

# TAVŞAN EMBRİYOLARININ GELİŞME HIZLARINI VE X KROMOZOMUNA BAĞLI ENZİM AKTİVASYONLARINI ÖLÇEREK CİNSİYETLERİNİ SAPTAMA ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR<sup>1</sup>

*Murat FİNDİK<sup>2</sup>*

*Studies on sexing of rabbit embryos by measuring of growth rate and X-linked enzyme activity.*

**Summary:** *This study was performed with the purpose of determining of the relationship between sex and growth rate as well X-linked enzyme activity of rabbit embryos and to investigate to usefulness of these features for determining the embryonic sex in early periods.*

*In the study, 40 female and 10 male New Zealand white rabbits were used as a material. Twenty out of 40 female rabbits have been operated at postcoital 96<sup>th</sup> hour and the other twenty at 120<sup>th</sup> hour. Embryos were collected by flushing oviduct and uterus. Then, embryos were examined microscopically and their stages were determined. Next, morphologically normal embryos have been put in petri dishes according to the stage of embryos and their enzyme activities were measured. In order for sex identification by determining X-linked enzyme activity, Brilliant Cresyl Blue (Sigma) and reaction mixture (PBS + 0.3% BSA + 0.05 mM  $\beta$ -NADP + 0.5 mM Na-G6P; Sigma) was used. So as to specify which sex they possess the karyotype of embryos of which their stage and enzyme activities determined was prepared.*

*In this study 113 female and 122 male embryos have been obtained variable in stage. According to G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase) activity, 60.18% of female embryos and 58.2% of male embryos were correctly identified as to sex ( $p>0,05$ ). As a result of chromosome analysis, in 53.7% of male embryos and 50% of female embryos sex identification was correct as to their stages.*

*In the study, 119 embryos have been determined as female and 116 embryos have been determined as male according to enzyme activity. Finally, 55.32% of 119 female embryos and 60% of 116 male embryos were correctly determined. In 92 of 147 embryos (62.59%) used for chromosome analysis embryonic sexing specified. Of these embryos, 48 (52.17%) and 44 (47.83%) were found to be male and female respectively ( $p>0,05$ ).*

*As a consequence, as to embryo stage, correct embryo sexing rate was 53.7% in males and 50% in females. As for G6PD activity this rate was 60% in males and*

1. A.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenen (94-30-00-27) doktora tezinden özetlenmiştir.  
2. Araş.Gör.Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara.

55.32% in females. In both techniques, male-female ratio was found to be similar ( $p>0.05$ ).

**Key words:** Rabbit, embryo sexing, growth rate, X-linked enzyme activity.

**Özet:** Bu çalışma, tavşan embriyolarının gelişme hızları ve X kromozomuna bağlı enzim aktivasyonları ile cinsiyetleri arasındaki ilişkiyi belirlemek ve bu özelliklerin erken dönemde embriyonik cinsiyet saptanmasında kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla yapıldı.

Çalışmanın hayvan materyalini 40 dişi ve 10 erkek Yeni Zelanda beyaz tavşanı oluşturdu. Dişilerden 20'si çiftleşmeden sonraki 96. ve diğer 20'si ise 120. saatte operasyona alındı. Oviduct ve uterus yıkanarak elde edilen embriyoların gelişme evreleri belirlendi ve düzgün morfolojik yapılu embriyolar gelişme aşamalarına göre ayrı ayrı petri kutularına konularak enzim aktivasyonları ölçüldü. X kromozomuna bağlı enzim aktivasyonunu belirleyerek cinsiyeti saptamak için Brilliant Cresyl Blue ve Reaksiyon Karışımı kullanıldı. Gelişme aşamaları ve enzim aktivasyonları belirlenen embriyoların gerçekte hangi cinsiyette olduklarını saptamak için karyotipleri hazırlandı.

Çalışmada gelişme aşamalarına göre 113 dişi ve 122 erkek embriyo elde edildi. G6PD (glikoz-6-fosfat dehidrojenaz) aktivitesine göre dişi embriyolardan %60,18'inin, erkek embriyolardan ise %58,2'sinin tanısı doğru yapıldı ( $p>0.05$ ). Kromozom analizi sonucunda, gelişme aşamasına göre erkek olarak ayrılan embriyolardan %53,7'sinde ve dişi olarak ayrılan embriyolardan %50'sinde cinsiyet tanısının doğruluğu belirlendi.

Çalışma sırasında enzim aktivitesine göre dişi oldukları belirlenen 119 embriyodan %55,32'sinin dişi; erkek oldukları belirlenen 116 embriyodan ise %60'ünün erkek olduğu doğrulandı. Kromozom analizi için kullanılan 147 embriyonun 92'sinde (%62,59) embriyonik cinsiyet belirlendi. Bu embriyoların 48'inin erkek (%52,17) ve 44'ünün (%47,83) dişi olduğu saptandı ( $p>0.05$ ).

Çalışma sonucunda gelişme aşamasına göre cinsiyetin erkeklerde %53,7, dişilerde %50; G6PD aktivitesi sonuçlarına göre de erkeklerde %60, dişilerde %55,32 oranında doğruluğu belirlendi. Her iki yöntemde de erkek:dişi oranları genelde birbirine yakın bulundu ( $p>0.05$ ).

**Anahtar Sözcükler:** Tavşan, embriyonik cinsiyeti saptama, gelişme hızı, X kromozomuna bağlı enzim aktivitesi.

## Giriş

İnsanoğlu yüzyıllar boyunca hem kendi çocuklarının ve hem de besledikleri hayvanların yavrularının cinsiyetlerini, yavrular doğmadan önce çok çeşitli yöntemlerle belirlemeye çalışmışlardır. Günümüz dünyasında pek çok hekim, çocuğunun cinsiyetini önceden saptamak isteyen insanlara çeşitli gıda rejimleri, cinsel ilişki takvimleri ve teknikleri önermekte, ayrıca halk arasında da birçok ampirik yöntem

bulunmaktadır (10, 11, 15, 22, 46). Son 15-20 yılda gelişen spermatolojik ve embriyolojik teknikler sonucunda, birçok bilimsel yöntem kullanılarak, cinsiyet saptama çalışmaları yapılmış ve bunların bir bölümünden iyi sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle son yıllarda daha da gelişen laboratuvar koşulları ve yeni kültür ortamları sayesinde bu konuda önemli gelişmeler sağlanmıştır (22, 40, 46). Günümüze değin hayvan embriyolarında yapılan cinsiyet belirleme çalışmalarının insan embriyolarına uy-

gulanabilirliği tüm dünyada tartışılmaktadır (10, 22).

