (BF-DM)	853,5	1,79	0,78	Primer Bağlanmadı
Blastosist 8 (ICM-DM)	862,2	1,8	0,78	Uyum Var
Blastosist 9 (TE-DM)	868	1,81	0,78	Uyum Var
Blastosist 9 (BF-DM)	850,5	1,79	0,78	Primer Bağlanmadı

Çizelge 3.3. Devam. Grup I (*defined* medyum) DNA zenginleştirme sonrası Nanodrop ölçümleri ile STR analizi anne-embriyo uyumu (TE-DM: Trofektoderm-*Defined* Medyum; BF-DM: Blastosist sıvısı-*Defined* medyum; ICM-DM: İç hücre kümesi-*Defined* Medyum; WGA: Tüm Genom Amplifikasyonu)

Blastosist 9 (ICM-DM)	898,2	1,8	0,79	Uyum Var
Blastosist 10 (TE-DM)	1027,8	1,8	0,86	Uyum Var
Blastosist 10 (BF-DM)	1017,1	1,79	0,86	Primer Bağlanmadı
Blastosist 10 (ICM-DM)	1241,3	1,73	0,94	Uyum Var
Blastosist 11 (TE-DM)	881,2	1,8	0,79	Uyum Var
Blastosist 11 (BF-DM)	868,5	1,79	0,78	Primer Bağlanmadı
Blastosist 11 (ICM-DM)	914,3	1,8	0,81	Uyum Var
Blastosist 12 (TE-DM)	832,3	1,76	0,77	Uyum Var
Blastosist 12 (BF-DM)	789,6	1,76	0,73	Primer Bağlanmadı
Blastosist 12 (ICM-DM)	887	1,76	0,75	Uyum Var
Blastosist 13 (TE-DM)	864,6	1,79	0,79	Uyum Var
Blastosist 13 (BF-DM)	824,9	1,78	0,75	Primer Bağlanmadı
Blastosist 13 (ICM-DM)	868	1,78	0,78	Uyum Var
Blastosist 14 (TE-DM)	864,7	1,8	0,78	Uyum Var
Blastosist 14 (BF-DM)	833,3	1,79	0,76	Primer Bağlanmadı
Blastosist 14 (ICM-DM)	872,5	1,76	0,74	Uyum Var
Blastosist 15 (TE-DM)	869,1	1,8	0,78	Uyum Var
Blastosist 15 (BF-DM)	795,6	1,79	0,73	Primer Bağlanmadı
Blastosist 15 (ICM-DM)	889,8	1,78	0,75	Uyum Var
Blastosist 16 (TE-DM)	855,8	1,78	0,78	Uyum Var
Blastosist 16 (BF-DM)	798,7	1,76	0,73	Primer Bağlanmadı
Blastosist 16 (ICM-DM)	872,6	1,76	0,74	Uyum Var
Blastosist 17 (TE-DM)	837,2	1,79	0,77	Uyum Var
Blastosist 17 (BF-DM)	829,2	1,76	0,76	Primer Bağlanmadı
Blastosist 17 (ICM-DM)	875,9	1,78	0,74	Uyum Var
Blastosist 18 (TE-DM)	861,9	1,78	0,78	Uyum Var
Blastosist 18 (BF-DM)	825	1,79	0,75	Primer Bağlanmadı
Blastosist 18 (ICM-DM)	883,5	1,77	0,76	Uyum Var
Blastosist 19 (TE-DM)	0	0	0	WGA YOK
Blastosist 19 (BF-DM)	0	0	0	WGA YOK
Blastosist 19 (ICM-DM)	0	0	0	WGA YOK
Blastosist 20 (TE-DM)	0	0	0	WGA YOK
Blastosist 20 (BF-DM)	0	0	0	WGA YOK
Blastosist 20 (ICM-DM)	0	0	0	WGA YOK

Çizelge 3.4. Grup II (*undefined* medyum) DNA zenginleştirme sonrası Nanodrop ölçümleri ile STR analizi anne-embriyo uyumu (TE-UDM: Trofektoderm-*Undefined* medyum; BF-UDM: Blastosist sıvısı-*Undefined* Medyum; ICM-UDM: İç hücre kümesi- *Undefined* medyum; WGA: Tüm Genom Amplifikasyonu)

Örnek No.	Nanodrop Konsantrasyonu	260/280	260/230	STR Anne-Embriyo Uyumu
Blastosist 1 (TE-UDM)	830	1,78	0,75	Uyum Var
Blastosist 1 (BF-UDM)	813,5	1,78	0,76	Primer Bağlanmadı
Blastosist 1 (ICM-UDM)	862,3	1,77	0,78	Uyum Var
Blastosist 2 (TE-UDM)	838	1,8	0,77	Uyum Var
Blastosist 2 (BF-UDM)	807	1,78	0,7	Primer Bağlanmadı
Blastosist 2 (ICM-UDM)	872,4	1,77	0,78	Uyum Var
Blastosist 3 (TE-UDM)	848,6	1,77	0,76	Uyum Var
Blastosist 3 (BF-UDM)	795,7	1,78	0,77	Primer Bağlanmadı
Blastosist 3 (ICM-UDM)	861,4	1,79	0,77	Uyum Var
Blastosist 4 (TE-UDM)	814,3	1,78	0,75	Uyum Var
Blastosist 4 (BF-UDM)	805,5	1,76	0,73	Primer Bağlanmadı
Blastosist 4 (ICM-UDM)	863,5	1,77	0,76	Uyum Var
Blastosist 5 (TE-UDM)	897,4	1,77	0,78	Uyum Var
Blastosist 5 (BF-UDM)	860,9	1,79	0,75	Uyum Var (2 Primer)
Blastosist 5 (ICM-UDM)	938,4	1,79	0,77	Uyum Var
Blstosist 6 (TE-UDM)	903,4	1,77	0,76	Uyum Var
Blstosist 6 (BF-UDM)	875,4	1,78	0,78	Primer Bağlanmadı
Blstosist 6 (ICM-UDM)	924,7	1,76	0,78	Uyum Var
Blastosist 7 (TE-UDM)	869,6	1,78	0,77	Uyum Var
Blastosist 7 (BF-UDM)	867,9	1,79	0,78	Primer Bağlanmadı
Blastosist 7 (ICM-UDM)	875,4	1,77	0,78	Uyum Var
Blastosist 8 (TE-UDM)	882,6	1,78	0,79	Uyum Var
Blastosist 8 (BF-UDM)	878,5	1,79	0,79	Primer Bağlanmadı
Blastosist 8 (ICM-UDM)	884,2	1,78	0,79	Uyum Var
Blastosist 9 (TE-UDM)	854,5	1,79	0,77	Uyum Var
Blastosist 9 (BF-UDM)	807	1,81	0,75	Primer Bağlanmadı
Blastosist 9 (ICM-UDM)	868,8	1,77	0,78	Uyum Var
Blastosist 10 (TE-UDM)	892,5	1,79	0,78	Uyum Var
Blastosist 10 (BF-UDM)	889,4	1,76	0,75	Primer Bağlanmadı
Blastosist 10 (ICM-UDM)	894,8	1,8	0,78	Uyum Var
Blastosist 11 (TE-UDM)	883	1,79	0,78	Uyum Var

Çizelge 3.4. Devam. Grup II (undefined medyum) DNA zenginleştirme sonrası Nanodrop ölçümleri ile STR analizi anne-embriyo uyumu (TE-UDM: Trofektoderm-*Undefined* medyum; BF-UDM: Blastosist sıvısı-*Undefined* Medyum; ICM-UDM: İç hücre kümesi- *Undefined* medyum; WGA: Tüm Genom Amplifikasyonu)

Blastosist 11 (BF-UDM)	871,6	1,79	0,75	Primer Bağlanmadı
Blastosist 11 (ICM-UDM)	903,5	1,77	0,78	Uyum Var
Blastosist 12 (TE-UDM)	893,6	1,77	0,78	Uyum Var
Blastosist 12 (BF-UDM)	890	1,81	0,78	Primer Bağlanmadı
Blastosist 12 (ICM-UDM)	903,8	1,78	0,76	Uyum Var
Blastosist 13 (TE-UDM)	866,5	1,78	0,77	Uyum Var
Blastosist 13 (BF-UDM)	826,4	1,79	0,75	Primer Bağlanmadı
Blastosist 13 (ICM-UDM)	903,6	1,77	0,76	Uyum Var
Blastosist 14 (TE-UDM)	902,6	1,79	0,76	Uyum Var
Blastosist 14 (BF-UDM)	832,6	1,78	0,74	Uyum Yok (Farklı Primerler)
Blastosist 14 (ICM-UDM)	906,6	1,78	0,78	Uyum Var
Blastosist 15 (TE-UDM)	850,4	1,79	0,76	Uyum Var
Blastosist 15 (BF-UDM)	825,8	1,77	0,74	Primer Bağlanmadı
Blastosist 15 (ICM-UDM)	889,3	1,76	0,75	Uyum Var
Blstosist 16 (TE-UDM)	828	1,76	0,75	Uyum Var
Blstosist 16 (BF-UDM)	818,8	1,78	0,76	Primer Bağlanmadı
Blstosist 16 (ICM-UDM)	897	1,75	0,75	Uyum Var
Blastosist 17 (TE-UDM)	874,2	1,77	0,78	Uyum Var
Blastosist 17 (BF-UDM)	849	1,78	0,75	Primer Bağlanmadı
Blastosist 17 (ICM-UDM)	902	1,78	0,74	Uyum Var
Blastosist 18 (TE-UDM)	937,3	1,76	0,77	Uyum Var
Blastosist 18 (BF-UDM)	878,2	1,79	0,78	Primer Bağlanmadı
Blastosist 18 (ICM-UDM)	992,8	1,78	0,79	Uyum Var
Blastosist 19 (TE-UDM)	910,2	1,8	0,78	Uyum Var
Blastosist 19 (BF-UDM)	849,8	1,75	0,72	Primer Bağlanmadı
Blastosist 19 (ICM-UDM)	923,9	1,77	0,74	Uyum Var
Blastosist 20 (TE-UDM)	0	0	0	WGA YOK
Blastosist 20 (BF-UDM)	0	0	0	WGA YOK
Blastosist 20 (ICM-UDM)	0	0	0	WGA YOK

