

EMBRYO NAKLİ AMACIYLA SÜPEROVULASYON OLUŞTURULAN İNEKLERDEN ELDE EDİLEN EMBRİOLARIN GELİŞME EVRELERİ VE DEĞERLENDİRİLMELERİ (Derleme)

İ. Kamuran İLERİ¹

Serhat PABUÇCUOĞLU¹

Über den Entwicklungsstand und Beurteilung von Rinderembryonen gewonnen nach superovulationsbehandlung.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Entwicklungsstand von Rinderembryonen, die nach der Superovulation gewonnen werden, ist vom Brunst- und Ovulationszeitpunkt abhängig. Es muss davon ausgegangen werden, dass am Tag des Brunsteintritts (Do) bereits Ovulationen erfolgen. Daher müssen die Besamungen bereits während der Brunst der Spender durchgeführt werden, um die Befruchtung der Eizellen zu gewährleisten.

Zur Erzielung optimaler Transferergebnisse hat sich die Gewinnung von Morulae und beginnenden Blastozysten an D7 1/2 bewährt. Für die Beurteilung von Rinderembryonen eignen sich morphologische Kriterien. Für den Transfer sollten nur Embryonen verwendet werden, die einen ihrem Alter entsprechenden Entwicklungsstand erreicht haben. Die schematischen Darstellungen zur Morphologie von Rinderembryonen sollen zur besseren Beurteilung bieten.

SCHLÜSSEL WÖRTER : Embryotransfer, Superovulation, Rind.

ÖZET

Süperovulasyon tedavisi yapılan ineklerden elde edilen embrioların gelişme dönemleri, ineklerin östrus ve ovulasyon zamanına bağlıdır. Bu nedenle de, östrusun başladığı gün (Do) ovulasyonların gerçekleştiği düşünülmesi ve vericiler, ovumların fertilizasyonu için östruslarının başlangıcında tohumlanmalıdır.

Optimal gebelik sonuçları sağlayabilmek için ise, 7 ila 7.5 günlük morula ve blastosist gelişim devresindeki embrioların transferleri uygun görülmektedir.

Sığır embriolarının kalitelerini değerlendirebilmek için morfolojik kriterlerden faydalanılmakta ve elde edildiği günkü gelişme dönemine uygun embriolar transfer için kullanılmaktadır.

Bu derlemede sunulan embrioların şematize görüntüleri, sığır embriolarının değerlendirilmesine ve embrio transfer çalışmalarına yardımcı olacağı düşünülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER : Embriyo nakli, Süperovulasyon, Sığır.

GİRİŞ

Hayvan ıslahında kullanılan biyoteknolojik yöntemler arasında, sun'i tohumlama çalışmaları başta gelmekte ve bilindiği gibi bu uygulama yıllardan beri pek çok ülkede başarı ile yürütülmektedir.

Bu çalışmaların yanında, diğer bir biyoteknolojik yöntem olan embrio transfer uygulamalarında, yaşamları sınırlı olan yüksek verimli ineklerden yılda bir yavru yerine 15-20 yavru elde ederek, ıslah çalışmalarının daha da hızlandırılması amaçlanmaktadır.

Embrio transfer uygulamalarında çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Bunlardan birisi de uygulayıcıların, embrioların transfer edilebilirliği konusunda, embrio morfolojileri üzerinde verdikleri subjektif kararlardır.

Bu derleme, çalışanların embriolar üzerinde daha sağlıklı karar vermelerine yardımcı olabilmek amacıyla hazırlanmıştır.

Sığır Embriolarının Gelişim Evreleri ve Değerlendirilmeleri

Sığırlarda yürütülen embrio transfer çalışmaları bilindiği gibi süperovulasyon, östrus senkronizasyonu, uterus yıkaması, embrioların elde edilmesi, değerlendirilmeleri ve alıcılara trans-

ferlerinden oluşmaktadır. Bu aşamalardan her biri, başarı zincirinin halkalarını oluşturmakta ve elde edilecek sonuçları etkilemektedir. Yıkama sıvısı içerisinde aranıp bulunan embrioların transfer edilebilirliği konusundaki değerlendirmeler, transfer çalışmalarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu nedenle açıklamalar iki ana başlık altında ele alınmıştır.