Memeli hayvanlarda cinsiyetin genetik temeli X ve Y kromozomlarına dayanmakta, Y kromozomunun varlığı ya da yokluğu yavrunun cinsiyetini belirlemektedir (30). Cinsiyeti bilinen yavruların elde edilebilmesi için, ya tohumlamada kullanılacak spermatozoonların hangi cinsiyet kromozomunu taşıdığını belirlemek ve tohumlamaları istenilen cinsiyet kromozomunu taşıyan spermatozoonlarla yapmak ya da in vivo veya in vitro koşullarda elde edilen embriyoların cinsiyetlerini belirleyerek istenilen cinsiyettekileri alıcı hayvanlara transfer etmek gerekmektedir (11, 12). Bundan başka, gebe hayvanlarda da fetal cinsiyet, ultrasonografi ve amniosentez gibi yöntemlerle belirlenebilmektedir (1, 9, 24, 29). Embriyonik cinsiyet saptama çalışması, ilk olarak Hare ve ark. (21) tarafından sığır embriyolarında gerçekleştirilmiştir.

Testislerde üretilen X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonları birbirinden ayırıp, farklı tohumlama payetlerine toplayarak yapılacak cinsiyet saptama işleminin, en ideal cinsiyeti saptama yöntemi olacağı (2, 33, 44), ancak günümüzde ticari kullanım için pratikleştirilebilmiş ekonomik bir ayırma yönteminin bulunmadığı bildirilmektedir (12, 23). Spermada cinsiyeti saptama teknikleri, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonların kütle, hacim, yoğunluk, hareket ve motilite gibi fiziksel karakterleri arasındaki farklılıklara dayanmaktadır (3, 11, 15, 30, 46). Bu karakterler arasındaki farklılıkları saptayabilmek için denemekte olan yöntemler ise spermatozoonları basınç ve pH değişikliği, milipor filtrasyon, sephadex jel filtrasyon, elektroforezis, santrifüj, sedimentasyon, selektif imha ve flow sitometri ile ayırma. H-Y antijenine karşı immunizasyonla, immunomanyetik teknikle veya albümin sütunları üzerinde fraksiyonlara ayırma olarak bildirilmiştir (15, 17, 23, 43).

Embriyonik cinsiyeti saptama yöntemlerinin ticari kullanım potansiyeline sahip olduğu, verici hayvanlardan toplanan veya in vitro koşullarda üretilen implantasyon öncesi embriyoların cinsiyetlerinin belirlenmesiyle,

alıcı hayvanlara sadece istenilen cinsiyetteki embriyolar nakledilerek, istenilen cinsiyetten istenildiği kadar gebelik oluşturulabileceği bildirilmektedir (5, 6, 14, 40). Hücrel analizlerle Barr cisimciğinin, cinsiyet kromozomlarının, erkeklere özel antijenlerin, erkek ve dişi embriyolar arasındaki gelişme hızı ve gidişindeki farklılıkların, erkek ve dişi embriyolar arasındaki metabolik aktivite farklılıklarının belirlenmesi veya Y kromozomuna özel DNA zincirlerini kullanarak embriyonik cinsiyet tanısı gibi yöntemler implantasyon öncesi embriyolarda cinsiyeti saptamak için kullanılmaktadır (22, 43).

Embriyonik cinsiyeti saptama yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesinde yöntemin doğruluk derecesi, embriyonun yaşama gücü üzerine yaptığı etki, uygulanan tekniğin toplam maliyeti, tekniğin çalışma hızı ve gereksinim duyulan teknik uzmanlık derecesi gibi parametreler kullanılmaktadır (3, 22, 32, 33, 43).

Hücrel analizlerle cinsiyeti saptama ya da karyotiplendirme yönteminin tavşan, inek ve koyunlarda gerçekleştirilen ilk cinsiyeti saptama yöntemi olduğu bildirilmektedir (22, 25, 43). Bu teknikte, iki X kromozomunun ya da bir Y kromozomunun tanınabilmesiyle veya Barr cisimciğinin belirlenmesiyle cinsiyet saptanmaktadır.

Araştırmacılar (17, 25, 32, 43), hücrel analizler kullanılarak yapılan cinsiyet tanılarının doğruluk oranlarının %100'e yakın olduğunu; ancak, tanının doğruluğuna karşın, cinsiyeti belirlenen embriyoların çoğunun analizden etkilenerek yaşama güçlerini kaybettiklerini bildirmektedirler.

Gates (16), çiftleşme sonrası değişik zamanlarda toplanan embriyoların gelişme aşamalarının büyük farklılıklar gösterdiğini ve bunun 3 değişik faktör (fertilizasyon zamanındaki farklılıklar, embriyonun bölünme oranı, gelişmenin duraklaması veya tamamen durması) nedeniyle oluşabileceğini bildirmektedir. Embriyonun cinsiyeti ile gelişme hızı arasındaki ilişki ilk olarak Tsunoda ve ark. (41) tarafından fare embriyolarında in-

celenmiştir. Araştırmacılar hızlı gelişen ve blastosölü daha önce oluşan embriyoların transfer edildiği alıcı hayvanlardan doğan canlı yavruların %71'inin erkek olduğunu belirlemişlerdir.

In vitro üretilen sığır embriyolarından erkek olanların, fertilizasyonu izleyen 8 gün boyunca kültür ortamında dişilerden daha hızlı bölündüğü ve büyüdüğü bildirilmekte ve bunun embriyonik genomun aktivasyona başlamasının hemen ardından cinsiyete bağlı genler etkisiyle oluştuğu öne sürülmektedir (5, 6, 7, 8). Yadav ve ark. (48) ise, sığır embriyolarında seksüel dimorfizmin embriyonik genom aktivasyonundan önce bile görülebildiğini bildirmektedirler.

Xu ve ark. (47), tohumlamayı izleyen 8. günde açılmış blastosist evresine ulaşan embriyoların büyük çoğunluğunun erkek olduğunu ve erkek embriyoların dişilerden önemli oranda fazla hücreye sahip olduklarını, diğer araştırmacılar ise (34, 39, 42) aynı şekilde erken bölünen embriyoların blastosist evresine ulaşma olasılıklarının yavaş bölünen embriyolardan daha yüksek olduğunu bildirmektedirler.

Peippo ve Bredbacka (38), çiftleşmeyi izleyen 3. ve 4. günlerde topladıkları fare embriyolarını 24 saat süreyle in vitro kültüre etmişler ve her iki grupta da cinsiyete bağlı bir gelişme farklılığı belirlemişler, ayrıca uzun in vivo periyotta dişilerin, kısa in vivo periyodu takiben in vitro kültür sonrasında ise erkek embriyoların ağırlıkta olduklarını saptamışlardır.