4. TARTIŞMA

Yeni ve invazivliği düşük biyopsi tekniklerinin geliştirilmesi, yapılan analiz sonuçlarının iyileştirilmesi ve bu tekniklerin uygulanması önemlidir. In vitro embriyo üretiminin yaygınlaşması ile omik analizler ve biyopsi işlemleri üzerinde çalışmalar da artmıştır. Bu çalışmalar ile embriyonun genetik, reproduktif ve verim özellikleri yönünden değerlendirilmesi, embriyoların kalitesi ve kaderi, canlı doğum, implantasyon başarısı vd. gibi bilgiler edinmek mümkündür. Ayrıca bu analizler ile en iyi embriyolar seçilerek transfer edilebilmektedir. İç hücre kümesi ve trofektoderm ile ilgili çalışmalar bu konuda katkı sağlarken blastosist sıvısı üzerine yapılan çalışmalar sınırlı kalmıştır. Özellikle biyopsi alanındaki çalışmalar beşeri tıpta veteriner tıpa göre daha fazladır ve invaziv olmayan biyopsi yöntemlerinin arayışı başlamıştır (Layek vd., 2024; Palini vd., 2013; Pan vd., 2024; Rio vd., 2024; Shamonki vd., 2016).

Palini vd. (2013) insan blastosistlerinden blastosist sıvı aspirasyonu ile aldığı örneklerde Y kromozomunda ve kromozom 17'de bulunan çok kopyalı genleri çoğaltarak genomik DNA'nın varlığını araştırmış ve diğer biyopsi tekniklerine göre doğruluk oranının daha düşük olduğunu bulmuştur. Yine de bu çalışma PCR, WGA ve CGH kullanarak blastosist sıvısından ilk çoğaltılabilir DNA bulunduğunu gösterdiği için diğer çalışmalara rehber niteliğinde olmuştur.

In vitro sığır embriyolarında ilk kez blastosist sıvısından cf-DNA, WGA ile çoğaltılmış cinsiyet belirleme başarısı %78,9 ile TE biyopsisi sonuçlarına %82,6 benzer çıkmıştır (Martínez-Rodero vd., 2024). Capalbo vd. (2018), Galuzzi vd. (2015), Gianaroli vd. (2014), Magli vd. (2016), Palini vd. (2013), Perloe vd. (2013), Poli vd. (2013), Tobler vd. (2015), Tšuiiko vd. (2018) ve Zhang vd. (2016) insan blastosist sıvı aspirasyonu ile blastosist sıvısından genetik analiz için uygun DNA elde etmişlerdir (Çizelge 4.1.). Magli vd. (2016), blastosist sıvısı, TE hücresi, polar cisim ve blastomer biyopsilerine WGA yapmış ve blastosist sıvısında amplifikasyonu %82 oranında bulmuştur. Gianaroli vd. (2014), insanlarda TE ve blastosist sıvılarında DNA varlığını karşılaştırmış ve blastosist sıvısında %76,5 oranında DNA tespit etmiştir. Palini vd. (2013) gerçek zamanlı PCR ile blastosist sıvısında %90 oranında genomik DNA tespit etmiştir. Tšuiiko vd. (2018) insanlarda blastosist sıvısı ile TE ve ICM hücrelerinin genomik profilini karşılaştırmış ve %40 oranında uyum belirlemiştir. Tobler vd. (2015) insanlarda blastosist sıvısı ve TE-ICM karyotiplerini karşılaştırmış ve %52 uyumsuzluk olduğunu yani embriyoyu yeterince temsil etmediğini

bildirmiştir. Benzer bir çalışmada blastosist sıvısı ile TE karşılaştırılmış ve %55,6 uyumsuzluk belirlenmiştir (Perloe vd., 2013). Poli vd. (2013) blastosist sıvısı ve blastosistlerde 8 primer içeren STR analizi yapmış ve DNA kökeni ile embriyo kökeni uyumlarını araştırmış fakat bir uyum bulunamamıştır. Galuzzi vd. (2015) ile Zhang vd. (2016) blastosist sıvısından DNA amplifikasyon oranını sırasıyla %44,4 ve %72,5 bulmuş fakat her iki çalışmada da TE ile uyum bulunamamıştır. Capalbo vd. (2018) PGT-A ve PGT-M olmak üzere iki farklı teknik kullanmıştır. Buna göre PGT-A yapılanlarda amplifikasyon oranı %37,5 ve TE uyumu %13; PGT-M yapılanlarda ise amplifikasyon oranı %27,4 ve TE uyumu %2,9 olarak bulunmuştur. Tüm bu çalışmalar “Blastosist sıvısından genomik DNA izolasyonu mümkün mü?” sorusuna odaklanmış olsa da yapılan çalışmaların verileri birbirinden oldukça farklı çıkmıştır.

Çizelge 4.1. İnsanlarda blastosist sıvısından genetik analiz için uygun DNA elde edilen çalışmalar

Embriyo sayısı	Blastosist sıvısından DNA amplifikasyonu	TE ile uyum	Referanslar
29	%90	-	Palini vd., 2013
32	%28,1	%33,3	Perloe vd., 2013
51	%76,5	%82	Gianaroli vd., 2014
96	%63	%48	Tobler vd., 2015
9	%44,4	%0	Galluzi vd., 2015
116	%94	%81	Magli vd., 2016
11	%72,5	%0	Zhang vd., 2016
16	%87,5	%40	Tsuiko vd., 2018
69	%27,4	%2,9	Capalbo vd., 2018 (PGT-M)
23	%37,5	%13	Capalbo vd., 2018 (PGT-A)
15	%100	%0	Poli vd., 2013

Çalışma amacına uygun yöntemi seçmek önemlidir. Genetik analizlerde WGA için çoklu yer değiştirme amplifikasyonu (MDA) ya da PCR tabanlı amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. İki yöntemin karşılaştırıldığı çalışmada MDA'nın genotiplleme için PCR'ın ise mikrodizilemelerde daha iyi sonuç verdiği sonucuna ulaşılmıştır (Treff vd., 2011). Alınan biyopsi örnekleri (10 hücre için) yaklaşık 100 pg DNA içerirken, blastosist sıvı miktarının yaklaşık 5 µl olduğu düşünüldüğünde tek bir hücre bile 5-6 pg DNA içermektedir ve genotiplleme için gereken DNA miktarı ise en az 200 ng'dır (Oliveira vd., 2023b). Tüm genom amplifikasyonu için bu düşük miktardaki DNA ancak mikrogram seviyelerine çıkarılabilmektedir. Buna göre, blastosist sıvı aspirasyonunda yapılan DNA analizlerinin tutarsızlığı miktarla ilişkili olabilir.

