

# SİĞİRLARDA EMBRİYO TRANSFERİ

Naci TÜZEMEN (1)  
M. İhsan SOYSAL (2)

Uzun yıllardan beri suni tohumlama ile sığırların ıslahında önemli mesafeler alınmıştır. Aynı şekilde embriyo transferi ile sığırların ıslahı dahada hızlandırılabilir. Embriyo transferi, döllenmiş ve gelişmekteki yumurtaların verici hayvanlardan alınıp, alıcı veya taşıyıcılara aktarılması olarak tarif edilebilir (Şekil : 1).

Cinsi olgunluğa ulaşan hayvanların yumurtalıklarında çok sayıda oocyt bulunmaktadır. Ancak ve hayvanların ömürlerinin kısa olması ve yılda bir doğum yapabilmeleri nedeniyle bu oocyt'lerin çok azı kullanılabilir. Embriyo naklinin amacı, yüksek verimli ineklerden süperovulasyonla bir defada bir çok yumurtanın fonksiyonel hale getirilmesi, böylece yüksek verimli bir anadan çok sayıda döllenmiş yumurta alınıp, bunların alıcı hayvanlara nakli ile büyümelerinin sağlanmasıdır.

## VERİCİLERİN SEÇİMİ ve SÜPEROVULASYON

Embriyo transferi için verici seçiminde genetik üstünlüğü olan hayvanlar seçilir. Ayrıca üreme kabiliyeti, döllerinin pazar değeri, hayvanın sağlık ve kondisyon durumu dikkate alınır. Verici hayvanlara yapılacak olan süperovulasyonda; ineğin yaşı, süt verimi, doğumdan sonraki günler ve gelecek estrüs etkili olmaktadır. Bunlara ilaveten, seçilecek vericilerde süperovulasyonla muameleden önce ard arda gelen en az iki kızgınlık siklüsü takip edilmelidir. Şayet herhangi bir düzensizlik gözlenirse, örneğin; kızgınlığı sakın

geçen hayvanlar verici olarak kullanılmalıdır. Verici adayların ovulasyonu kontrol edilmelidir. İyi sonuç almak için güvenilir ve dikkatli; yemleme ve idare sistemleri uygulanmalıdır.

Seçilen vericiye süperovulasyon için 1500-3000 I.U. gebe kısırak serum gonadotropini (PMSG) bir defada uygulanır. Ayrıca son yıllarda çok daha iyi sonuç veren folikül gelişiren hormon FSH'nin kullanılması yaygınlaşmıştır. Süperovulasyon için FSH muamelesi, estrüs siklüsünün 9-14 ncü günleri arasında başlatılmalıdır (Estrüs = 0). FSH kas içerisine 4 gün üst üste günde iki defa olmak üzere azaltılarak sırasıyla şu miktarlarda enjekte edilir : 5-5, 4-4, 3-3 ve 2-2 mg. Bu enjeksiyonun başlangıcından 48 saat sonra her hayvanın kas içerisine prostoglandin (PGF<sub>2</sub>) şu şekilde verilmelidir : Saat 8'de 20 mg, 12'de 10 mg ve saat 17'de 10 mg tatbik edilir. Yukarıda belirtilen metod yalnızca et sığırları için uygulanır. Süt sığırları ile çalışıldığı zaman süperovulasyon muamelesi için takip edilen yol ise : 7-7, 6-6, 5-5, 4-4 ve 3-3 mg FSH uygulanır. FSH enjeksiyonunun başlangıcından 72 saat sonra kas içerisine PGF<sub>2</sub> şu dozlarda enjekte edilir. Sabah saat 8'de 20 mg, 12'de 10 mg ve 17'de 10 mg tatbik edilir (Betteridge, 1977; Sevinç 1984; Şimohıra 1984).

Süperovulasyonla muamele sırasında hayvanlarda stress minimum seviyede tutulmalıdır. Onun için bu peryotta yemleme sistemleri ve idare metodlarının değiştirilmemesi ve çok dikkatli hareket edil-

- (1) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Öğretim Üyesi (Yrd. Doç. Dr.) Erzurum.
- (2) Trakya Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Öğretim Üyesi (Yrd. Doç. Dr.) Tekirdağ.

mesi gerekir. Hormonal muamele esnasında sonuçlar yeterince iyi olmazsa, toplam dozlar gelecek muamelede artırılmalıdır. Artırma her bir FSH enjeksiyonu için 1 mg olmalıdır (Tablo I).