Araştırmacılar (19, 26) mikromanipulasyon, kültür ve/veya dondurma sonrası sığır ve fare embriyolarının yaşama gücündeki değişimlerin cinsiyetle ilgili olabileceğini ve erkek embriyoların olumsuz kültür ortamlarına dişilerden daha dayanıklı olduklarını buna karşılık diğer araştırmacılar ise (18, 28) farklı in vitro kültür ortamlarında geliştirdikleri embriyolarda cinsiyet oranlarında bir fark görülmediğini bildirmektedirler.

Günümüze değin yapılan çalışmalar sonrasında, erkek embriyoların, dişi embriyolardan daha hızlı geliştiği ve hepsi aynı anda döllen embriyoların gelişme hızlarına bakılarak

erkek veya dişi olarak ayırabilmenin mümkün olabileceği kanısına varılmıştır (6, 14, 47, 48).

Süperovulasyon yaptırılan hayvanlarda, ovulasyonlar belirli bir zaman periyodu içinde oluşmaktadır. Bu nedenle, tüm ovulasyonlar aynı zamanda şekillenmemektedir. Daha önce ovule olan ve X kromozomu taşıyan bir spermatozoon tarafından dölenen bir oosit, daha sonra ovule olan ve Y kromozomu taşıyan bir spermatozoon tarafından dölenen oositten daha önce gelişebilmekte ve yanlış olarak erkek bir yavru gibi değerlendirilebilmektedir (5, 6, 7, 8, 41).

Embriyonun taşıdığı X kromozomu sayısı, aktivasyonu X kromozomuna bağlı bulunan enzimlerin hücresel konsantrasyonuna ve aktivitesine aksetmektedir. Bu enzimlerin hücresel konsantrasyonu ve aktivitesi iki X kromozomu taşıyan dişilerde, bir X kromozomu taşıyan erkeklerdekinin iki katı olmaktadır (33, 35, 36, 43, 45).

Gelişimin erken dönemlerinde, HGPRT (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase), HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase),  $\alpha$ -gal ( $\alpha$ -galactosidase) ve G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) gibi enzimlerin hücresel konsantrasyonu, hücrenin sahip olduğu X kromozomu sayısına bağlıdır (45). Monk ve Harper (36), dişi embriyolardaki HGPRT seviyesinin, erkek embriyolardakinin iki katı olduğunu bildirmektedirler. Embriyo metabolizmasındaki bireysel farklılıkların hesabını yapabilmek için, X kromozomuna bağlı enzim aktivitesi hem dişilerde ve hem de erkeklerde, otozomal kromozomlara bağlı enzimlerin aktiviteleriyle kıyaslanabilir. X kromozomuna bağlı enzim aktivitesiyle, otozomal kromozomlara bağlı enzim aktiviteleri arasındaki oranın, dişi embriyolarda, erkeklerdekinden daha yüksek olacağı hipotezine dayanan araştırmacılar (35, 45), süperovulasyon yaptırılan ve tohumlanan farelerden elde edilen implantasyon öncesi embriyolarda cinsiyeti saptayabilmişlerdir.

Araştırmacılar (30, 35, 36, 45), bu yöntemlerin embriyolar için belirli bir düzeyde toksik etkili olduğunu, yüksek enzim aktivitesi ya

da embriyo üzerinde kalan boya artıkları nedeniyle embriyonik ölümlerin oluşabildiğini, memeli hayvanlarda, dişi hücrelerinde bulunan ikinci X kromozomunun inaktivasyon zamanının kesin olarak bilinmediğini ve bu nedenle hatalı sonuçların oluşabileceğini, embriyonik genomun aktivasyon zamanının türlere göre değişiklik gösterebildiğini, her enzim aktivitesi düzeyinin, toplam hücresel aktivasyonun bir parçası olduğunu ve bu nedenle, doğru sonuçlar elde etmek için toplam hücresel aktivasyonun da değerlendirilmesi gerektiğini belirtmektedirler.

Sunulan bilgilerin ışığı altında bu çalışma, tavşan embriyolarının gelişme hızları ve X kromozomuna bağlı enzim aktivasyonları ile cinsiyetleri arasındaki ilişkiyi belirlemek, bu yöntemlerin embriyonik cinsiyet saptanmasında kullanılabilirliklerini, bilinen bir yöntemle karşılaştırmak amacıyla yapıldı.

### Materyal ve Metot

Çalışmanın hayvan materyalini 8-12 aylık, doğum yapmamış, 40 dişi ve 10 erkek Yeni Zelanda beyaz tavşanı oluşturdu. Tavşanlar çalışmadan önceki 3 hafta ve çalışma süresince A.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında hazırlanan tekli kafeslerde barındırıldı. Tavşanların bulunduğu ortamın 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olması sağlandı.

Çalışma materyalindeki 40 dişi tavşanın tamamını embriyo elde etmek için kullanıldı. Çalışmada çok sayıda follikül gelişimini sağlamak amacıyla PMSG (Folligon®, Intervet); ovulasyonu uyarmak amacıyla da hCG (Pregnyl®, Organon) hormonları kullanıldı. Dişi tavşanlara PMSG 1., 2. ve 3. gün 50 IU. im., hCG ise 4. gün öğleden sonra 50 IU. iv. verildi. HCG enjeksiyonundan sonra tavşanlar çiftleştirildi. Çiftleştirme için her uygulama grubunda farklı erkek tavşanlar seçildi ve erkek tavşanlar dindendirilerek kullanıldı. Dişi tavşanlardan 20'sine hCG uygulamasını izleyen 96. ve diğer 20'sine ise 120. saatte median çizgiden laparotomi yapılarak, her iki ovaryum üzerindeki corpus luteum, patlamamış follikül ve hemorajik folliküller sayılarak not edildi. La-

parotomi işlemi 5 mg/kg xylazine (Rompun®, Bayer) ve 35 mg/kg ketamin HCl (Ketalar®, Parke-Davis) ile sağlanan genel anestezi altında gerçekleştirildi. Oviduct ve uterusu yıkamak için 5-10 ml kadar 37°C'de steril PBS kullanıldı. Tavşanlar operasyon sonrası 1 ay süreyle gözlem altında tutuldular.