Rule vd. (2018) 5. gün insan blastosistlerinden blastosist sıvı aspirasyonu sonrası cfDNA konsantrasyonlarını bu tez çalışmasındakine benzer şekilde (sadece NanoDrop 3300) NanoDrop 3300 ve floresan boya kullanarak DNA konsantrasyonlarını ölçmüştür. Bu çalışmada ölçülen konsantrasyonlar ile embriyo morfolojisi arasında pozitif korelasyon olduğu bulunmuş yani blastosist sıvısında ölçülen DNA'nın aslında embriyo gelişimi sırasında şekillenen apoptoz mekanizmaları sonucu ortaya çıkan hücrelerden kaynaklandığı teorisi ortaya çıkmıştır. Sesina vd. (2018) 24 adet insan blastosistinde yaptığı çalışmada, %29 oranında DNA bulduklarını bildirmişlerdir. STR analizinde, yapılan tez çalışması ile paralel olarak çoğunlukla uyumsuz sonuçlar ve anne dışı kopyalar olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında blastosist sıvısı ve TE-ICM hücreleri WGA sonrası anneden gelen allel genler yönünden değerlendirilmiş ve %2,7 uyumlu bulunmuş bazı örneklerde WGA gerçekleşmemiştir. Yapılan çalışmada blastosist sıvısında WGA'nın başarısız olmasının bir nedeni olarak, öploid embriyolar sessiz embriyo hipotezi ile ilişkili sessiz metabolik durumda olabileceği için apoptozis gerçekleşme olasılığının daha düşük olması düşünülmüştür. Dolayısıyla apoptozis sonucu blastosist sıvısına salınan DNA'nın kırılğan ve miktarının düşük olması veya sessiz metabolik durumdaki embriyoda apoptozisin düşük seviyede olması WGA analizinde istenen sonuçların elde edilememesinin bir nedeni olarak görülmüştür. Magli vd. (2019) blastosist sıvısından embriyonun ploidi durumu ile gebelik oranı ve devam eden gebelik oranlarını karşılaştırmış ve DNA amplifikasyonu başarısız olanlarda gebelik oranı %77 iken başarılı DNA amlifikasyonu olanlarda %37 gebelik oranı tespit edilmiştir. Benzer diğer güncel bir çalışmada ise WGA'nın başarısız olduğu blastosistlerin transferinde gebelik oranı %53,3 bulunmuş, başarılı WGA yapılan blastosistlerde ise gebelik oranı %26,2 bulunmuştur (Gianaroli vd., 2023). Bunun sonucunda anöploid embriyolarda blastosist sıvısından DNA amplifikasyonunun daha başarılı olduğu

sonucuna varılmıştır. Bu çalışma da yine sessiz embriyo hipotezi uyumludur. Bu çalışmalardan yola çıkarak blastosist sıvısından WGA başarısı ya da başarısızlığı gebelik oranlarının öngörülmesi için biyobelirteç olarak kullanılabilir. Sığır blastosistlerinde trofektoderm biyopsi ile kromozomal aberasyonlardan en sık *monozomi* belirlenmiş, kromozomal anormalliklerin görülme sıklığı ise %5 olarak bulunmuştur ve monozomi gözlenen hayvanlarda ya maternal ya da paternal kromozom belirlenememiş, bazılarında ise ebeveyn kökeni belirlenememiş ya da anne dışı kopyalar belirlenmiştir (Bouwman ve Mullaart, 2023). Tez çalışmasında *undefined* media ile üretilen blastosistlerden elde edilen örnekler ile doku örneklerine yapılan STR analizi sonucu örneklerden birinde blastosist sıvısında maternal köken (2 primer) birinde ise anne dışı kopyalar belirlenmiş, diğer örneklerde annenin kökenine dair bir bilgiye rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışmada nanodrop ölçümler ile WGA sonrası elde edilen sonuçların uyumsuzluğunda yüksek değişkenlik mevcuttu. Bunun nedeni genotipleme öncesi DNA miktarının sadece kantitatif ölçülmesi, DNA bütünlüğü ve WGA sonrası oluşan parçaların boyutu ve analiz öncesi genotipleme kalitesini belirleyecek bir belirteç bulunmayışı olabilir. Genotipleme analizi sonucu oluşan *CallRate* parametresi, dokulardan (kan, saç, kıl, tükürük vd.) elde edilen genomik DNA örneklerinde yüksek bulunmuş, biyopsi örneklerinde WGA sonrası düştüğü görülmüştür (Oliveira vd., 2023b).

Sonuç olarak, kullanılan kültür medyumunu, blastosistin gelişim evresi, polispermi gibi faktörler ile uygulanan biyopsi işlemini uygulayan personelin teknik bilgileri, laboratuvar koşulları ve yapılan genetik analizler ile kullanılan kitler çalışma sonuçlarına etki etmektedir. Diğer çalışmalarla benzer olarak bu çalışmada da blastosist sıvı aspirasyonunun tek başına genetik tanı için kullanılamayacağını ortaya koymuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hayvancılık sektörü, artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacını karşılamak ve ekonomik sürdürülebilirliği sağlamak için büyük bir öneme sahiptir. Biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, özellikle üreme teknikleri ve genetik iyileştirme yöntemleri, hayvan verimliliğini artırarak üretim süreçlerini daha verimli hale getirmektedir. Genetik belirteçler, in vitro fertilizasyon, embriyo transferi ve genomik seçim gibi teknolojiler, hayvanların reproduktif verimini artırırken aynı zamanda nesil aralıklarını kısaltarak genetik ilerlemeyi hızlandırmaktadır. Bu ilerlemeler, yalnızca çiftlik hayvanı popülasyonlarını artırmakla kalmayıp, aynı zamanda genetik çeşitliliğin korunması ve nesli tükenmekte olan türlerin üreme potansiyelinin desteklenmesi açısından da büyük bir fırsat sunmaktadır. Biyoteknoloji ve hayvancılık sektöründeki bütünleşmiş yaklaşımlar, gelecekte gıda arz güvenliğini sağlamak ve küresel hayvansal üretimi daha verimli hale getirmek için kilit bir rol oynayacaktır.

Cinsiyet, genotip, kromozomal anormallikler ve canlılık tahminleri gibi genetik analizlerin kullanılması sığır embriyosu üretiminde önemli bir katkı sağlayabilir. İnsanlarda kullanılan IVF teknikleri, sığır embriyolarına da uygulanabilir. Örneğin, blastosist aşamasında trofektoderm biyopsisi ile embriyoların genotipi ve cinsiyeti başarıyla belirlenebilir. Gelişen teknolojiler, embriyo genetiği ve canlılık tahmini için yeni yaklaşımlar sunmaktadır. Biyopsi yöntemlerinde invazivliği düşük, embriyo manipülasyonunu az ya da hiç gerektirmeyen çalışmalara yönelim olmuştur. Bu çalışmalar içerisinde blastosist sıvı aspirasyonu ve kullanılan kültür medyumu bulunmaktadır. Ancak, bu invaziv olmayan yöntemlerin doğruluğu konusunda bazı belirsizlikler ve uyumsuzluklar olduğu bilinmekte ve bu alanda daha fazla çalışma yapmaya ihtiyaç vardır.

Biyopsi işleminin başarısı, kullanılan yöntemin uygunluğuna, laboratuvar donanımına ve işlemi gerçekleştiren personelin uzmanlığına bağlıdır. Oosit, erken embriyo, morula veya blastosist aşamalarında farklı biyopsi teknikleri uygulanabilmektedir. Biyopsi yönteminin seçimi, embriyonun gelişim evresi ve biyopsi yapılacak hücre tipine göre belirlenmektedir. Özellikle trofektoderm biyopsisi, genetik analizler için en güvenilir yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, blastosentez yöntemi, embriyonun cfDNA'sını analiz etmeye yönelik minimal invaziv bir alternatif sunmaktadır.

Embriyo biyopsisi, genetik hastalıkların erken teşhis edilmesine ve tedavi edilmesine olanak tanımakta ve in vitro embriyo üretim sürecinde en iyi embriyonun seçimini kolaylaştırmaktadır. Ancak, bu yöntemin bazı riskleri de bulunmaktadır. Embriyonun zarar görme ihtimali, implantasyon şansını düşürebilmekte, mozaiklik riski genetik tanı doğruluğunu etkileyebilmekte ve işlem yüksek maliyetli olması nedeniyle sınırlı uygulanabilmektedir.

Bu çalışmada, sığır embriyoları üzerinde üç farklı biyopsi yöntemi (trofektoderm, iç hücre kümesi ve blastosist sıvı aspirasyonu) kullanılarak genomik DNA elde edilmesi amaçlanmıştır. Defined ve undefined medyum kullanılarak yapılan in vitro çalışmada, toplamda 60 adet ovaryumdan 338 adet kumulus oosit kompleksi aspirasyonu yapılmış ve 99 adet blastosist elde edilmiştir. Bu blastosistlerden kalite kodu I olan toplam 40 adet *expanded* blastosist biyopsi işlemine alınmıştır. Blastosist sıvısından elde edilen DNA'nın zenginleştirilmesi ve diğer biyopsi yöntemleriyle doğrulaması yapılmıştır. DNA analizlerinde, anne-embriyo uyumu ve DNA kontaminasyonu değerlendirilmiş, trofektoderm ve iç hücre kümesi biyosileri ile anne genleri uyumlu bulunmasına rağmen blastosist sıvısındaki DNA'nın anne genleriyle uyumlu olmadığı bulunmuştur. Ayrıca bu uyumsuzluk sonucu WGA analizlerinde başarı oranı sadece %2,7 bulunmuş ve bu örneklerde başarılı DNA izolasyonu elde edilememiştir. Blastosist sıvı aspirasyonu DNA zenginleştirme açısından umut verici olmasına rağmen, genetik analizlerde başarı oranı düşüktür. Bu, gelecekteki çalışmalar için biyopsi yöntemlerinin iyileştirilmesi ve DNA izolasyonunun verimliliğinin artırılması gerektiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, sığır embriyolarında genetiği ve gelişim potansiyelini daha doğru bir şekilde belirlemek için hem invaziv hem de invaziv olmayan yöntemlerin geliştirilmesi IVF dünyasında önemli fırsatlar yaratabilir.