1-Sığır embriolarının gelişme evreleri

Eksojen hormon enjeksiyonlarıyla süperovulasyon oluşturulan ineklerde, ovulasyonların ne zaman meydana geldiği üzerine yapılan çalışmaların yetersiz olduğu dikkati çekmektedir.

Embrio transfer çalışmaları içerisinde, östrusun başladığı gün enternasyonal olarak Day 0=D₀ olarak tanımlanmakta, onu takip eden günlerde D₇ ye kadar belirlenmektedir (3,4,5,11).

Süperovulasyon tedavisi uygulanan ineklerde ovulasyonlar, hayvandan hayvana göre değişen farklı sürelerde meydana gelmektedir. Bir inekten elde edilen embrioların gelişme aşamalarının aynı yada birbirine yakın olması ovulasyonların kısa bir sürede tamamlandığını, embriolar arasındaki gelişme aşamalarının farklı olmasının ise ovulasyonların daha uzun bir süreye yayıldığını ortaya koymaktadır (7).

Moncada (9), süperovulasyon tedavisi uyguladığı inekler üzerinde yaptığı endoskopik araştırmalarda kullandığı hay-

(1) İ. Ü. Veteriner Fak. Doğum ve Reprod. Hast. Anabilim Dalı/Reprod. ve Sun'i Toh. Bilim Dalı. 34851 Avcılar/Istanbul.

vanların çoğunda, ovulasyon süresinin 24 saati aşmadığını, az sayıdaki ineklerde ise bu sürenin 70 saate kadar devam ettiğini, ilk ovulasyonun PGF₂-α enjeksiyonundan 66.7 saat sonra olduğunu ve bu hayvanlarda ovulasyonların, dış östrus semptomları sona ermeden meydana geldiğini belirtmektedir.

Özellikle östrusları uzun süren (36 saatten fazla) veya geç başlayan (PGF₂-α verilisinden 72 saat sonra) ve östrusun sonunda tohumlanan, süperovulasyon tedavisi uygulanan verici ineklerde, döllenmemiş ovum ve dejenere embrio oranı oldukça artış göstermektedir ve östrusları uzun süren veya geç başlayan hayvanların ovariumlarında genellikle patlamamış follikül veya kistlere de rastlanılmaktadır (8).

Bazı araştırmacılara göre (6,12), bu tip ovarium tablosu gösteren hayvanlarda, luteinizasyonun başlamasına ve progesteron değerlerinin hızla yükselmesine bağlı olarak normal ovulasyon faaliyetleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Ayrıca östrojen-progesteron oranındaki bu değişiklik, ovumun döl lenmesi ve embrioların erken gelişimi için optimal olan oviduct ve uterus ortamını da etkilemektedir (8,9).

Bu görüş ortaya koymaktadır; eğer süperovulasyon tedavisi yapılan ineklerden uterusun yıkanması sonucu kalite ve kantite açısından optimal düzeyde transfer edilebilir embrio elde edilmesi isteniyorsa, tohumlamalar ilk östrus semptomları ile birlikte gerçekleştirilmeli ve yaklaşık 12 saat sonra, mutlaka tekrar edilmelidir. Östrus belirtilerinin süresinin 24 saati aştığı hallerde ise, daha fazla sayıda transfer edilebilir embrio elde etmek için üçüncü bir tohumlama önerilmektedir. Çünkü bazı hayvanlarda östrus belirtileri, 70 saate kadar devam etmektedir (2,9).