Elde edilen embriyolar stereo mikroskop altında 10x40 büyütmede incelenerek ulaştıkları gelişme aşamaları Avery ve ark. (7)'nin bildirdiği şekilde belirlendi. Düzgün morfolojik yapılı embriyolar gelişme aşamalarına göre ayrı ayrı petri kutularına konularak enzim aktivasyonunu ölçmek için kullanıldı. Embriyoların glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi aktivitelerini belirlemek amacıyla, Williams (45)'in tarif ettiği kolorimetrik ölçüm tekniği model olarak alındı. Bu amaçla embriyolar 0,05 mg/ml BCB (Brilliant Cresyl Blue, Sigma) solusyonu içinde 15-20 dakika boyandılar ve daha sonra Reaksiyon Karışımı (PBS + %0,3 BSA + 0,05 mM B-NADP + 0,5 mM Na-G6P; Sigma) içinde 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edildiler. İnkubasyondan sonra her embriyo içerdiği boya miktarına göre değerlendirildi ve bu değerlendirme işleminde skala "0" ile "5" arasında tutuldu. Hiç boya içermeyen, yani yüksek enzim aktivasyonuna sahip olan embriyoların skalası "0", çok boya içeren yani düşük enzim aktivasyonuna sahip olan embriyoların skalası ise "5" olarak değerlendirildi. "0", "1" ve "2" skalada değerlendirilen embriyoların dişi, "3", "4" ve "5" skaladaki embriyoların ise erkek oldukları kabul edildi. Değerlendirmeler 10x10 büyütmede stereo mikroskopta yapıldı.

Gelişme aşamaları ve enzim aktivasyonları belirlenen embriyoların gerçekte hangi cinsiyete sahip olduklarını belirlemek için taşıdıkları kromozomları görmek amacıyla da bu embriyolar King (25)'in bildirdiği şekilde 4-6 saat süreyle FCS ile desteklenmiş Ham's F-10 medyumunda 37°C'de kültüre edildiler. Bu kültür işleminin son 2 saati içinde kültür ortamına 0,05 mg/ml demecolcine (Sigma) ilave edildi. Kültür sonrasında embriyolar 0,05 M KCl içinde 10-15 dakika bekletildiler ve bunu takiben metanol: asetik asit (3:1) karışımı ile tespit edildiler. Son olarak tespit edilen bu embriyolar %4 giemsa ile boyandı ve immersiyon objektifli mikroskopta kromozomları belirlendi.

Tablo 1. Tavşanlarda PMSG + hCG uygulamasından sonra ovaryumlardaki fonksiyonel yapılar ve uterus yıkantısındaki oosit ve embriyo sayıları.

Table 1. Functional structures on ovaries and oocytes and embryo counts in the uterine flush following the PMSG + hCG application.

Operasyon saati	96.saat (n=20)	120. saat (n=20)	Toplam (n=40)
	Ortalama ± Std. Sapma (n)	Ortalama ± Std. Sapma (n)	Ortalama ± Std. Sapma (n)
Corpus luteum sayısı	15,45 ± 4,7 <sup>a</sup> (309)	13,0 ± 5,13 <sup>a</sup> (260)	14,22 ± 5,0 (569)
Hemorajik follikül sayısı	10,15 ± 3,4 <sup>b</sup> (203)	10,7 ± 3,4 <sup>b</sup> (214)	10,42 ± 3,4 (417)
Patlamamış follikül sayısı	15,2 ± 3,3 <sup>c</sup> (304)	18,6 ± 9,6 <sup>c</sup> (372)	16,9 ± 7,3 (676)
Toplanan embriyo sayısı	8,1 ± 4,8 <sup>d</sup> (162)	6,6 ± 4,4 <sup>d</sup> (132)	7,35 ± 4,6 (294)
Toplanan oosit sayısı	1,35 ± 1,3 <sup>e</sup> (27)	1,75 ± 1,5 <sup>e</sup> (35)	1,55 ± 1,4 (62)
Elde edilme oranı (%)	61,17	64,23	62,57

Aynı satırda aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemsizdir (p>0,05).

Elde edilen sonuçlar SPSS bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi.

### Bulgular

Tavşanlarda yapılan laparatomide ovaryumlarda sayılan corpus luteum ve follikül gibi yapılar ile embriyo elde edilme oranları tablo 1'de sunulmuştur. Tüm tavşanlarda ortalama 14,22±5,0 adet corpus luteum, 10,42±3,4 adet hemorajik follikül ve 16,9±7,3 adet patlamamış follikül sayılmıştır. Çiftleşmeyi izleyen 96. ve 120. saatlerde yapılan gözlemlerde ovaryumlardaki corpus luteum, hemorajik follikül ve patlamamış follikül sayıları karşılaştırılmış ve aralarında önemli bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (P>0,05).

Çiftleşmeyi takip eden 96. saatte yapılan flushing sonucunda embriyo ve oosit elde edilme oranı %61,17 (189/309) olurken, bu oran 120. saatte yapılan flushingde %64,23 (167/260) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 40 tavşandan 34'ünde flushing sonucu embriyo ve oosit elde edilebilmiş ve toplam elde edilme oranı %62,57 (356/569) olmuştur. Çiftleşme sonrası 96. ve 120. saatte elde edilen embriyo ve oosit sayıları karşılaştırılmış ve aralarında önemli bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (P>0,05).

Çalışmada elde edilen embriyoların morfolojik değerlendirme sonuçları tablo 2'de sunulmuştur. Çiftleşme sonrası 96. saatte yapılan flushing işleminde toplam 162 embriyo elde edilmiş, bunlardan 44'ünün erken blastosist, 46'sının blastosist, 37'sinin gelişen blastosist, 13'ünün genişlemiş blastosist ve 22'sinin dejenere embriyo olduğu belirlenmiştir. Çiftleşmeyi izleyen 120. saatte yapılan flushing işleminde ise 6'sı erken blastosist, 28'i blastosist, 39'u gelişen blastosist, 22'si genişlemiş blastosist ve 37'si dejenere olmak üzere toplam 132 embriyo elde edilmiştir. Çiftleşme sonrası 96. ve 120. saatte elde edilen erkkek ve dişi embriyo sayıları arasındaki fark önemli bulunmuştur (p<0,001). Doksanaltıncı ve 120. saatlerde elde edilen erken blastosist, genişleyen blastosist ve gelişmiş blastosist aşamasındaki embriyo sayıları arasındaki fark önemli (sırasıyla p<0,001, p<0,05 ve p<0,01) bulunurken, blastosist aşamasındaki embriyo sayıları arasındaki fark ise önemsiz (p>0,05) bulunmuştur.

Elde edilen embriyoların morfolojik değerlendirme sonuçları ile enzim aktivitesi skorları ve kromozom analizi değerlerinin karşılaştırma sonuçları tablo 3'de sunulmuştur. Erken blastosist evresindeki embriyoların tümü gelişme aşamalarına göre dişi olarak belirlenirken G6PD aktivitesi sonuçlarına göre

Tablo 2. Uterus yıkaması sonucu elde edilen embriyoların morfolojik değerlendirme sonuçları.  
Table 2. Morphological examination results of embryos that obtained after uterine flushing.