#### **VERİCİLERDE SUNİ TOHURLAMA ve EMBRİYONUN GERİ ALINMASI**

Sığırlarda en iyi sonuç doğal aşım ile elde edilmektedir. Ancak dondurulmuş sperma ile de oldukça iyi neticeler alınmaktadır. Verici hayvanlar, PG enjeksiyonunun başlangıcından iki gün sonra dondurulmuş olarak muhafaza edilen spermalar ile suni tohumlama yapılarak döllenirler. Suni tohumlama esnasında önemli bir nokta hastalık bulaşmasının önlenmesidir.

Süt sığırlarında tohumlama 3 defa sırasıyla şu saatlerde yapılır; sabah : 8, Akşam : 17 ve ertesi gün Sabah : 8. Et sığırlarında ise iki defa olmak üzere öğlenden sonra 14 ve ertesi gün sabah 8'de yapılır. Vericilere suni tohumlama estrüs esnasında yapılmakta olup, şayet estrüs belirtileri açık değilse tarif edilen program uygulaması durdurulur. Kızgınlığın kontrolü, kızgınlık dedektörü ile daha sağlıklı belirlenebilmektedir.

Kızgınlıktan 7-8 gün sonra (estrüs=0) embriyolar vericilerden geri alınır. Bunun için verici hayvanların ön kısmı yukarıda olacak bir şekilde uygun bir düzende tutulurlar. Kuyruk bağlanarak rektum'daki dışkı boşaltılmalıdır. Daha sonra verici hayvanlara % 2'lik lidocain 7 ml olarak epidural anestezi yapılır. Epidural anestezi son sağrı omuru ile ilk kuyruk omurları arasına yapılır. Epidural blokaj'dan dolayı rektum hava ile şişerse, bu vakum pompası ile boşaltılır. Vulva ve vajina bir defa kullanılarak atılabilen kağıt havlular ile iyice temizlenmeli ve % 70'lik alkol ile dezenfekte edilmelidir. Daha sonra iki kanallı balon kateter suni tohumlamada olduğu gibi rektal palpasyon ile cervix içinden uterus gövdesine kadar sokulur. Öncelikle süperovulasyon

nun daha çok olduğu uterus boynuzuna doğru kateter sokulmalıdır. Kateter uterus boynuzlarının ayrıldığı çatal kısımdan 5 cm kadar ileriye yerleştirilir. Bu işlem sırasında uterusun yaralanmamasına dikkat edilmelidir. Dolayısıyla kateter düz bir pozisyonda tutulmalıdır. Balon kateter 15-24 ml hava ile şişirilir. Bunun için önce 10 ml hava ile başlanır ve teknisyen balonda rahat bir genişleme hissettiği sürece hava vermeye devam eder. Döveler için 15-18 ml hava, ergin hayvanlar için ise 18-22 ml kadar hava kullanılır. Sonuç olarak verilecek havanın hacmi uterus boynuzlarının büyüklüğüne bağlıdır (Şekil : 2).