Embriolar, oviduct içerisinde normal olarak dört gün kalmakta, bu süre içerisinde 8 blastomerli gelişme aşamasına ulaşmakta ve artan progesteron değerlerine bağlı olarak uterus kendisini embrioların gelişine hazırlamaktadır. Daha erken gelişme dönemindeki embriolar uterusla ulaştıkları takdirde embriyal gelişiminin durduğu ve embrioların dejenere oldukları kabul edilmektedir (8).

Zigotların veya erken gelişim dönemindeki embrioların, oviduct'ta yer değiştirmesi üzerine endogen şartların etkilerinin yok denecek kadar az olduğu buna karşılık eksojen etkenlerin rolünün daha fazla olduğu, kabul edilmekte, bu nedenle de tohumlamadan sonraki ilk 4-5 gün içerisinde stres, hormon tedavileri gibi uygulamalardan kaçınılması tavsiye edilmektedir. Sekiz blastomerli (D₄) gelişim dönemindeki embrioların elde edilmesi, ancak cerrahi yöntem ile mümkün olabilmekte ve bu yöntem çeşitli komplikasyonlardan dolayı (genel narkoz, operasyon riski vs.), yalnız deneysel amaçlar için tercih edilmektedir. ineklerde cerrahi olmayan yöntemle uterus embrioların elde edilmesi, 5. günden önce (D₅) mümkün olmamakta ve bu süre içerisinde, embriolar 16 blastomerli gelişme aşamasında (erken morula) bulunmaktadır. Ovulasyon ve uterus yıkaması zamanına bağlı olarak, bazende 16 hücreli aşamadaki embrioların yanında 8 hücreli embriolara da rastlanılmaktadır. Altıncı günde uygulanan (D₆) uterus yıkamalarında ise morula olarak adlandırılan ve genelde 32 hücreli devredeki embriolar elde edilmekte ve embriolar içerisindeki blastomerler açısından sayısal değişikliklere, bu aşamada da rastlanılabilmektedir. Altıncı güne kadar elde edilen embrioların içerisindeki blastomerler, birbirleri ile gevşek bir şekilde bağlanmakta ve çeşitli manipülasyonlar sırasında birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilirlerdir (8).

Yedinci günlerde (D₇) elde edilen ve kompakt morula olarak adlandırılan, 64 blastomerli dönemdeki embriolarda blastomerlerin bağlantısı oldukça sıkıdır ve yaralamadan birbirlerinden ayrılmaları mümkün olamamaktadır. Bu gelişim dönemini izleyen birkaç saat içerisinde kompakt morula, blastosist evresinin başlangıç dönemi olan ve kendisini hücre topluluğu içerisinde, blastosel oluşumuyla belli eden erken blastosiste dönüşmektedir.

Uterustan 7.5 günde elde edilen embrioların çoğu erken blastosist döneminde dirler ve yine hayvandan hayvana değişen, farklı östrus ve ovulasyon zamanına bağlı olarak bu günde de değişik görünüm ve aşamadaki embriolara rastlanılabilmektedir.

Uterustan 7 ila 7.5 günlerde elde edilen embrioların özel bir anlamı bulunmaktadır. Çünkü bu dönemde elde edilen kompakt morula ve erken blastosist aşamasındaki embriolar ile yapılan transfer çalışmalarından, en iyi gebelik sonuçlarının alındığı bir çok araştırmacı tarafından belirtilmektedir (4,14).

Ayalon (1), embrioların morula evresinden blastosist evresine geçişlerinin, onların gelişmelerinde oldukça kritik bir aşama olduğunu, erken embriyonik ölümlerin bu dönemde meydana geldiğini ve benzeri olayların olmaması için embrioların optimal bir uterus ortamına ihtiyaç duyduğunu belirtmektedir. Morula ve erken blastosist evresindeki embrioların, uygun alıcılara transferi ile erken embriyonik ölümler nedeniyle oluşacak kayıplar önlenilmekte ve ayrıca ineklere kıyasla düvelerin alıcı olarak kullanılması durumunda daha başarılı gebelik sonuçları elde edilmektedir (8,14). Ayrıca 7-7.5 günlerde elde edilen bu embrioların, dış etkilere karşı (maniplasyon, ışık, farklı ısı vs.) daha dayanıklı oldukları ve özellikle erken blastosist dönemindeki embrioların, dondurma için daha ideal oldukları, çözdürüldükten sonra transfer edilmeleri sonucu yüksek gebelik oranları elde edildiği belirtilmektedir (8).