	TES	Gelişme evresi	Embriyo sayısı	%	Erkek embriyo		Dişi embriyo	
					Sayısı	(%)	Sayısı	(%)
96. saat (n=17)	140	EB	44 <sup>a</sup>	31,43	0 <sup>x</sup>	0	44 <sup>y</sup>	100
		B	46 <sup>b</sup>	32,86	17 <sup>x</sup>	36,95	29 <sup>y</sup>	63,05
		XB	37 <sup>c</sup>	26,43	36 <sup>x</sup>	97,3	1 <sup>y</sup>	2,7
		GB	13 <sup>c</sup>	9,28	13 <sup>x</sup>	100	0 <sup>y</sup>	0
120. saat (n=17)	95	EB	6 <sup>b</sup>	6,32	0 <sup>x</sup>	0	6 <sup>y</sup>	100
		B	28 <sup>b</sup>	29,47	2 <sup>x</sup>	7,14	26 <sup>y</sup>	92,86
		XB	39 <sup>d</sup>	41,05	32 <sup>x</sup>	82,05	7 <sup>y</sup>	17,95
		GB	22 <sup>f</sup>	23,16	22 <sup>x</sup>	100	0 <sup>y</sup>	0
Toplam (n=34)	235		235	-	122	-	113	

Embriyo sayısı sütununda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemli (a:b=p<0,001; c:d=p<0,05 ve e:f=p<0,01) bulunurken aynı harfle gösterilen değerler arasındaki fark önemsiz (g:g=p>0,05).

Aynı satırda farklı harflerle (x:y) gösterilen değerler arasındaki fark önemlidir (p<0,001).

TES: Toplam embriyo sayısı (dejenere embriyolar hariç), EB: Erken blastosist, B: Blastosist, XB: Gelişen blastosist, GB: Genişlemiş blastosist.

bunların %60'ının dişi olduğu saptandı. Gelişme aşamasına göre belirlenen oran ile enzim aktivitesi ile belirlenen oran arasındaki fark önemli bulundu (p<0,001). Bu embriyolardan %53,85'inin dişi olduğu kromozom analizi ile doğrulandı. Enzim aktivitesi ile belirlenen oran ile kromozom analizi ile elde edilen oran arasındaki fark ise önemsiz bulundu (p>0,05).

Blastosist evresindeki embriyoların gelişme aşamalarına göre %74,32'si dişi ve %25,68'i erkek olarak belirlendi. G6PD aktivitesi sonuçlarına göre ise bu embriyoların %54,05'i dişi ve %45,95'i erkek olarak ayrıldı. Bu oranlar arasındaki fark önemli bulundu (p<0,01). Blastosist evresindeki embriyolar için enzim aktivitesi ile belirlenen oran ile kromozom analizi ile elde edilen oran arasındaki fark ise önemsiz bulundu (p>0,05).

Gelişen blastosist evresindeki embriyoların gelişme aşamalarına göre %10,53'ü dişi ve

%89,47'si erkek olarak belirlendi. G6PD aktivitesi sonuçlarına göre ise bu embriyoların %46,05'i dişi ve %53,95'i erkek olarak ayrıldı. Bu oranlar arasındaki fark önemli bulundu (p<0,001). Bu evredeki embriyolar için enzim aktivitesi ile belirlenen oran ile kromozom analizi ile elde edilen oran arasındaki fark ise önemsiz bulundu (p>0,05).

Genişlemiş blastosist evresindeki embriyoların tümü gelişme aşamalarına göre erkek olarak belirlendi. G6PD aktivitesi sonuçlarına göre ise bu embriyoların %40'ı dişi ve %60'ı erkek olarak ayrıldı. Bu oranlar arasındaki fark önemli bulundu (p<0,001). Genişlemiş blastosist evresindeki embriyolarda enzim aktivitesi ile belirlenen oran ile kromozom analizi ile elde edilen oran arasındaki fark önemsiz bulundu (p>0,05).

Bu çalışmada elde edilen embriyoların (n=235) gelişme aşamalarına göre 113 adeti (%48,09) dişi ve 122 adeti (%51,91) erkek ola-

Tablo 3. Embriyoların morfolojik değerlendirme sonuçlarının, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi aktivitesi skorları ve kromozom analizi sonuçları ile karşılaştırılması.  
Table 3. Comparison of morphological examination results with glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity scores and chromosome analysis results of embryos.

Gelişme evresi (ES: embriyo sayısı)		G6PD aktivitesi			Kromozom Analizi			
		Skala	ES	Doğruluk oranı	Kullanılan ES	Cinsiyeti belirlenen ES (%)	Embriyonik cinsiyet	
							Erkek (%)	Dişi (%)
EB (50)	D (50)	0-1-2	30	%60	14	8 (57,14)	3 (37,5)	5 (62,5)
		3-4-5	20		12	5 (41,67)	3 (60)	2 (40)
B (74)	E (19)	0-1-2	7	%63,16	4	2 (50)	1 (50)	1 (50)
		3-4-5	12		6	4 (66,67)	3 (75)	1 (25)
	D (55)	0-1-2	33	%60	18	13 (72,22)	6 (46,15)	7 (53,85)
		3-4-5	22		17	9 (52,94)	5 (55,56)	4 (44,44)
XB (76)	E (68)	0-1-2	30	%55,88	23	15 (65,22)	6 (40)	9 (60)
		3-4-5	38		25	17 (68)	10 (58,82)	7 (41,18)
	D (8)	0-1-2	5	%62,5	2	2 (100)	1 (50)	1 (50)
		3-4-5	3		3	1 (33,33)	1 (100)	0 (0)
GB (35)	E (35)	0-1-2	14	%60	11	7 (63,64)	4 (57,14)	3 (42,86)
		3-4-5	21		12	9 (75)	5 (55,56)	4 (44,44)
Toplam (235)	D (113)	0-1-2	68	%60,18	66	38 (57,58)	19 (50)	19 (50)
	E (122)	3-4-5	71	%58,2	81	54 (66,67)	29 (53,7)	25 (46,3)

D: Dişi, E: Erkek, EB: Erken blastosist, B: Blastosist, XB: Gelişen blastosist, GB: Genişlemiş blastosist.

arak belirlendi. G6PD aktivitesi sonuçlarına göre dişi olarak ayrılan embriyolardan %60,18'inin (n=68) dişi, erkek olarak ayrılan embriyolardan ise %58,2'sinin (n=71) erkek olduğu belirlendi. Bu oranlar arasındaki fark önemli bulunmadı ( $p>0,05$ ). Bu embriyoların 92 adetinde kromozom analizi ile cinsiyet belirlenebildi (44 dişi, %47,83 ve 48 erkek %52,17). Enzim aktivitesi ile belirlenen oran ile kromozom analizi ile elde edilen oran arasındaki fark önemsiz bulundu ( $p>0,05$ ).