KAYNAKLAR

- Aguila, L., Osycka-Salut, C., Treulen, F. & Felmer, R. (2022). Pluripotent core in bovine embryos: a review. *Animals*, 12(8), 1010. <https://doi.org/10.3390/ani12081010>
- Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M. & Smith, L.C. (2020). Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, 10(12), 2196. <https://doi.org/10.3390/ani10122196>
- Akyol, N. (2005). Sığırlarda in vivo ve in vitro fertilizasyon. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 45(2), 53-62.
- Akyol, N., Kızıl, S.H. & Karaşahin, T. (2007). In vitro Embryo Production and Transfer in Cattle. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47(1), 1-8.
- Alexandre, H. (2002). A history of mammalian embryological research. *International journal of developmental biology*, 45(3), 457-467.
- Alkan, H., Satilmis, F., Demirel, M.A., Bodu, M., Yesilkaya, O.F., Ciftci, M.F. & Alkan, K.K. (2023). Does using microfluidic sperm sorting chips in bovine IVEP affect blastocyst development?. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(7), 1012-1020.
- Alves, G.P., Cordeiro, F.B., de Lima, C.B., Annes, K., Dos Santos, É.C., Ispada, J. & Milazzotto, M.P. (2019). Follicular environment as a predictive tool for embryo development and kinetics in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(3), 451-461. <https://doi.org/10.1071/RD18143>
- Amaral, T.F., de Grazia, J.G.V., Martinhao, L.A.G., De Col, F., Siqueira, L.G.B., Viana, J.H.M. & Hansen, P.J. (2022). Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. *Scientific Reports*, 12(1), 7503. [10.1038/s41598-022-11447-7](https://doi.org/10.1038/s41598-022-11447-7)
- Angel-Velez, D., De Coster, T., Azari-Dolatabad, N., Fernández-Montoro, A., Benedetti, C., Pavani, K. & Smits, K. (2023). Embryo morphokinetics derived from fresh and vitrified bovine oocytes predict blastocyst development and nuclear abnormalities. *Scientific Reports*, 13(1), 4765. [10.1038/s41598-023-31268-6](https://doi.org/10.1038/s41598-023-31268-6)
- Ankum, W.M., Houtzager, H.L., & Bleker, O.P. (1996). Reinier De Graaf (1641-1673) and the fallopian tube. *Human Reproduction Update*, 2(4), 365-369. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.4.365>
- Aoki, S., Inoue, Y., Hara, S., Itou, J., Shirasuna, K. & Iwata, H. (2024). microRNAs associated with the quality of follicular fluids affect oocyte and early embryonic development. *Reproductive Medicine and Biology*, 23(1), e12559. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12559>
- Aoyama, N. and Kato, K. (2020). Trophoctoderm biopsy for preimplantation genetic test and technical tips: A review. *Reproductive Medicine and Biology*, 19(3), 222-231. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12318>
- Arlotto, T., Schwartz, J.L., First, N.L. & Leibfried-Rutledge, M.L. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45(5), 943-956. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00024-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00024-6)
- Bao, B., Wang, J., Li, Y., Feng, F., Ji, Z., Luoreng, Z. & Wang, X. (2023). Molecular regulation mechanism of oocyte maturation in beef cattle. *Biocell*, 47(7). [10.32604/biocell.2023.028646](https://doi.org/10.32604/biocell.2023.028646)

- Başaran, E., Aras, S. & Cansaran-duman, D. (2010). Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67(2), 85-96.
- Bedasa, S., Kebede, A., Abraha, A. & Nekemte, E. (2017). Review on reproductive biotechnology and its role in dairy cattle production and health. *Report and Opinion*, 9(3). [10.7537/marsroj090317.10](https://doi.org/10.7537/marsroj090317.10)
- Ben-Nagi, J., Odia, R., Gonzalez, X.V., Heath, C., Babariya, D., SenGupta, S. & Wells, D. (2019). The first ongoing pregnancy following comprehensive aneuploidy assessment using a combined blastocentesis, cell free DNA and trophoctoderm biopsy strategy. *Journal of reproduction & infertility*, 20(1), 57. <https://doi.org/10.1016/j.eurox.2019.100055>
- Betteridge, K.J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal reproduction science*, 79(3-4), 203-244. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00166-0)
- Blondin, P. and Sirard, M.A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development*, 41(1), 54-62. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109>
- Bó, G.A. and Mapletoft, R.J. (2018). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction (AR)*, 10(3), 344-348.
- Bouwman, A.C. and Mullaart, E. (2023). Screening of in vitro-produced cattle embryos to assess incidence and characteristics of unbalanced chromosomal aberrations. *JDS communications*, 4(2), 101-105. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2022-0275>
- Brackett, B.G. and Zuelke, K.A. (1993). "Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos", *Theriogenology*, 39: 43-64. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90023-X)
- Bredbacka, P. (1995). Factors affecting cell viability during bisection of bovine embryos. *Theriogenology*, 44(2), 159-166. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00165-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00165-5)
- Brem, G. (1989). Splitting and cloning of bovine embryos. New selection schemes in cattle: nucleus programmes. E. Kalm and T. Liboriussen, ed. *Eur. Assoc. Anim. Prod. Publ*, (44), 15.
- Brouillet, S., Martinez, G., Coutton, C. & Hamamah, S. (2020). Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reproductive biomedicine online*, 40(6), 779-796. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.02.002>
- Casciani, V., Monseur, B., Cimadomo, D., Alvero, R. & Rienzi, L. (2023). Oocyte and embryo cryopreservation in assisted reproductive technology: past achievements and current challenges. *Fertility and sterility*, 120(3), 506-520. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.06.005>
- Cenariu, M., Pall, E., Cernea, C. & Groza, I. (2012). Evaluation of bovine embryo biopsy techniques according to their ability to preserve embryo viability. *BioMed Research International*, 2012(1), 541384. <https://doi.org/10.1155/2012/541384>
- Church, R.B. and Shea, B.F. (1977). The role of embryo transfer in cattle improvement programs. *Canadian Journal of Animal Science*, 57(1), 33-45. <https://doi.org/10.4141/cjas77-005>
- Cimadomo, D., Capalbo, A., Ubaldi, F.M., Scarica, C., Palagiano, A., Canipari, R. & Rienzi, L. (2016). The impact of biopsy on human embryo developmental potential during preimplantation genetic diagnosis. *BioMed research international*, 2016(1), 7193075. <https://doi.org/10.1155/2016/7193075>

- Cobb, M. (2012). An amazing 10 years: the discovery of egg and sperm in the 17th century. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 2-6. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02105.x>
- Cole, H.H. and Hart, G.H. (1930). The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Am. J. Physiol.* 93, 57–68. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1930.93.1.57>
- De La Fuente, R. (2006). Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Developmental biology*, 292(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.01.008>
- De Loos, F., Van Maurik, P., Van Beneden, T. & Kruip, T.A.M. (1992). “Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro”, *Molecular Reproduction and Development*, 31: 208-214. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310308>
- de Sousa, R.V., da Silva Cardoso, C.R., Butzke, G., Dode, M.A.N., Rumpf, R. & Franco, M.M. (2017). Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. *Theriogenology*, 90, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.003>
- De Vos, A. and Van Steirteghem, A. (2001). Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal diagnosis*, 21(9), 767-780. <https://doi.org/10.1002/pd.172>
- De Wit, A.A.C., Wurth, Y.A. & Kruip, T.A. (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of animal science*, 78(5), 1277-1283. <https://doi.org/10.2527/2000.7851277x>
- Del Collado, M., Andrade, G.M., Gonçalves, N.J.N., Fortini, S., Perecin, F. & Carriero, M.M. (2023). The embryo non-invasive pre-implantation diagnosis era: how far are we?. *Animal Reproduction*, 20(2), e20230069. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0069>
- Demetrio, D., Demetrio, C., Oliveira, M., Reis, R., & Santos, R. (2022). From oocyte to calf: Practical aspects of bovine in vitro embryo production. *Clin. Theriogenology*, 14, 193. <https://doi.org/10.58292/ct.v14.9671>
- Demetrio, D.G.B., Benedetti, E., Demetrio, C.G.B., Fonseca, J., Oliveira, M., Magalhaes, A. & Santos, R.M.D. (2020). How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro?(12 years of practical results at a California dairy farm). *Animal reproduction*, 17(3), e20200053. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0053>
- Dimitriadis, I., Zaninovic, N., Badiola, A.C. & Bormann, C.L. (2022). Artificial intelligence in the embryology laboratory: a review. *Reproductive biomedicine online*, 44(3), 435-448. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.11.003>
- Ding, M., Diao, Z., & Zhou, J. (2022). The preimplantation genetic testing clinical outcomes of biopsy on vitrification-warming embryos: A retrospective study. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 48(7), 1621-1631. <https://doi.org/10.1111/jog.15275>
- Donnay, I. and Leese, H.J. (1999). Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 53(2), 171-178. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199906\)53:2<171::AID-MRD6>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<171::AID-MRD6>3.0.CO;2-F)
- Dos Santos, E.C., da Fonseca Junior, A.M., de Lima, C.B., Ispada, J., da Silva, J.V.A. & Milazzotto, M.P. (2021). Less is more: Reduced nutrient concentration during in vitro culture improves embryo production rates and morphophysiology of bovine embryos. *Theriogenology*, 173, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.010>
- Dziuk, P.J., Donker, J.D., Nichols, J.R. & Petersen, W.E. (1958). Problems associated with the transfer of ova between cattle. *Minn. Agric. Exp. Sta. Bull. No.* 222.