Balon yeterince şişirildikten sonra embriyoların geri alınması için uterus boynuzları, Tablo 2'de kompozisyonu verilen Dulbecco'nun Fosfat Buffer Salina (PBS) sıvısına glikoz, sığır serum albumini, sodyum purivat, penisilin, streptomisin ve sığır serum ilavesi ile elde edilen M-PBS sıvısı ile yıkanır. Bunun için takriben 500 ml sıvı cam şişeye konarak, sıcak su içerisinde 37°C'ye kadar ısıtılır. Şekil 3'de görüldüğü gibi yıkama sıvısı dolu olan şişe vericinin vulvasından 1 metre yukarıda tutulur. Daha sonra giriş tüpü katetere bağlanarak sıvı içeri verilir. Birinci yıkama sırasında yalnızca 25-30 ml sıvı, daha sonrakilerde ise 50 ml'ye kadar artırılarak, uterus boynuzları sıvı ile yıkanırken ilk iki yıkamada boynuzlara masaj yapılır. Yıkama işlemi uterus boynuzlarına her sıvı verilisinden sonra teknisyenin uterus boynuzlarının birleştiği yerden hafifçe boynuzu tutarak yukarıya kaldırıp verilen sıvının geri alınması sağlanır. Teknisyen her yıkama işleminden sonra maksimum sıvının geri alınabilmesi için uterus boynuzlarını hünere bir şekilde kullanması gerekir. Yıkama işlemi 5-7 defa tekrar edilir. Bu işlem esnasında yıkama sıvısı aşağıda bulunan 500 ml'lik silindirde toplanır. Aynı işlemler diğer uterus boynuzu içinde tekrarlanır (Shimohira, 1984).

**Tablo : 2 — Embriyonun Geri Alınması ve Depolanması İçin Kullanılan M-PBS'nin Kompozisyonu**

Unsurlar	g/l
NaCl	8.00
KCL	0.20
PBS (+)	PBS (—)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.10
	Metal Tuzlar
CaCl <sub>2</sub>	0.10
Na Purivat	0.036
Glukoz	1.00
Modifiye	
Sığır Serum Albumini	3.00-4.00
Unsurlar	
Penisilin	100.000 I.U
Streptomisin	100 Mg
Sığır Serumu	% 20

Yıkama işleminden sonra silindir kab'da toplanan sıvı en az 30 dk bekletilerek toplanan embriyoların dip kısma çökmesi sağlanır. Daha sonra alt 100 ml'lik kısım kalacak şekilde üst kısmın sıvısı tedrici olarak dışarıya alınır. Geride kalan yıkama sıvısı 3-4 büyük petri kutusuna aktarılır. Bu esnada silindir kabın kenarlarında embriyo kalmayacak şekilde kenarları yıkayıp temizlenmelidir. Her bir petri kutusundaki embriyolar, iki veya daha fazla teknisyen tarafından stereo mikroskop altında tamamen muayene edilir.

Muayene edilen petri kutularında embriyo görüldüğünde, önceden hazırlanmış taze sıvı ortamdan az bir miktar pastör pipeti ile emilerek bu embriyonun etrafına dökülür. Bu arada kırmızı kan hücreleri gibi çeşitli partiküller dışarı çıkarılır. Hazırlanmış taze sıvı ortam (M-PBS + % 20 ısıtılmış sığır serumu) küçük bir petri kutusuna konular ve diğer tarafta bulunan embriyolar emilerek buraya aktarılır. Böylece embriyolar dondurulmaya sevk edilmeden önce 5 saat kadar oda sıcaklığında tutulur ve embriyolar sınıflandırılarak değerlendirilir.

#### EMBRİYOLARIN SİNFLANDIRILMASI

Embriyoların değerlerinin tayin edilmesi iyi embriyo transfer işleminin başarısını etkileyen önemli bir noktadır. Bütün embriyolar, 100 veya 200'e kadar büyüten mikroskopta incelenerek hücrelerin gelişme devresi ve kaliteleri tek tek tayin edilir.

**a — Hücrelerin Gelişme Safhaları :** Verici hayvanlardan toplanan embriyolar farklı safhalarda olmaktadır. Herbir devrede tipik morfolojik görünüş şekil 4'deki gibidir.

**b — Kalite :** Embriyoların kalitesi; şekil, renk, sayı, hücrelerin yoğunluğu, suyu çıkmış ihraç edilenlerin ve dejenere olmuş hücrelerin miktarı gibi parametreler tarafından tayin edilir. Embriyo kalitesinde bu kriterler dikkate alınarak şöyle bir sınıflama yapılır (Shimohira, 1984).

**A — Çok İyi :** Embriyonun her bir devresinde tam morfolojik gelişmeye sahiptir.

**B — İyi :** Embriyolarda önemsiz eksiklikler vardır. İhraç edilmiş birkaç blastomer ve düzensiz şekilli bir kaç kabarcık görülebilir.