Gelişme aşamasına göre erkek olarak ayrılan 122 embriyodan 81 tanesi (%66,39) kromozom analizi için kullanıldı ve bunlardan 54'ünde (%66,67) cinsiyet belirlendi. Gelişme aşamasına göre erkek oldukları belirlenen bu 54 embriyodan 29'unun (%53,7) erkek olduğu kromozom analizi ile doğrulandı. Gelişme aşamasına göre dişi olarak ayrılan 113 embriyodan 66 tanesi (%58,41) kromozom analizi için kullanıldı ve bunlardan 38'inde (%57,58) cinsiyet belirlendi. Gelişme aşamasına göre dişi ol-

dukları belirlenen bu 38 embriyodan 19'unun (%50) dişi olduğu kromozom analizi ile doğrulandı.

Bu çalışmada elde edilen 235 embriyonun glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi aktivitesi sonuçlarına göre 119'unun (%50,64) dişi ve 116'sının (%49,36) erkek olduğu belirlendi. Enzim aktivitesine göre dişi oldukları belirlenen 119 embriyodan 72'si (%60,5) kromozom analizi için kullanıldı ve 47 embriyonun (%65,28) cinsiyeti belirlendi. Bu 47 embriyodan 26'sının (%55,32) dişi olduğu doğrulandı. Enzim aktivitesine göre erkek oldukları belirlenen 116 embriyodan 75'i (%64,66) kromozom analizi için kullanıldı ve 45 embriyonun (%60) cinsiyeti belirlendi. Bu 45 embriyodan 27'sinin (%60) erkek olduğu doğrulandı (Tablo 4).

Elde edilen 235 embriyodan 147'si (%62,55) kromozom analizi için kullanıldı. Bunların 92'sinde (%62,59) embriyonik cinsiyet



Tablo 4. Embriyoların glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi aktivitesi skorları ile kromozom analizi sonuçlarının karşılaştırılması.

Table 4. Comparison of glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity scores with chromosome analysis results of embryos.

	G6PD aktivitesi		Kromozom Analizi				
	Skala	ES (%)	Kullanılan ES (%)	Cinsiyeti belirlenen ES (%)	Embriyonik cinsiyet		Doğruluk oranı
					Erkek	Dişi	
Toplam (235)	0-1-2	119 (50,64) <sup>a</sup>	72 (60,5)	47(65,27)	21	26	%55,32 <sup>a</sup>
	3-4-5	116 (49,36) <sup>b</sup>	75 (64,66)	45 (60)	27	18	% 60 <sup>b</sup>

Aynı satırda aynı harflerle (a/a / b:b) gösterilen değerler arasındaki fark önemsizdir (p>0,05). ES: Embriyo sayısı.

belirlenebildi. Bu embriyoların 48'inin erkek (%52,17) ve 44'ünün (%47,83) dişi olduğu belirlendi. Enzim aktivasyonu ve kromozom analizi ile belirlenen erkek ve dişi embriyo oranları arasındaki fark önemsiz bulundu (p>0,05).

### Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada kolay bir şekilde, kısa sürede ve düşük maliyetle embriyonik cinsiyeti saptayabilecek bir yöntem araştırılmıştır. Materyal olarak tavşanların seçilme nedeni, embriyo üzerinde gerçekleştirilecek çalışmalar için en ideal hayvanlardan birisi olmasıdır. Tavşan embriyosu diğer embriyolara oranla daha büyüktür (~140 µm) ve 40-47 saat içinde 16 hücre aşamasına, 75-96 saat içinde de blastosit evresine ulaşmaktadır. Dördüncü güne kadar uterusu inen tavşan embriyoları 7-8. günlerde implante olmaktadır (31). Tavşanların seksüel siklusları değişkendir ve gebelik süreleri kısadır. Tavşan, kolayca bulunabilen, beslenebilen ve bakılabilen bir hayvandır. Bir defada çok sayıda embriyo elde edilebilir. Tavşan, bu çalışmalar için en uygun hayvan türlerinden biridir (4, 20, 27, 37). Bu çalışmada kullanılan hiçbir tavşan öldürülmemiştir. Embriyolar cerrahi yöntemle toplanmış ve bütün tavşanlar operasyon sonrasında iyileşinceye dek barındırılmıştır.

Çiftleşme sonrası değişik zamanlarda toplanan embriyoların gelişme aşamalarının büyük farklılıklar gösterdiği ve bu farklılıkların, fertilizasyon zamanındaki farklılıklar, gelişmenin duraklaması veya tamamen durması, embriyonun bölünme oranı, embriyoların genetik olarak sahip olduğu büyüme kapasitesi ve cin-

siyete bağlı büyüme farklılıkları gibi değişik faktörler nedeniyle oluşabileceği öne sürülmektedir (6, 16). Bu çalışmada da çiftleşme sonrası 96. ve 120. saatlerde toplanan embriyoların gelişme aşamalarının büyük farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. 96. saatte 44 erken blastosit, 46 blastosit, 37 gelişen blastosit, 13 genişlemiş blastosit ve 22 dejenere embriyo elde edilirken, 120. saatte 6 erken blastosit, 28 blastosit, 39 gelişen blastosit, 22 genişlemiş blastosit ve 37 dejenere embriyo elde edilmiştir.

Gelişme hızına göre embriyonik cinsiyet tanısı gerçekten çok hızlı bir yöntemdir. İn vitro koşullarda üretilen ya da canlı hayvanlardan toplanan embriyolar kısa bir süreçte gelişme aşamalarına göre birbirlerinden ayrılabilen ve farklı gelişme aşamalarındaki embriyolar farklı alıcılara transfer edilerek cinsiyet saptaması yapılmaktadır. Ancak, bu teknikte yapılacak cinsiyet tanısının doğruluk oranı daha düşüktür. Çünkü embriyoların değerlendirilmesinde kişisel deneyime gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışmada, gelişme hızına göre cinsiyeti belirlenen 92 embriyonun karyotipleri hazırlanmış ve bunların 48'inde (%52,17) cinsiyet doğru teşhis edilmiştir. Bu oran, Tsunoda ve ark. (41)'nin belirlediği %71 doğruluk oranının çok altında kalmıştır, ancak ineelerde (18), domuzlarda (13) ve tavşanlarda (20) yapılan çalışma sonuçları ile uyumludur. Bu sonuçlar erkek ve dişi embriyolar arasında gelişme hızı bakımından önemli bir fark bulunmadığını göstermektedir.

Sunulan çalışmada embriyoların gelişme hızları ile viabiliteleri arasındaki ilişkiyi belirlemek mümkün olamamıştır. Çünkü elde edilen embriyoların gelişme aşamaları belirlendikten hemen sonra enzim aktivasyonları ölçülmüştür. Bu ilişkiyi doğru olarak saptayabilmek için gelişme aşaması belirlenen embriyoları daha uygun besi yerlerinde kültüre etmek veya alıcı hayvanlara transfer etmek gerekmektedir.