- Emanuelli, I.P., Costa, C.B., Marinho, L.S.R., Seneda, M.M. & Meirelles, F.V. (2019). Cumulus-oocyte interactions and programmed cell death in bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 126, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.028>
- Fair, T., Hyttel, P. & Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular reproduction and development*, 42(4), 437-442. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080420410>
- Fan, H.Y. and Sun, Q.Y. (2019). Oocyte meiotic maturation. In *The ovary* (pp. 181-203). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00012-1>
- FAO. (2022). FAOSTAT, Production: Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> Erişim tarihi: 30.07.2024
- Ferré, L.B., Kjelland, M.E., Strøbech, L.B., Hyttel, P., Mermillod, P. & Ross, P.J. (2020). Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S. & Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59(2), 599-616. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01243-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01243-8)
- Gardner, D.K. and Harvey, A.J. (2015). Blastocyst metabolism. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(4), 638-654. <https://doi.org/10.1071/RD14421>
- Gardner, D.K. and Leese, H.J. (1990). Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *Reproduction*, 88(1), 361-368. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880361>
- Gardner, R.L. and Edwards, R.G. (1968). Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature* 218, 346–349. <https://doi.org/10.1038/218346a0>
- Germond, M., Nocera, D., Senn, A., Rink, K., Delacréaz, G., Pedrazzini, T. & Hornung, J. P. (1996). Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48 µm diode laser beam. *Human Reproduction*, 11(5), 1043-1048. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019294>
- Gianaroli, L. (2000). Preimplantation genetic diagnosis: polar body and embryo biopsy. *Hum Reprod*, 15(Suppl 4), 69-75. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_4.69
- Gianaroli, L., Albanese, C., Tabanelli, C., Crippa, A. & Magli, M. C. (2019). Blastocoel fluid biopsy. *Fertility & Reproduction*, 1(01), 17-20. <https://doi.org/10.1142/S2661318219300034>
- Gianaroli, L., Magli, M. C., Pomante, A., Crivello, A. M., Cafueri, G., Valerio, M. & Ferraretti, A. P. (2014). Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertility and sterility*, 102(6), 1692-1699. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.021>
- Gianaroli, L., Perruzza, D., Albanese, C., Azzena, S., Tabanelli, C., Ferraretti, A. P. & Magli, M. C. (2023). Failure to detect DNA in blastocoel fluid is associated with a higher live birth rate in both PGT-A and conventional IVF/ICSI cycles. *Human Reproduction*, 38(7), 1268-1276. <https://doi.org/10.1093/humrep/dead088>
- Goddard, M.E., Hayes, B.J. & Meuwissen, T.H. (2010). Genomic selection in livestock populations. *Genetics research*, 92(5-6), 413-421. <https://doi.org/10.1017/S0016672310000613>
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G. & Kell, D. B. (2004). Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *TRENDS in Biotechnology*, 22(5), 245-252. [10.1016/j.tibtech.2004.03.007](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.03.007)

- Goossens, K., Mestdagh, P., Lefever, S., Van Poucke, M., Van Zeveren, A., Van Soom, A. & Peelman, L. (2013). Regulatory microRNA network identification in bovine blastocyst development. *Stem cells and development*, 22(13), 1907-1920. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0708>
- Gordon, I. (2003). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 2nd Edition, CABI Publishing, Cambridge, USA.
- Goto, K., Iwai, N., Takuma, Y. & Nakanishi, Y. (1992). Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *Journal of animal science*, 70(5), 1449-1453. <https://doi.org/10.2527/1992.7051449x>
- Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H. & Wolf, E. (2014). Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal reproduction science*, 149(1-2), 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.016>
- Griffin, D. K.J, Turner, K., Silvestri, G., Smith, C., Dobson, G., Black, D.H. & Handyside, A.H. (2019). The use of Karyomapping for genomic evaluation and PGT-A of preimplantation cattle embryos: the first live-born calves. *Reproductive BioMedicine Online*, 38, e54-e55. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.03.088>
- Griffin, D.K., and Ogur, C. (2023). PGT-SR: A comprehensive overview and a requiem for the interchromosomal effect. *DNA*, 3(1), 41-64. <https://doi.org/10.3390/dna3010004>
- Hagemann, L.J. (1999). Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology*, 51(2), 449-459. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00239-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00239-8)
- Hajarian, H., Shahsavari, M.H., Karami-Shabankareh, H. & Dashtizad, M. (2016). The presence of corpus luteum may have a negative impact on in vitro developmental competency of bovine oocytes. *Reproductive Biology*, 16(1), 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2015.12.007>
- Hamburger, V. (1942). *A Manual of Experimental Embryology*. University of Chicago Press. Chicago. p. 72.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad Jr., C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315, 615–680.
- Hammond, E.R., Shelling, A.N. & Cree, L.M. (2016). Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use. *Human Reproduction*, 31(8), 1653-1661. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew132>
- Handyside, A.H., Kontogianni, E.H., Hardy, K.R.M.L. & Winston, R.M. (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344(6268), 768-770. <https://doi.org/10.1038/344768a0>
- Hansen, P.J. (2020). The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it?. *Journal of Animal Science*, 98(11), skaa288. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa288>
- Hartman, C.G., Lewis, W.H., Miller, F.W. & Swett, W.W. (1931). First findings of tubal ova in the cow, together with notes on oestrus. *Anat. Rec.* 48, 267–275. <https://doi.org/10.1002/ar.1090480206>
- Harvey, A.J. (2019). Mitochondria in early development: linking the microenvironment, metabolism and the epigenome. *Reproduction*, 157(5), R159-R179. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0431>

- Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M. & Imai, H. (2000). Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 56(4), 520-526. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200008\)56:4<520::AID-MRD10>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200008)56:4<520::AID-MRD10>3.0.CO;2-0)
- Herdoğan, M., Mart, F., Çay, H.A., Kahraman, D., İnanç, M.E., Güngör, Ş. & Ata, A. (2023). Suni tohumlamanın tarihsel gelişimi ve dönüm noktaları. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 94(1), 84-95. <https://doi.org/10.33188/vetheder.1159178>
- Herr, C.M., Matthaei, K.I., Bradley, MP. & Reed, K.C. (1990). Rapid, accurate sexing of livestock embryos. In *Proceedings of the 4th world congress on genetics applied to livestock production* (Vol. 16, pp. 334-343).
- Herrera, C. (2016). Clinical applications of preimplantation genetic testing in equine, bovine, and human embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.002>
- Herrick, J. R., Rajput, S., Pasquariello, R., Ermisch, A., Santiquet, N., Schoolcraft, W. B. & Krisher, R. L. (2020). Developmental and molecular response of bovine embryos to reduced nutrients in vitro. *Reproduction and Fertility*, 1(1), 51-65. <https://doi.org/10.1530/RAF-20-0033>
- Holubcová, Z., Kyjovská, D., Martonová, M., Páralová, D., Klenková, T., Otevřel, P. & Hampl, A. (2019). Egg maturity assessment prior to ICSI prevents premature fertilization of late-maturing oocytes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36, 445-452. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1393-0>
- Horowitz, M.C. (1987). The “science” of embryology before the discovery of the ovum. na. <https://npgshop.org.uk/products/walter-heape-npg-x44316-print> Erişim tarihi: 30.07.2024
- https://tr.wikipedia.org/wiki/George_Romanes Erişim tarihi: 30.07.2024
- <https://www.reprodaction.com/uk/Cattle-Reproduction/The-reproductive-cycle/Fertilisation> Erişim tarihi: 30.07.2024
- Hunter, R.H.F. and López-Gatius, F. (2021). From sperm to embryos; lessons learnt from Tim Rowson's career. *Theriogenology*, 172, 255-260. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.009>
- Iwata, H., Hashimoto, S., Ohota, M., Kimura, K., Shibano, K. & Miyake, M. (2004). Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*, 127(2), 159-164. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00084>
- Jensen, P.L., Grøndahl, M.L., Beck, H.C., Petersen, J., Stroebech, L., Christensen, S.T. & Yding Andersen, C. (2014). Proteomic analysis of bovine blastocoel fluid and blastocyst cells. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60(3), 127-135. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.894152>
- Jeong, W.J., Cho, S.J., Lee, H.S., Deb, G.K., Lee, Y.S., Kwon, T.H. & Kong, I.K. (2009). Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology*, 72(4), 584-589. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.015>
- Jiang, Y., He, Y., Pan, X., Wang, P., Yuan, X. & Ma, B. (2023). Advances in oocyte maturation in vivo and in vitro in mammals. *International journal of molecular sciences*, 24(10), 9059. <https://doi.org/10.3390/ijms24109059>