**C — Orta :** Embriyoda önemli problemler olmamakla beraber, ihraç edilmiş blastomerlerin varlığı, kabarcıklar ve bir miktar dejenere olmuş hücre görülür.

**D — Zayıf :** Embriyoda şiddetli problemler vardır. İhraç edilmiş bir çok blastomer, dejenere hücreler, fazla miktarda kabarcıklar ve farklı hacimlerde hücreler görülür. Fakat embriyo canlı görünmektedir.

**E — Transferde Kullanılmayan Embriyo :** Hücrelerinin hepsi dejenere olmuş ve döllelenmemiş embriyolardır.

Embriyoların kalite sınıflaması çok subjektiftir. Ancak sınıflamada birinin diğerinden farklılığı bilinmelidir. Embriyolar sınıflanırken mevcut büyük farklılıklar gibi küçük farklılıklar ve benzerlikler ortaya çıkarılmamalıdır.

#### ALICILARIN SEÇİMİ VE VERİCİLERLE SİNKRONİZASYONU

Başarılı bir embriyo transferi yapabilmek için alıcı ve vericiler arasında en fazla  $\pm 24$  saatlik bir farkla kızgınlıklar sinkronize edilmelidir. Bu durum tabi olarak sağlanabildiği gibi progesteron hormonları enjeksiyonları, prostoglandin

(PG) veya analoglarının enjeksiyonu ile sağlanır (Betteridge, 1977; Shimohura, 1984; Kılıçoğlu ve Alaçam, 1985).

Şayet alıcı PG ile sinkronize edilecekse kızgınlığın başlangıcını takip eden 5-15 nci günler arasında kas içerisine 15 mg PG enjekte edilir. Böylece 3 veya 4 gün sonra hayvanlarda kızgınlık görülür. Bu alıcılarda kızgınlık başlaması görüldüğünde foliküller kontrol edilir, ertesi gün aksam yumurtalama durumları kontrol edilmelidir. Alıcıya embriyo transferi yapılmadan bir gün önce (6. gün) Carpus Luteum'un (CL) şekli kontrol edilir. Alıcı adayı yumurtalamamışsa veya ovulasyon gecikme gösteriyorsa o hayvan alıcı olarak kullanılmamalıdır. Keza embriyo transferinden önceki gün CL'un morfolojisi uygun bir durumla değilse bu hayvanlarda saf dışı bırakılmalıdır (Kılıçoğlu ve ark., 1984; Shimohura, 1984).

#### EMBRİYONUN TRANSFERİ

Sığırlarda embriyo transferi ameliyatsız veya ameliyatsız olarak gerçekleştirilebilmektedir. Ameliyatsız embriyo transferi için vericilerden alınan embriyolar sınıflandırılma işleminden sonra Tablo 3'de kompozisyonu verilen solüsyonlarda depolanırlar. Antibiyotik içeren bu solüsyonlar Filtreden geçirilerek sterilize edilmelidir.

Tablo 3 — Çeşitli Solüsyonlar ve Gerekli Miktarlar

Solüsyon	A	B	C	Isıtılmış Serum
% 6,7 gliserol	3 ml	3 ml	—	—
% 3,3 gliserol	6 ml	6 ml	—	—
0,3 M Sükroz	—	—	4 ml	1 ml

**Solüsyon A :** % 20 BS + M — PBS

40 ml M-PBS ve 10 ml ısıtılmış sığır serumundan (BS) oluşturulur.

**Solüsyon B :** % 10 gliserol solüsyonu

18 ml A solüsyonundan 2 ml gliserolden oluşturulur.

**Solüsyon C :** Sükroz Solüsyonu

10,3 gr sükroz ve 80 ml oluncaya kadar solüsyon ilave edilir.

Solüsyonlardaki embriyolar plastik pipete yerleştirilmeden önce şu işlemlerden geçirilmelidir (Shimohira, 1984).

1 — M-PBS + % 20 BS (Sığır Serum) solüsyonunda embriyolar yıkanır.

2 — % 3,3'lük gliserol solüsyonundan 5 ml petri kutularına konularak embriyolar burada 10 dk. tutulur.