Erkek embriyoların neden dişilerden daha hızlı geliştiği tam olarak anlaşılamamıştır (19, 41). Bununla birlikte, gelişme hızındaki bu farklılığın en erken tohumlamayı izleyen 3. günde görülmesi, bunun embriyonun ilk genomik ekspresyonu ile ilgili olduğunu düşündürmektedir (5, 6, 7, 8). Erken embriyonik gelişimin oldukça kompleks bir işlem olduğu ve in vitro üretilmiş embriyolarda gelişme hızının, inorganik iyonlar, buffer'lar, gaz kompozisyonu, aminoasitler, büyüme faktörleri, vitaminler ve makromoleküller gibi birbirinden farklı pek çok faktör tarafından etkilenebileceği kabul edilmektedir (12, 19).

Bu çalışmada embriyoların glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi aktivitelerini belirlemek amacıyla, Williams (45)'in tarif ettiği kolorimetrik ölçüm tekniği model olarak alınmıştır ve indikatör olarak reaksiyona katılan boya miktarındaki azalma ölçülmüş ve değerlendirme işlemi skala "0" ile "5" arasında tutulmuştur. Çalışmada toplam olarak 235 embriyonun enzim aktivasyonu incelenmiş ve bunların %17,87'si "0", %16,6'sı "1", %16,17'si "2", %17,45'i "3", %16,17'si "4" ve %15,74'ü de "5" skala olarak değerlendirilmiştir. "0", "1" ve "2" skaladaki embriyolar (%50,64) dişi olarak, "3", "4" ve "5" skaladaki embriyolar (%49,36) ise erkek olarak ayrılmıştır. Bu oran Williams (45) 'in %50 oranı ile uyumludur.

Sunulan çalışmada embriyolar alıcı hayvanlara transfer edilmedikleri için gebelik sonuçlarına ulaşamamış ancak, embriyoların kromozom analizleri yapılarak yöntemin doğruluğu belirlenmeye çalışılmıştır. Enzim aktivasyonuna göre dişi olarak belirlenen 47 embriyodan 26'sının (%55,32) ve erkek olarak belirlenen 45 embriyodan 27'sinin (%60) cin-

siyetinin doğru teşhis edildiği ve yöntemin toplam doğruluk oranının %57,61 olduğu belirlenmiştir. Bu oranları Williams (45) dişilerde %72, erkeklerde %57 ve toplamda %64 olarak bildirmektedir. G6PD aktivitesi ile belirlenen erkek ve dişi embriyo oranları ile kromozom analizi ile elde edilen oranlar arasında önemli düzeyde fark belirlenmemiştir ( $p>0,05$ ).

HPRT ve APRT (adenin phosphoribosyl transferase) aktivitelerini belirleyen ve bunlar arasındaki oranı cinsiyet tanısı için kullanarak embriyolar arasındaki hücrel aktivasyon farklılıklarını da hesaba katan Monk ve Handyside (35) ise dişi embriyolarda %91, erkek embriyolarda ise %100 doğrulukla cinsiyeti teşhis edebilmişlerdir. Elde edilen sonuçlar ve Williams (45)'in bulguları bu sonuçlar ile karşılaştırıldığında, daha yüksek doğruluk oranları elde edebilmek için her embriyonun toplam enzim aktivasyonunun belirlenmesi gerektiği görülmektedir.

Bu çalışmada hücrel analizler diğer iki yöntemin sonuçlarını doğrulamak amacıyla kullanıldı. Kromozom analizi yapılan toplam 147 embriyonun 92'sinde (%62,59) embriyonik cinsiyet belirlenebildi. Bu oran araştırmacıların (21, 25) bildirdikleri sonuçlar ile uyumludur ancak, bu oranın düşük olmasında enzim aktivasyonu için kullanılan besi yerinin embriyo üzerinde yaptığı olumsuz etkinin rolü olabileceği düşünülmektedir. Hücrel analiz sonucunda embriyoların %52,17'sinin erkek ve %47,83'ünün dişi olduğu ve erkek:dişi oranının 1,09:1 olduğu belirlendi.

Çalışma sonucunda, G6PD enzimi aktivasyonunu belirleyerek yapılan cinsiyet tanısındaki doğruluk oranlarının, gelişme hızına bakarak yapılan cinsiyet tanısındakinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

### Kaynaklar

1. Alaçam, E., Tekeli, T., Güven, B., Dinç, D.A., Özsar, S., Güler, M. (1991). *İneklerde fetal sıvıdaki testosteron hormonu düzeylerinin araştırılması ile cinsiyet teşhisi*. Hay Araş Derg. 1: 19-21.
2. Anderson, G.B. (1987). *Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigens*. Theriogenology, 27: 81-97.

