

Sığırlarda Embriyo Transfer Uygulaması ve Türkiye Açısından Önemi

Hakan SAĞIRKAYA*

Geliş Tarihi: 07.12.2009

Kabul Tarihi: 21.12.2009

Özet: Dünyanın gelişmiş ve gelişmekte olan birçok ülkesinde sığırlarda uygulama alanı bulan embriyo transfer uygulaması, maalesef ülkemizde henüz saha şartlarında uygulama alanı bulamamıştır. Yöntemin pahalı olması ve son yıllara kadar büyük kapasitede sütçü işletmelerin olmaması embriyo transfer uygulamasına olan talebin ortaya çıkmasına engel olmuştur. Ancak, son yıllarda büyük çaplı sütçü işletmelerin kurulması ve hayvancılığın daha rasyonel ve bilinçli yapılmaya başlanması ile embriyo transfer uygulamasına olan ilgi artmaktadır. Dolayısıyla bu derlemenin temel amacı özellikle sahada çalışan veteriner hekimlere embriyo transferi uygulamasına ilişkin temel bilgileri aktarmak ve Türkiye açısından embriyo transfer uygulamasının önemini vurgulamaktır.

Anahtar Kelimeler: Sığır, embriyo transferi, süperovulasyon.

Embryo transfer in cattle and the importance of embryo transfer for Turkey

Abstract: Unfortunately cattle embryo transfer application applied in many developed and developing countries of the world is not still applied in our country in the field conditions. Expensive cost of the method and lack of the high capacity dairy farms have prevented the demand for embryo transfer until recent years. However, the interest for embryo transfer has been increased because of the establishment of big dairy farms and application of cattle breeding rationally and consciously in recent years. Therefore, the aim of this review is to convey basic information about embryo transfer application especially to veterinarians working in the field and to highlight the importance of embryo transfer application for Turkey.

Key Words: Cattle, embryo transfer, superovulation.

Giriş

Embriyo transferi bir dişinin genital kanalından kazanılan embriyo ya da embriyoların bir ya da daha çok sayıda senkronize dişiye transfer edilmesi işlemidir. Bu amaçla sığırlardaki uygulamada embriyo vericisi inekte süperovulasyon protokolü uygulanarak çok sayıda embriyo elde edilmeye çalışılır ve tohumlamadan sonraki 7. günde kornu uteriler yıkanarak blastosist aşamasındaki embriyolar elde edilir. Daha sonra elde edilen embriyolar kalite açısından değerlendirilir. Elde edilen embriyolar direkt olarak önceden hazırlanmış senkronize taşıyıcılara transfer edilir

veya uygun bir yöntemle gelecekte kullanılmak üzere dondurulurlar^{6,18,19}. In vivo üretilen bu embriyoların dışında in vitro embriyo üretim yöntemi ile mezbahadan^{1,17} ya da OPU yöntemi ile canlı ineklerden elde edilen oositlerin in vitro maturasyonlarından sonra laboratuvar ortamında fertilize edilmesiyle üretilmiş embriyoların⁹ yanı sıra klonlama (nükleer transfer) yöntemi³ ile de üretilen embriyolarda transfer amacıyla kullanılabilir. Ancak, sahada ticari olarak uygulama alanı bulan embriyolar donör dişilerin genital kanallarından elde edilen embriyolardır. Bunun da pratikteki nedeni in vivo gelişen embriyoların dondurma işlemine karşı daha dayanıklı olması ve

* Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı 16059, Görükle, Bursa.

özellikle anne kayıtlarının sağlıklı olması yani doğacak yavrunun genetik potansiyelinin önceden biliniyor olmasıdır.

Embriyo Transferinin Tarihi

İlk embriyo transfer uygulaması 1890 yılında Walter Heape tarafından Angora tavşanlarında gerçekleştirilmiştir¹⁹. Dünyada embriyo transfer uygulaması sonucunda doğan ilk buzağı 1951 yılında rapor edilmiştir²⁰. Önceleri embriyo kazanımı cerrahi yöntemle yapılırken, yöntemdeki gelişmeler sonucunda cerrahi olmayan yöntemlerin ortaya konmasıyla ve elde edilen embriyoların dondurulmasındaki gelişmelerle embriyo transfer uygulaması birçok ülkede yaygın biçimde kullanılabilir hale gelmiştir. Ülkemizde ilk embriyo transfer uygulaması 1985 yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. İrfan Kamuran İleri tarafından gerçekleştirilmiştir. Sahada rutin olarak kullanımı ülkemizde çok sınırlı kalmış olan embriyo transfer uygulamaları ile ilgili Tarım Bakanlığı'nca başlatılan projelerle istenilen hedefe ulaşılamamıştır. Bu projeler ve bazı üniversite ve araştırma enstitüleri ile özel sektör tarafından gerçekleştirilen embriyo transferleri uygulamanın sahaya aktarılmasında şimdiye kadar yeterli olmamıştır.

Sığırlarda Embriyo Transfer Uygulamasının Avantajları

Embriyo transfer uygulamasının ana amacı üstün niteliklere sahip ineklerden elde edilecek yavru sayısını arttırmaktır. Böylece bir inekten yaşamı boyunca elde edilebilecek yavru sayısının en az 5 katı sayıda yavru elde edilebilir¹⁸.

Embriyo transfer uygulaması ile yaralanma, hastalık ve yaşlılık gibi çeşitli nedenlerden dolayı infertil olan üstün nitelikli ineklerden süperovulasyon ve embriyo transferi yoluyla başarı oranı fertil ve sağlıklı olanlara kıyasla 1/3 azalsa da yavru elde etmek mümkündür^{4,8}.