3 — % 6,7'lük gliserol solüsyonundan 5 ml diğer petri kutularına konularak, % 3,3'lük gliserol solüsyonunda bulunan embriyolar bir pipet ile % 6,7'lik gliserol solüsyonuna aktarılır ve burada 10 dk. bekletilir.

4 — Bu petri kutularındaki embriyolar % 10'lük gliserol solüsyonu (5 ml) bulunan petri kutularına aktarılıp 20-30 dk. bekletilir.

Daha sonra petri kutusundaki embriyo 0,25 ml'lik plastik pipete tüberkilin çirngası vasıtası ile aşağıdaki sırayla yerleştirilir (Şekil, 5).

a — 2 cm 0,3 M'lük Sükroz

b — 0,5 cm hava kabarcığı

c — 1 cm % 10'lük gliserol solüsyonu ve içerisinde embriyonun birlikte yerleştirilmesi.

d — 8 cm 0,3 M'lük sükroz

e — Pamuk tıkaç ıslanmaya kadar hava emilir.

f — Pipetin son kısmı ısı aracılığı ile mühürlenir.

Bu doldurma işleminden sonra embriyo kısa süre içinde transfer edilecekse hazırlanan pipet, plastik katetere yerleştirilerek Cassou tabancasına takılır. Bu arada embriyo transferi yapılacak ineğin (ahcının) önceden hazırlanmış düzenekte vulva, vagina ve anüs bölgesi temizlenip iyi bir şekilde dezenfekte edilir. Daha sonra epidural anestezi (3-4 ml) yapıp, kuyruk bağlanır. Suni tohumlamada olduğu gibi cervix'ten girilerek ineğin ipsiletoral (ovulasyonun yer aldığı yumur-

talık tarafına) uterus boynuzuna embriyo aktarılır (Bifurcation noktasından 5-10 cm öteye). Bütün bu işlemler steril şartlarda yapılmalıdır. Embriyo transferi daha sonra gerçekleştirilecekse, hazırlanan bu embriyolar dondurularak saklanabilirler. Dondurma işleminde şu sıra takip edilir.

1 — Oda sıcaklığındaki pipetler soğutma makinasına yerleştirilerek her dakikada  $-1^{\circ}\text{C}$  soğutularak,  $-7^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar düşürülür. Bu noktada 2 dk. beklenir.

2 — Sıvı nitrojende soğutulan pensler ile pipete yerleştirilmiş gliserol içindeki embriyolu kısımdan tutularak (embriyodan uzak noktadan) buz kristalleri teşkil oluncaya kadar pens ile soğutulur.

3 — Embriyolu pipetler tekrar soğutma makinasına konur ve 8 dk. orada tutulur. Daha sonra dakikada  $-0,3^{\circ}\text{C}$  düşürülerek  $-30^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulur. Bu noktada 10 dk. bekletilir.

4 — Sonra sıvı nitrojenle  $-196^{\circ}\text{C}$ 'ye hızla soğutularak böylece embriyolu pipetler sıvı nitrojen içerisinde tutulurlar.

Dondurulan embriyolar aşağıda sunulan çözülme yoluyla transfere hazır duruma getirilir.

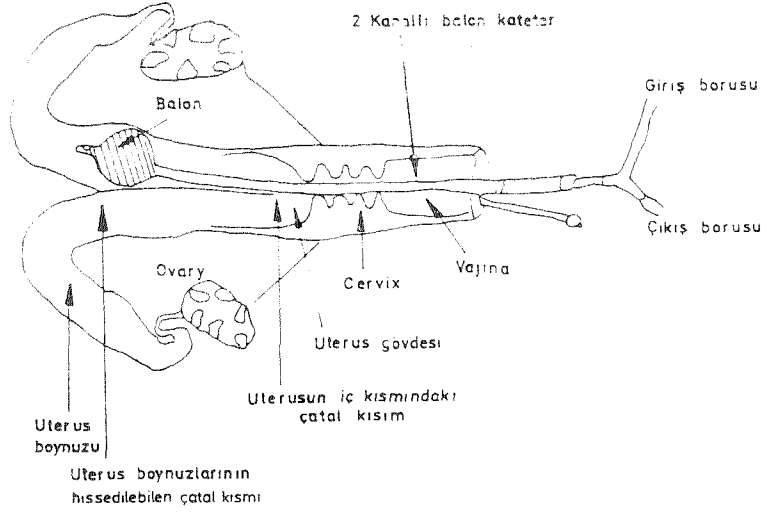
a — Embriyolu plastik pipetler sıvı nitrojenden çıkarılarak  $37^{\circ}\text{C}$  deki su banyosuna konulur. Burada 1 dk. bekletilir.