Sekiz ila 10. günler arası (D₈-D₁₀) elde edilen embriolarda, embriyonun zona pellucida'yı gergin olarak doldurduğu dikkati çekmekte ve bu gelişim devresi "expanded blastosist" olarak adlandırılmaktadır. Sonra zona pellucida açılmakta ve embrio dışarı çıkmaktadır. Dışarı çıkan bir siğir embriyosu, 2-3 mm uzunluğa ulaşmakta, çıplak gözle tanınabilmekte ve bu tip embriolarla yürütülen transfer çalışmalarından istenilen gebelik sonuçları alınmamaktadır.

2-Siğir embriolarının değerlendirilmesi.

Uterus yıkandıktan sonra, elde edilen yıkama sıvısı içerisindeki embrioların aranması ve bulunması oldukça kolaylaştırılmıştır. Bu amaçla yıkama sıvısının toplandığı cam şişe, 37 °C'deki etüv içerisinde 30 ila 45 dakikalık bir süre için sedimentasyona bırakılmakta, böylece embrioların dibe çökmesi sağlanmaktadır. Sonra yıkama sıvısının üst kısmı bir infüzyon hortumu yada silikonize edilmiş bir hortum ile başka bir kaba aktarılmakta ve dip kısımda 5-7 cm yüksekliğinde vasat bırakılmaktadır. Bu kısım saat camına veya küçük petri kutularına, ortalama 10-15 ml olarak dağıtıldıktan sonra 20-30 büyütme bir stereo-mikroskop altında yaygın bir ışık sistemi kullanılarak, embrioların aranması ve bulunması gerçekleştirilmekte ve bulunan embriolar, ortamdan derhal alınarak taze bir kültür vasatına aktarılmaktadır. Ortamda kan veya mukus'un bulunduğu durumlarda, enjektör iğnesi yardımıyla mukuslar birbirlerinden ayrılarak embrioların görülmesine olanak sağlanmaktadır.

Elde edilen embrioların morfolojik yapıları, transferleri sonrasında elde edilecek gebelik sonuçlarını önemli derecede



Şekil 1 : Normal morfolojik yapıdaki embriolar
Abbildung 1 : Embryonen in normalen morphologischen Formen

Şekil 2 : Anormal yapıdaki embriolar
Abbildung 2 : Embryonen in abnormalen morphologischen Formen

Numara	Tanımlama	Normal Olarak Östrüstan Sonra Bulunduğu Günler
1	1 Hücreli	0-2
2	2 Blastomerli	1-3
3	4 Blastomerli	2-3
4	8 Blastomerli	3-5
5	16 Blastomerli	4-5
6	Morula	5-7
7	Kompakt Morula	5-7
8	Erken Blastosist	7-8
9	Blastosist	7-9
10	Genişlemiş Blastosist (Expanded)	8-10
11	Hatching Blastosist	9-11

Numara	Tanımlama
12	Oval şekilde zonası bulunan kompakt morula
13	Parçalanmış blastomerli bir morula
14	Düzensiz blastomerler
15	Hasar görmüş bir morula
16	Dağınık blastomerler
17	Düzensiz hücre yığını
18	Vakuoller
19	Dejenere olmuş 1 hücre (zigot)
20	Dejenere olmuş 1 hücre (zigot)
21	Dejenere olmuş 1 hücre (zigot)
22	Dejenere olmuş 1 hücre (zigot)
23	Dejenere olmuş 1 hücre (zigot)
24	Çatlak boş zona