3. **Anderson, G.B.** (1991). *Fertilization, early development and embryo transfer*. 279-313. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Ed.: Cupps, P.T., 4<sup>th</sup> Edition. Academic Press, San Diego.
4. **Arat, S.** (1993). *PMSC ile süperovule edilen tavşanlarda hCG ve GnRH'in ovulasyon oranı ve embriyo kalitesi üzerine etkisi*. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
5. **Avery, B., Bak, A., Schmidt, M.** (1989). *Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos*. *Theriogenology*, **32**: 139-147.
6. **Avery, B., Jorgensen, C.B., Madison, V., Greve, T.** (1992). *Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos*. *Mol Reprod Dev*, **32**: 265-270.
7. **Avery, B., Madison, V., Greve, T.** (1991). *Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos*. *Theriogenology*, **35**: 953-963.
8. **Avery, B., Schmidt, M., Greve, T.** (1989). *Sex determination of bovine embryos based on cleavage rates*. *Acta Vet Scand*, **30**: 147-153.
9. **Basrur, B.K., Bongso, A.T.** (1980). *Amniocentesis for prenatal detection of sex and cytogenetic defects in cattle*. 1185-1189. In: *Current Therapy in Theriogenology*. Ed.: Morrow, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia.
10. **Betteridge, K.J.** (1984). *The folklore of sexing*. *Theriogenology*, **21**: 3-6.
11. **Betteridge, K.J., Hare, W.C.D, Singh, E.L.** (1981). *Approaches to sex selection in farm animals*. 109-125. In: *New Technologies in Animal Breeding*, Eds: B.G. Brackett, G.E. Seidel, S.M. Seidel. Academic Press, New York.
12. **Carvalho, R.V., Del Campo, M.R., Palasz, A.T., Plante, Y., Mapletoft, R.J.** (1996). *Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7*. *Theriogenology*, **45**: 489-498.
13. **Cassar, G., De La Fuente, R., Yu, Z., King, G.J., King, W.A.** (1995). *Sex chromosome complement and developmental diversity in pre- and post-hatching porcine embryos*. *Theriogenology*, **44**: 879-884.
14. **Catt, S.L., O'Brien, J.K., Maxwell, W.M.C., Evans, G.** (1997). *Effects of rate of development of in vitro-produced ovine embryos on sex ratio and in vivo survival after embryo transfer*. *Theriogenology*, **48**: 1369-1378.
15. **Daniell, J.F.** (1983). *Sex-selection procedures*. *J Reprod Med*, **28**: 235-237.
16. **Gates, A.H.** (1965). *Rate of ovular development as a factor in embryonic survival*. 270-288. In: *Pre-implantation Stages of Pregnancy*, Ed: Wolstenholme, G.E.W., W.B. Saunders Co., London.
17. **Gordon, I.** (1994). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 399-413. CAB International, London.
18. **Grisart, B., Massip, A., Collete, L., Dessy, F.** (1995). *The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered*. *Theriogenology*, **43**: 1097-1106.
19. **Gutiérrez, A., Behboodi, E., Medrano, J.F., Murray, J.D.** (1996). *Relationships between stage and development and sex of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro versus in the sheep oviduct*. *Theriogenology*, **46**: 515-525.
20. **Hafez, E.S.E.** (1962). *Differential cleavage rate in 2-day litter mate rabbit embryos*. *Proc Soc Exp Biol*, **110**: 142-145.
21. **Hare, W.C.D., Mitchell, D., Betteridge, K.J., Eaglesome, M.D., Randell, G.C.B.** (1976). *Sexing 2-week-old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer: Preliminary methods and results*. *Theriogenology*, **5**: 243-253.
22. **Jafar, S.I., Flint, A.P.F.** (1996). *Sex selection in mammals: A review*. *Theriogenology*, **46**: 191-200.
23. **Johnson, L.A.** (1995). *Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome bearing sperm based on DNA difference: A review*. *Reprod Fertil Dev*, **7**: 893-903.
24. **Kamimura, S., Nishiyama, N., Ookutsu, S., Goto, K., Hamana, K.** (1997). *Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis*. *Theriogenology*, **47**: 1563-1569.
25. **King, W.A.** (1984). *Sexing embryos by cytological methods*. *Theriogenology*, **21**: 7-17.
26. **King, W.A., Yadav, B.R. Xu, K.P., Picard, L., Sillard, M-A, Verini Supplizi A., Betteridge, K.J.** (1991). *The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro*. *Theriogenology*, **36**: 779-788.
27. **Kihçoğlu, Ç., Tekeli, T.** (1981). *Tavşanlarda embriyo transferi*. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **28**: 23-35.
28. **Lazzari, G., Landriscina, R., Duchi, R., Galli, C.** (1995). *Sex shift in calves derived from IVM-IVF embryos cultured in the sheep oviduct versus calves produced by conventional superovulation and embryo transfer*. *Theriogenology*, **43**: 263.
29. **Leibo, S.P., Rall, W.F.** (1990). *Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis*. *Theriogenology*, **32**: 531-551.
30. **McEvoy, J.D.** (1992). *Alteration of the sex ratio*. *Animal Breeding Abstracts*, **60**: 97-111.
31. **McLaren, A.** (1972). *The Embryo*. 1-42. In: *Reproduction in Mammals*. Book 2: Embryonic and Fetal Development. Ed.: Austin, C.R., Short, R.V., 1<sup>st</sup> edition, Cambridge University Press, Cambridge.

32. **Miller, J.R.** (1991). *Embryo sexing: A broad survey*. *Reprod Dom Anim*, **26**: 54-57.
33. **Miller, J.R.** (1991). *Isolation of Y-chromosome specific sequences and their use in embryo sexing*. *Reprod Dom Anim*, **26**: 58-65.
34. **Miller, G.F., Gliedt, D.W., Rakes, J.M., Rovi, R.W.** (1994). *Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or combination to bovine in vitro fertilization medium increases to subsequent embryo cleavage rate*. *Theriogenology*, **41**: 689-696.
35. **Monk, M., Handyside, H.** (1988). *Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere*. *J Reprod Fertil*, **82**: 365-368.
36. **Monk, M., Harper, M.I.** (1978). *X chromosome activity in preimplantation embryos from XX and XO mothers*. *J Embryol Exp Morph*, **46**: 53-64.
37. **Pabuççuoğlu, S.** (1991). *Taşıyan embriyolarının kazanılması ve kültüre edilmelerinden sonra transferleri üzerinde araştırmalar*. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
38. **Peippo, J., Bredbacka, P.** (1995). *Sex-related growth rate differences in mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro*. *Mol Reprod Dev*, **40**: 56-61.
39. **Rottmann, O.J., Lampeter, W.W.** (1981). *Development of early mouse and rabbit embryos without zona pellucida*. *J Reprod Fertil*, **61**: 303-306.
40. **Thibier, M., Nibart, M.** (1995). *The sexing of bovine embryos in the field*. *Theriogenology*, **43**: 71-80.
41. **Tsunoda, Y., Tokunaga, T., Sugie, T.** (1985). *Altered sex ratio of leave young after transfer of fast and slow developing mouse embryos*. *Gamete Res*, **12**: 301-304.
42. **Van Soon, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A.R., Deluyber, H., Dekruif, A.** (1992). *Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage*. *Theriogenology*, **38**: 905-920.
43. **Van Vliet, R.A., Verrinder Gibbins, A.M., Walton, J.S.** (1989). *Livestock embryo sexing: A review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes*. *Theriogenology*, **32**: 421-438.
44. **Vanderboom, R.J., McCauley, T.C., Tappan, R., Ax, R.L.** (1997). *Bovine reproductive biotechnology*. 457-473. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 1<sup>st</sup> edition, Ed: Youngquist, R.S., W.B. Saunders Company, Philadelphia.
45. **Williams, T.J.** (1986). *A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose-6-phosphatase dehydrogenase*. *Theriogenology*, **25**: 733-739.
46. **Windsor, D.P., Evans, G., White, I.G.** (1993). *Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: A review*. *Reprod Fertil Dev*, **5**: 155-171.
47. **Xu, K.P., Yadav, B.R., King, W.A., Betteridge, K.J.** (1992). *Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro*. *Mol Reprod Dev*, **31**: 249-252.
48. **Yadav, B.R., King, W.A., Betteridge, K.J.** (1993). *Relationship between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and development rates of bovine embryos generated in vitro*. *Mol Reprod Dev*, **36**: 434-439.

#### Yazışma Adresi:

Dr. Murat Findik  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı  
06110 - Ankara/Türkiye  
Tel: +90 (312) 317 03 15 / 270  
Fax: +90 (312) 317 83 81  
E-mail: findik@veterinary.ankara.edu.tr