- Kadarmideen, H.N. (2014). Genomics to systems biology in animal and veterinary sciences: progress, lessons and opportunities. *Livestock Science*, 166, 232-248. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.028>
- Khurana, N.K. and Niemann, H. (2000). Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of reproduction*, 62(4), 847-856. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.847>
- Kobayashi, S. (2007). Manual for ovum pick-up and in vitro fertilization. Japan International Cooperation Agency.
- Kokkali, G., Coticchio, G., Bronet, F., Celebi, C., Cimadomo, D. & De Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Human reproduction open*, 2020(3), hoaa020. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa020>
- Kraemer, D.C. and Dula Jr., J.E. (1972). The role of embryo transfer in beef cattle production. In: *Proceedings of the 21st and 22nd Beef Cattle Shortcourse on Improving Reproductive Efficiency in Beef Cattle*, Texas A&M University, August, pp. 241–245.
- Kravchenko, P. and Tachibana, K. (2024). Rise and SINE: Roles of transcription factors and retrotransposons in zygotic genome activation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00772-6>
- Krisher, R.L. and Herrick, J.R. (2024). Bovine embryo production in vitro: evolution of culture media and commercial perspectives. *Animal Reproduction*, 21(3), e20240051. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2024-0051>
- Krisher, R.L. and Prather, R.S. (2012). A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Molecular reproduction and development*, 79(5), 311-320. <https://doi.org/10.1002/mrd.22037>
- Krisher, R.L., Lane, M. & Bavister, B.D. (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*, 60(6), 1345-1352. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1345>
- Kropp, J., Salih, S.M. & Khatib, H. (2014). Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. *Frontiers in genetics*, 5, 91. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00091>
- Lane, M. and Gardner, D.K. (1998). Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(4), 991-997. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.991>
- LaVoie, H.A. (2005). Epigenetic control of ovarian function: the emerging role of histone modifications. *Molecular and cellular endocrinology*, 243(1-2), 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.09.005>
- Layek, S. S., Kanani, S., Doultani, S., Gohil, T., Patil, S., Sudhakar, A., ... & Jadeja, H. (2024). Analyzing Cell-free Genomic DNA in Spent Culture Media: Noninvasive Insight into the Blastocysts. *Global Medical Genetics*, 11(03), 227-232. <https://doi.org/10.1055/s-0044-1788260>
- Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruip, T., Niemann, H. & Galli, C. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of reproduction*, 67(3), 767-775. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004481>

- Leigh, D. (2019). Improvement and standardization of biopsy procedures. *Reproductive BioMedicine Online*, 38, e6-e7. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.03.012>
- Lewis, W.H. and Gregory, P.W. (1929). Cinematography of living developing rabbit eggs. *Science* 69, 226. [10.1126/science.69.1782.226.b](https://doi.org/10.1126/science.69.1782.226.b)
- Lonergan, P. and Fair, T. (2016). Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 255-268. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>
- Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F. & Boland, M.P. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 41(5), 427-437. <https://doi.org/10.1051/rnd:2001142>
- Lu, T. X. and Rothenberg, M.E. (2018). MicroRNA. *Journal of allergy and clinical immunology*, 141(4), 1202-1207. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>
- Machado, G.M., Carvalho, J.O., Siqueira Filho, E., Caixeta, E. S., Franco, M.M., Rumpf, R. & Dode, M. A. N. (2009). Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 71(8), 1289-1297. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.002>
- Macun, H.C. and Kaymaz, M. (2006). Sığır oositlerinin in vitro maturasyonuna follikül uyarıcı hormon ve insan menopozal gonadotropininin etkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 53(1), 25-29.
- Magli, M.C., Albanese, C., Crippa, A., Tabanelli, C., Ferraretti, A.P. & Gianaroli, L. (2019). Deoxyribonucleic acid detection in blastocoelic fluid: a new predictor of embryo ploidy and viable pregnancy. *Fertility and sterility*, 111(1), 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.09.016>
- Magli, M.C., Pomante, A., Cafueri, G., Valerio, M., Crippa, A., Ferraretti, A.P. & Gianaroli, L. (2016). Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophectoderm cells, or blastocoelic fluid?. *Fertility and sterility*, 105(3), 676-683. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.018>
- Mao, D., Xu, J. & Sun, L. (2024). Impact of trophectoderm biopsy for preimplantation genetic testing on obstetric and neonatal outcomes: a meta-analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 230(2), 199-212. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2023.08.010>
- Marden, W.G.R. and Chang, M.C., (1952). The aerial transport of fertilized mammalian ova. In: *Proceedings of the Second International Congress on Animal Reproduction*, vol. 1. A.I., Copenhagen, pp. 140–143.
- Martínez-Rodero, I., Salas-Huetos, A., Díaz-Muñoz, J., Ordóñez-León, E.A., García-Martínez, T., Yeste, M. & Mogas, T. (2024). Blastocoel fluid aspiration improves vitrification outcomes and produces similar sexing results of in vitro-produced cattle embryos compared to microblade biopsy. *Theriogenology*, 218, 142-152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.01.042>
- Masuda, Y., Hasebe, R., Kuromi, Y., Kobayashi, M., Urataki, K., Hishinuma, M. & Nishimura, R. (2021). Three-dimensional live imaging of bovine preimplantation embryos: a new method for IVF embryo evaluation. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 639249. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.639249>
- Mazzoni, G., Salleh, S.M., Freude, K., Pedersen, H.S., Stroebech, L., Callesen, H., Hyttel, P. & Kadarmidee, H.N. (2017). "Identification of potential biomarkers in donor cows for in vitro embryo production by granulosa cell transcriptomics". *PLoS ONE*, 12(4): e0175464, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175464>.

- Milachich, T. (2014). New advances of preimplantation and prenatal genetic screening and noninvasive testing as a potential predictor of health status of babies. *BioMed Research International*, 2014(1), 306505. <https://doi.org/10.1155/2014/306505>
- Ming, H., Sun, J., Pasquariello, R., Gatenby, L., Herrick, J.R., Yuan, Y. & Jiang, Z. (2021). The landscape of accessible chromatin in bovine oocytes and early embryos. *Epigenetics*, 16(3), 300-312. <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1795602>
- Monniaux, D., Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y. & Larroque, H. (2010). Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle?. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(7), 1083-1091. <https://doi.org/10.1071/RD09279>
- Montag, M., van der Ven, K. & van der Ven, H. (2009). *Preimplantation genetic diagnosis*. Ed.: Harper, J. & Delhanty, J. D. Cambridge University Press 2nd edition. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511581571>
- Moore, N.W., Adams, C.E. & Rowson, L.E.A. (1968). Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J. Reprod. Fertil.* 17, 527–531. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170527>
- Moore, S.G. and Hasler, J.F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of dairy science*, 100(12), 10314-10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- Morales, H., Tilquin, P., Rees, J.F., Massip, A., Dessy, F. & Van Langendonck, A. (1999). Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 52(2), 149-157. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199902\)52:2<149::AID-MRD5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199902)52:2<149::AID-MRD5>3.0.CO;2-4)
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J. & Alberio, R.H. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65(8), 1551-1562. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.020>
- Nagano, M. (2019). Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 65(3), 195-201. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-022>
- Nandi, S., Ravindranatha, B.M., Gupta, P.S.P. & Sarma, P.V. (2002). Timing of sequential changes in cumulus cells and first polar body extrusion during in vitro maturation of buffalo oocytes. *Theriogenology*, 57(3), 1151-1159. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00709-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00709-9)
- Nielsen, J.M.K., Wrenzycki, C., Hyttel, P., Poppicht, F. & Strøbech, L. (2014). “New culture media affects blastocyst development and gene expression levels in in vitro-produced bovine embryos”. *Reproduction Fertility and Development*, 27(1): 206-207.
- Niemann, H. and Seamark, B. (2018). The evolution of farm animal biotechnology. *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies*, 1-26.
- Niemann, H. and Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, 53(1), 21-34. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00237-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00237-X)
- Oliveira, C.S., Camargo, L.S.A., Silva, M.V.G.B.D., Saraiva, N.Z., Quintão, C.C. & Machado, M.A. (2023b). Embryo biopsies for genomic selection in tropical dairy cattle. *Animal Reproduction*, 20(2), e20230064. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0064>
- Oliveira, C.S., da Silva, M.V.G.B., Quintão, C.C., Otto, P.I., Alonso, R.V., Feres, L.F. & de Almeida Camargo, L.S. (2023a). Imputation accuracy for genomic selection using embryo biopsy samples in Gir. *Reproductive Biology*, 23(2), 100765. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2023.100765>