b — Embriyolu pipet dikey olarak tutulur ve nazikçe sallanarak gliserol ve sükroz bölmelerinin karışması sağlanır.

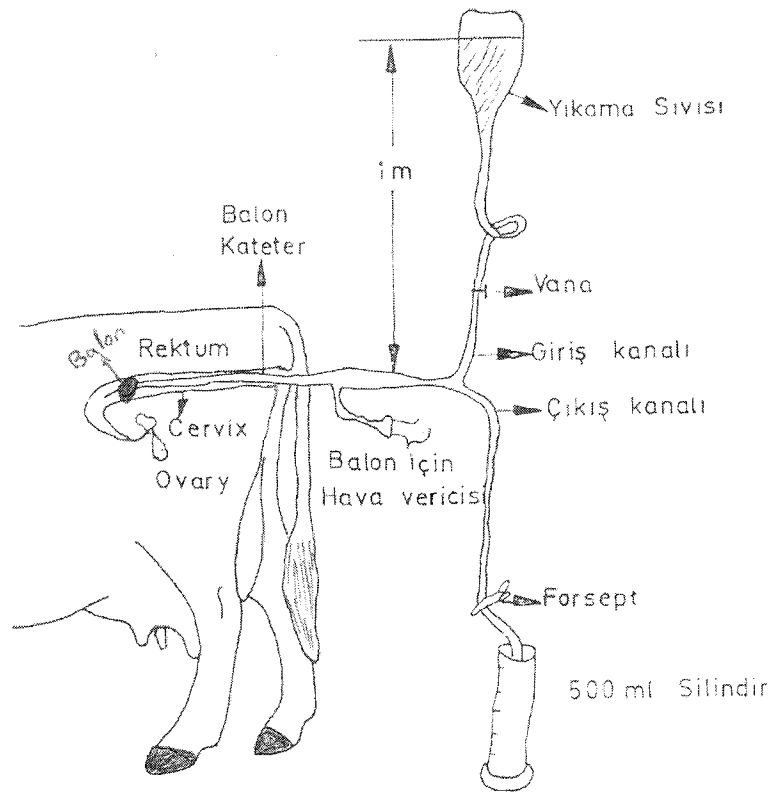
c — Daha sonra tekrar pipetler su banyosuna konulur ve 10 dk. dikey olarak burada tutulur. Sonra dışarı alınıp kurularak embriyo transferi yapmak üzere kullanılır (Shimohira, 1984).

**Netice Olarak;** Embriyo transfer tekniklerinin hem geliştirilmesi hem de yaygınlaştırılması ile kısa sürede arzu edilen genotipteki hayvanların büyük miktarlarda elde edilmesi sağlanacak ve bununla hayvancılığın geliştirilmesine büyük katkıları olacaktır.