- Ortega, M.S., Kelleher, A.M., O'Neil, E., Benne, J., Cecil, R. & Spencer, T.E. (2020). NANOG is required to form the epiblast and maintain pluripotency in the bovine embryo. *Molecular reproduction and development*, 87(1), 152-160. <https://doi.org/10.1002/mrd.23304>
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S. & Suzuki, T. (1997). Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*, 48(5), 769-774. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00300-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00300-2)
- Pagoni, M., Cava, C., Sideris, D. C., Avgeris, M., Zoumpourlis, V., Michalopoulos, I. & Drakoulis, N. (2023). miRNA-based technologies in cancer therapy. *Journal of Personalized Medicine*, 13(11), 1586. <https://doi.org/10.3390/jpm13111586>
- Palini, S., Galluzzi, L., De Stefani, S., Bianchi, M., Wells, D., Magnani, M. & Bulletti, C. (2013). Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reproductive biomedicine online*, 26(6), 603-610. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.012>
- Pan, M., Shi, H., Qi, T., Cai, L. & Ge, Q. (2024). The biological characteristics of long cell-free DNA in spent embryos culture medium as noninvasive biomarker in in-vitro embryo selection. *Gene*, 148667. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148667>
- Parrish, J.J. (2014). Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
- Pasquariello, R., Manzoni, E.F.M., Fiandanese, N., Viglino, A., Pocar, P., Brevini, T.A.L. & Gandolfi, F. (2020). Implications of miRNA expression pattern in bovine oocytes and follicular fluids for developmental competence. *Theriogenology*, 145, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.027>
- Pasquariello, R., Zhang, M., Herrick, J.R., Ermisch, A.F., Becker, J., Schoolcraft, W.B. & Krisher, R.L. (2023). Lipid-enriched reduced nutrient culture medium improves bovine blastocyst formation. *Reproduction and Fertility*, 4(4). <https://doi.org/10.1530/RAF-23-0057>
- Peippo, J., Viitala, S., Virta, J., Rätty, M., Tammiranta, N., Lamminen, T. & Vilkki, J. (2007). Birth of correctly genotyped calves after multiplex marker detection from bovine embryo microblade biopsies. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 74(11), 1373-1378. <https://doi.org/10.1002/mrd.20731>
- Penitente-Filho, J.M., Jimenez, C.R., Zolini, A.M., Carrascal, E., Azevedo, J.L., Silveira, C.O. & Torres, C.A.A. (2015). Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Animal Science Journal*, 86(2), 148-152. <https://doi.org/10.1111/asj.12261>
- Perkel, K.J., Tscherner, A., Merrill, C., Lamarre, J. & Madan, P. (2015). The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods. *Molecular reproduction and development*, 82(11), 822-838. <https://doi.org/10.1002/mrd.22525>
- Perloe, M., Welch, C., Morton, P., Venier, W., Wells, D. & Palini, S. (2013). Validation of blastocoele fluid aspiration for preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization (aCGH). *Fertility and Sterility*, 100(3), S208. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.1384>
- Pincus, G. (1936). *The Eggs of Mammals*. Macmillan. New York.
- Pirestani, A., Hosseini, S. M., Hajian, M., Forouzanfar, M., Moulavi, F., Abedi, P. & Esfahani, M.H.N. (2011). Effect of ovarian cyclic status on in vitro embryo production in cattle. *International Journal of Fertility & Sterility*, 4(4), 172.

- Polge, C. (2000). Lionel Edward Aston Rowson. *Biog. Mems Fell. Roy. Soc. Lond.* 46, 483–497. <https://doi.org/10.1098/rsbm.1999.0097>
- Poli, M., Jaroudi, S., Sarasa, J., Spath, K., Child, T. & Wells, D. (2013). The blastocoel fluid as a source of DNA for preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and Sterility*, 100(3), S37. [10.1016/j.fertnstert.2013.07.1789](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.1789)
- Polisseni, J., de Sá, W.F., de Oliveira Guerra, M., Machado, M.A., Serapião, R.V., de Carvalho, B.C. & Peters, V.M. (2010). Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and sterility*, 93(3), 783-788. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.023>
- Ponsart, C.A.H.D., Le Bourhis, D., Knijn, H., Fritz, S., Guyader-Joly, C., Otter, T. & Mullaart, E. (2014). Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1), 12-21. <https://doi.org/10.1071/rd13328>
- Pryce, J.E. and Daetwyler, H.D. (2011). Designing dairy cattle breeding schemes under genomic selection: a review of international research. *Animal Production Science*, 52(3), 107-114. <https://doi.org/10.1071/AN11098>
- Pryor, J.H., Hasler, J.F., Strøbech, L. & Looney, C.R. (2016). “Improved bovine embryo production using novel in vitro culture systems”. *Reproduction Fertility and Development*, 28(2): 172.
- Pujol, M., López-Béjar, M. & Paramio, M.T. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61(4), 735-744. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00250-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00250-4)
- Rabel, R.C., Marchioretto, P.V., Bangert, E.A., Wilson, K., Milner, D.J. & Wheeler, M.B. (2023). Pre-Implantation Bovine Embryo Evaluation—From Optics to Omics and Beyond. *Animals*, 13(13), 2102. <https://doi.org/10.3390/ani13132102>
- Rahbaran, M., Razeghian, E., Maashi, M.S., Jalil, A.T., Widjaja, G., Thangavelu, L. & Jarahian, M. (2021). Cloning and embryo splitting in mammals: brief history, methods, and achievements. *Stem Cells International*, 2021, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2021/2347506>
- Rajam, S.M., Varghese, P.C. & Dutta, D. (2022). Histone chaperones as cardinal players in development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 767773. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.767773>
- Rio, P.D., DiMarco, S. & Madan, P. (2024). MicroRNAomic Analysis of Spent Media from Slow-and Fast-Growing Bovine Embryos Reveal Distinct Differences. *Animals*, 14(16), 2331. <https://doi.org/10.3390/ani14162331>
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., De la Fuente, J., Lonergan, P. & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 44-50. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Perez-Garnelo, S., De la Fuente, J., Boland, M. P. & Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of reproduction*, 68(1), 236-243. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799>
- Rosenkrans Jr, C.F. and First, N.L. (1994). Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *Journal of animal science*, 72(2), 434-437. <https://doi.org/10.2527/1994.722434x>

- Rowson, L.E.A. (1951). Methods of inducing multiple ovulation in cattle. *J. Endocrinol.* 7, 260–270. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0070260>
- Rowson, L.E.A. and Moor, R.M. (1966). Non-surgical transfer of cow eggs. *J. Reprod. Fertil.* 11, 311–312. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0110311>
- Rowson, L.E.A., Moor, R.M. & Lawson, R.A.S. (1969). Fertility following egg transfer in the cow: effect of method, medium and synchronization of oestrus. *J. Reprod. Fertil.* 18, 517–523. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0180517>
- Rule, K., Chosed, R.J., Arthur Chang, T., David Wininger, J. & Roudebush, W.E. (2018). Relationship between blastocoel cell-free DNA and day-5 blastocyst morphology. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35, 1497-1501. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1223-4>
- Said, S., Agung, P.P., Putra, W.P.B. & Kaiin, E.M. (2020, April). The role of biotechnology in animal production. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 492, No. 1, p. 012035). IOP Publishing. [10.1088/1755-1315/492/1/012035](https://doi.org/10.1088/1755-1315/492/1/012035)
- Sakaguchi, K. and Nagano, M. (2020). Follicle priming by FSH and pre-maturation culture to improve oocyte quality in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 150, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.023>
- Sander, K. (2012). *Landmarks in developmental biology 1883–1924: historical essays from Roux's Archives*. Springer Science & Business Media.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. & Dean, W. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental biology*, 241(1), 172-182. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0501>
- Sciorio, R. and Dattilo, M. (2020). PGT-A preimplantation genetic testing for aneuploidies and embryo selection in routine ART cycles: Time to step back?. *Clinical Genetics*, 98(2), 107-115. <https://doi.org/10.1111/cge.13732>
- Semacan, A., Kaymaz M., Fındık M., Rişvanlı A., Köker A. (Ed.). (2019). *Çiftlik hayvanlarında doğum ve jinekoloji*. Türkiye: Medipres.
- Senger, P.L. (2012). *Pathways to pregnancy and parturition*, 3rd edition, United States of America, Innovative Technologies in Print.
- Sesina, N.I., Voskoboeva, E.Y. & Krasnopolskaya, K.V. (2018). Detection of DNA in Human Blastocyst Cavity Aspirate by Multiplex PCR. *Russian Journal of Developmental Biology*, 49, 291-296. <https://doi.org/10.1134/S1062360418050053>
- Shabankareh, H.K., Shahsavari, M.H., Hajarian, H. & Moghaddam, G. (2015). In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. *Iranian journal of reproductive medicine*, 13(10), 615.
- Shamonki, M.I., Jin, H., Haimowitz, Z. & Liu, L. (2016). Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertility and sterility*, 106(6), 1312-1318. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1112>
- Silvestri, G., Canedo-Ribeiro, C., Serrano-Albal, M., Labrecque, R., Blondin, P., Larmer, S.G. & Griffin, D.K. (2021). Preimplantation genetic testing for aneuploidy improves live birth rates with in vitro produced bovine embryos: A blind retrospective study. *Cells*, 10(9), 2284. <https://doi.org/10.3390/cells10092284>
- Sinclair, K.D., Lunn, L.A., Kwong, W.Y., Wonnacott, K., Linforth, R.S.T. & Craigon, J. (2008). Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development.