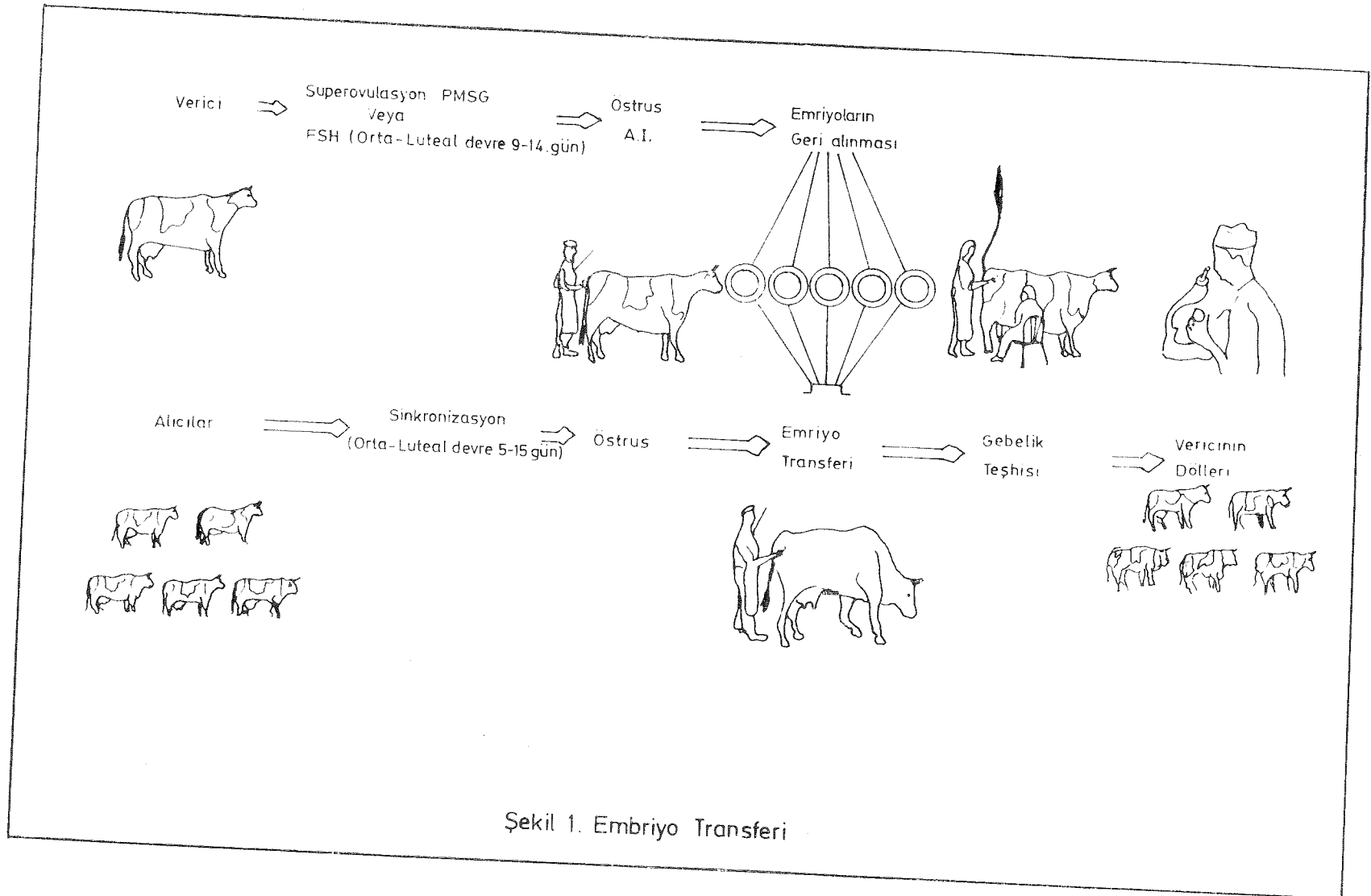




Sekil 2 Balonun Pozisyonu

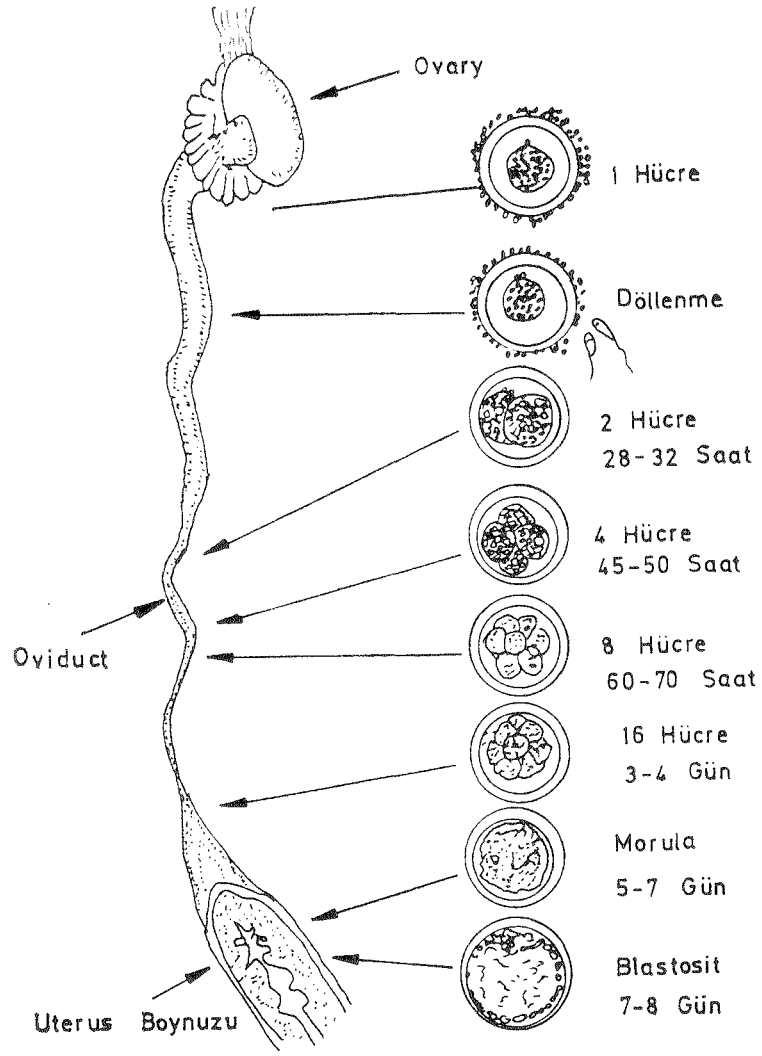


Şekil 3. Embriyonun Yıkanarak Toplanması

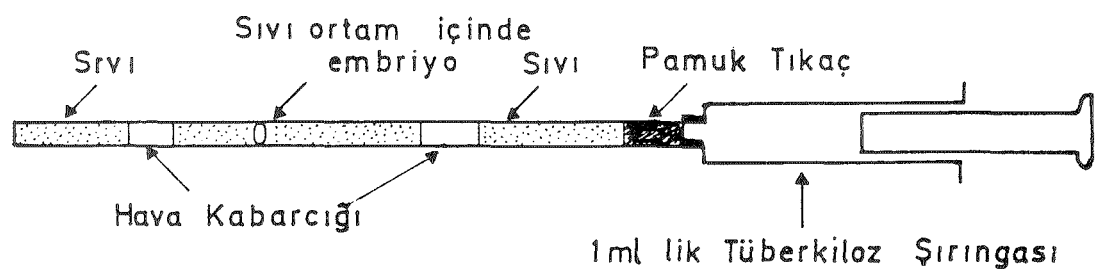


Şekil 1. Embriyo Transferi





Şekil 4. Embriyonun Devreleri



Şekil 5. Transfer için 0,25 ml'lik pipet içine embriyonun yerleştirilmesi

#### L İ T E R A T Ü R L İ S T E S İ

- Betteridge, K.J., 1977. Embryo Transfer in Farm Animals. A Review of Techniques and Applications. Canada Department of Agriculture, Canada.
- Kılıçoğlu, Ç., E. Alaçam, H. Özgür, T. Tekel. 1984. Koyunlarda Embriyo Nakli Üzerinde Çalışmalar. Dođa Bilim Dergisi. Veteriner ve Hayvancılık. TUBİTAK. Cilt : 8, Sayı : 3.
- Kılıçoğlu, Ç., E. Alaçam. 1985. Veteriner Doğum Bilgisi ve Üreme Organlarının Hastalıkları. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yay. 403. Ders Kitabı.
- Sevinç, A., 1984. Dölerme ve Suni Tohumlama. Ankara Üniversitesi Veteriner Fak. Yay. 397. Ders Kitabı.
- Shimohira, I., 1984. Manual of Bovine Embryo Transfer Procedure. Fukushima National Breeding Station Embryo Transfer Section, Japan.