- Reproductive biomedicine online, 16(6), 859-868. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60153-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60153-8)
- Singh, B., Mal, G., Gautam, S. K. & Mukesh, M. (2019). Advances in animal biotechnology, E-book, Switzerland, Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1>
- Sirard, M.A. (2018). 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, 156(1), R1-R7. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0008>
- Skinner, B.M., Viotti, M., Griffin, D.K. & Ellis, P.J. (2023). Explaining the counter-intuitive effectiveness of trophoctoderm biopsy for PGT-A using computational modelling. *medRxiv*, 2023-12. <https://doi.org/10.1101/2023.12.12.23299850>
- Skinner, M.K. (2018). *Encyclopedia of reproduction*. 2nd ed. Academic Press.
- Smith, A.U. (1952). Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures. *Nature* 170, 374–375. [10.1038/170374b0](https://doi.org/10.1038/170374b0)
- Souza-Fabjan, J.M., Alves, B.R., Batista, R.I., Pereira, A.F., Melo, L.M., Freitas, V.J.F. & Oliveira, M.E.F. (2023). Reproductive biotechnologies applied to the female sheep and goat. In *Sustainable Agriculture Reviews 59: Animal Biotechnology for Livestock Production 3* (pp. 1-57). Cham: Springer Nature Switzerland.
- Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P.L. & Scaruffi, P. (2013). Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human reproduction*, 28(10), 2652-2660. <https://doi.org/10.1093/humrep/det314>
- Stroebech, L., Mazzoni, G., Pedersen, H.S., Freude, K.K., Kadarmideen, H.N., Callesen, H. & Hyttel, P. (2018). In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Animal Reproduction (AR)*, 12(3), 465-472.
- Sugie, T. (1965). Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *J. Reprod. Fertil.* 10, 197–201. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0100197>
- Swanson, A., Strawn, E., Lau, E. & Bick, D. (2007). Preimplantation genetic diagnosis: technology and clinical applications. *WMJ-MADISON-*, 106(3), 145.
- Taylor, T.H., Patrick, J.L., Gitlin, S.A., Wilson, J.M., Crain, J.L. & Griffin, D.K. (2014). Comparison of aneuploidy, pregnancy and live birth rates between day 5 and day 6 blastocysts. *Reproductive biomedicine online*, 29(3), 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.06.001>
- Telfer, E.E., Sakaguchi, K., Clarkson, Y.L. & McLaughlin, M. (2020). In vitro growth of immature bovine follicles and oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 1-6. <https://doi.org/10.1071/RD19270>
- Teneva, A., Todorovska, E., Petrović, M.P., Kusza, S., Perriassamy, K., Caro-Petrović, V. & Gadjev, D. (2018). Short tandem repeats (STR) in cattle genomics and breeding. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 34(2), 127-147. <https://doi.org/10.2298/BAH1802127T>
- Thompson, J.G.E., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Donnelly, P.E. & Tervit, H.R. (1990). Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Reproduction*, 89(2), 573-578. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890573>
- Tobler, K.J., Zhao, Y., Ross, R., Benner, A.T., Xu, X., Du, L. & Kearns, W.G. (2015). Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertility and sterility*, 104(2), 418-425. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.028>

- Treff, N.R., Su, J., Tao, X., Northrop, L.E. & Scott Jr, R.T. (2011). Single-cell whole-genome amplification technique impacts the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. *Molecular human reproduction*, 17(6), 335-343. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq103>
- Tšuiiko, O., Zhigalina, D.I., Jatsenko, T., Skryabin, N.A., Kanbekova, O.R., Artyukhova, V.G. & Lebedev, I.N. (2018). Karyotype of the blastocoel fluid demonstrates low concordance with both trophoctoderm and inner cell mass. *Fertility and sterility*, 109(6), 1127-1134. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.02.008>
- Tucci, V., Isles, A.R., Kelsey, G., Ferguson-Smith, A.C., Bartolomei, M.S., Benvenisty, N. & Wilkins, J. (2019). Genomic imprinting and physiological processes in mammals. *Cell*, 176(5), 952-965. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.043>
- Tukur, H.A., Aljumaah, R.S., Swelum, A.A.A., Alowaimier, A.N. & Saadeldin, I.M. (2020). The making of a competent oocyte—a review of oocyte development and its regulation. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 35(1), 2-11. <https://doi.org/10.12750/JARB.35.1.2>
- Tutt, D.A., Passaro, C., Whitworth, D.J. & Holland, M.K. (2020). Laser assisted blastomere extrusion biopsy of in vitro produced cattle embryos—A potential high throughput, minimally invasive approach for sampling pre-morula and morula stage embryos. *Animal Reproduction Science*, 219, 106546. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106546>
- TÜİK. (2023). Hayvansal Üretim İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2023-49681> Erişim tarihi: 30.07.2024
- TÜİK. (2023). Kırmızı Et Üretim İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kirmizi-Et-Uretim-Istatistikleri-2023-53540> Erişim tarihi: 30.07.2024
- TÜİK. (2024). Süt ve Süt Ürünleri Üretimi. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Sut-ve-Sut-Urunleri-Uretimi-Mayis-2024-53603> Erişim tarihi: 30.07.2024
- United Nations, (2022). Department of Economic and Social Affairs, Population Division. *World Population Prospects 2022: Summary of Results*. https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf Erişim tarihi: 26.08.2024
- Ünal, G.O. (2017). Blastosist sıvısı aspirasyonunun in vitro sığır embriyolarında dondurma sonrası viyabiliteye etkisi [Doktora tezi]. Ankara Üniversitesi.
- Van de Goor, L.H.P., Panneman, H. & Van Haeringen, W. A. (2009). A proposal for standardization in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 16 cattle-specific short tandem repeat loci. *Animal genetics*, 40(5), 630-636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01891.x>
- Van Speybroeck, L., De Waele, D., & Van De Vijver, G. (2002). Theories in Early Embryology: Close Connections between Epigenesis, Preformationism, and Self-Organization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 981(1), 7-49. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04910.x>
- Velásquez, A.E., Manríquez, J., Castro, F.O., Cox, J.F., & Rodriguez-Alvarez, L. (2017). Embryo splitting affects the transcriptome during elongation stage of in vitro–produced bovine blastocysts. *Theriogenology*, 87, 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.014>
- Viana, J.H.M., (2023). IETS Data Retrieval Committee In: Embryo Technology Newsletter, v. 41, n.4, https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2022.pdf Erişim tarihi: 30.07.2024

- Vidal, M. (2009). Role of polycomb proteins Ring1A and Ring1B in the epigenetic regulation of gene expression. *International Journal of Developmental Biology*, 53(2), 355. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082690mv>
- Walter, J., Monthoux, C., Fortes, C., Grossmann, J., Roschitzki, B., Meili, T. & Bleul, U. (2020). The bovine cumulus proteome is influenced by maturation condition and maturational competence of the oocyte. *Scientific reports*, 10(1), 9880. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66822-z>
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309-314. [10.1126/science.123.3191.30](https://doi.org/10.1126/science.123.3191.30)
- Wei, Q., Zhong, L., Zhang, S., Mu, H., Xiang, J., Yue, L. & Han, J. (2017). Bovine lineage specification revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Biology of reproduction*, 97(1), 5-17. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox071>
- Willett, E.L. (1953). Egg transfer and superovulation in farm animals. *Iowa State College J. Sci.* 28, 83-100.
- Wilmot, I. and Rowson, L.E.A. (1973). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92, 686-690. [10.1136/vr.92.26.686](https://doi.org/10.1136/vr.92.26.686)
- Wilmot, I., Campbell, K. & Tudge, C. (2001). *The second creation: Dolly and the age of biological control*. Harvard University Press.
- Wright, J.M. (2010). "Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes". *Manual of the International Embryo Transfer Society*, Editors: Stringfellow D. A., Givens M.D. 4th Edition. Illinois. International Embryo Transfer Society Inc., USA.
- Xu, K., and Montag, M. (2012, August). New perspectives on embryo biopsy: not how, but when and why?. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 30, No. 04, pp. 259-266). Thieme Medical Publishers. [10.1055/s-0032-1313905](https://doi.org/10.1055/s-0032-1313905)
- Yu, C., Ji, S.Y., Dang, Y. J., Sha, Q.Q., Yuan, Y.F., Zhou, J.J. & Fan, H.Y. (2016). Oocyte-expressed yes-associated protein is a key activator of the early zygotic genome in mouse. *Cell research*, 26(3), 275-287. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.20>

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Raporu



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 14/02/2024
TOPLANTI NO : 2024-03
DOSYA NO : 2021-73
KARAR NO : 2024-03-21

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ'ın yaptığı; araştırmacı olarak Arş. Gör. Arzu ESEN'in katıldığı "In vitro elde edilen sığır blastosistlerinde blastosist sıvısından genomik DNA izolasyonu" başlıklı çalışma Kurulumuzun 14/07/2021 tarihli toplantısında alınan 2021-13-103 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Proje yürütücüsü tarafından kurulumuza verilen 29.01.2024 tarih ve 325013 sayılı dilekçede, proje izin süresinin uzatılması talep edilmektedir.

Söz konusu dilekçe, Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" nin 11/5 maddesi kapsamında değerlendirilmiş ve çalışmanın geçerlilik süresinin 04/03/2025 tarihine kadar uzatılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.