Sürüyü genetik açıdan üstün hale getirme, genetik varyasyonu artırma ve yeni ırkların yetiştirilmesine olan talep canlı hayvan ithalat ve ihracatının artmasına neden olmuştur. Genetik ilerlemede en hızlı yol damızlık değeri yüksek hayvanların direkt olarak sürüye katılmasıdır. Böylece üstün nitelikli hayvanlardan sağlanacak faydadan sürü içerisinde en kısa yoldan yararlanmak mümkün olmaktadır. Ancak, nakliye masraflarının yüksek olması ve nakilden sonra yeni çevre koşullarında sürü yönetimi, iklim ve endemik patojenlerdeki değişikliklerden dolayı artan ölüm oranları canlı hayvan ithalatını olum-

suz etkilemektedir. Canlı hayvan ithalatı ile embriyo transfer uygulaması karşılaştırıldığında, embriyo transfer uygulaması sonucunda bölgeye adapte olmuş taşıyıcı anneden pasif immunité yoluyla yavruda bölgeye uygun bağışıklık gelişmektedir. Ayrıca, hastalık transmisyonu da embriyo transfer uygulaması ile daha düşük risk oluşturmaktadır. Sperm ithalatında da embriyoya benzer bazı avantajlar bulunsa da, üstün genler doğacak yavrulara %50 oranında aktarılacağından embriyolardan yararlanma daha akılcı bulunmaktadır^{10,14,18}.

Dişi materyalden genetik ilerlemeyi hızlandırmak amacıyla, MOET (multiple ovulasyon ve embriyo transferi) uygulaması gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu uygulamada embriyo vericisi (donör) hayvanlar performans testine tabi tutularak seçilir ve bu seçimde büyüme oranı ve kabiliyeti ile süt üretimi ve güç doğum oranları dikkate alınmaktadır. Bu yöntemle, belirli bir işletme ya da bölgede mevcut bulunan üstün nitelikli inekler seçilerek donör olarak kullanılmakta ve elde edilen embriyolar, verim açısından nitelikli olmayan taşıyıcılara transfer edilmektedir. Böylece verimsiz ineklerden elde edilecek buzağular ilk generasyondan itibaren daha üstün nitelikli bir sürü oluşturma amacıyla kullanılabilir. Bu yöntemle boğaların değerlendirildiği projeleri test işlemi de daha kısa sürede tamamlanabilmektedir¹⁸.

Sıcak stresine maruz kalmayan ineklerde embriyo transferi ve suni tohumlama ile elde edilen gebelik oranları karşılaştırıldığında, embriyo transferi ile elde edilen gebelik oranının daha düşük olduğu bildirilmiştir^{2,7}. Ancak sıcak stresine maruz kalan sağmal ineklerde embriyo transferinden elde edilen gebelik oranlarının, tohumlamadan elde edilen gebelik oranlarından daha iyi olduğu ve sıcak stresin yaşandığı bölgelerde sıcak dönemlerde embriyo transfer uygulamasının fertilitéyi arttırmak için etkin bir uygulama olduğu bildirilmiştir¹¹.

Donör İneklerin Seçimi

Donör hayvanların seçiminde genel anlamda dikkate alınan iki önemli kriter bulunmaktadır: Birinci kriter genetik üstünlüktür ve embriyo transfer uygulamasıyla üstün olan genetik karakterler yavrulara aktarılır. İkinci kriter ise, donör hayvanın çok sayıda transfer edilebilir embriyo üretme kapasitesidir. Aslında en önemli unsur piyasa koşullarıdır ve embriyo transfer masraflarının üzerinde bir fiyata talep bulacak ya da sürü içinde ekonomik fayda sağlayacak emb-

riyoları üretmek esastır. Donörlerin seçiminde dikkate alınan genetik unsurların başında süt verimi, süt bileşimi, büyüme oranı, güç doğum ve hastalıklara direnç gibi unsurlar büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, transfer sonucunda doğacak buzağuların sağlıklarını olumsuz yönde etkileyebilecek bazı kalıtsal ve yetiştirme hastalıkları bakımından da sağlıklı olan donörlerin seçimi büyük önem taşımaktadır. Elde edilecek embriyo sayısı açısından da normal östrus siklusuna sahip ve yüksek fertilitate geçmişine sahip çok yaşlı olmayan ineklerin seçimi de büyük öneme sahiptir^{13,18}. Burada seçilecek boğa adaylarında da projeni test sonuçlarının incelenerek, genetik açıdan üstün nitelikleri bulunanların seçilmesinin büyük önem taşıdığını vurgulamak ayrıca gerekir.

Taşıyıcı İneklerin Seçimi

Taşıyıcı ineklerin seçiminde en önemli unsur taşıyıcıların gebe kalma açısından herhangi bir probleminin bulunmaması ve sağlıklı bir doğuma kadar gebeliği devam ettirebilecek vücut yapısı ve kondisyonuna sahip olmasıdır. İlk defa transfer uygulanacak bir sürüde yapılacak kısa bir ön inceleme ile sürüdeki hayvanların taşıyıcı olarak kullanılıp kullanılmayacağına karar verilebilir. Bu amaçla sürünün suni tohumlama programındaki başarısına bakılabilir. Suni tohumlama programının başarılı olması durumunda embriyo transfer uygulamasının da başarılı olacağı ön görülebilir. Taşıyıcı olarak kullanılacak inekler düzenli östrus siklusuna sahip olmalıdır. Taşıyıcı ineklerin vücut kondisyonlarının iyi, tercihen de kilo kazanıyor olması gereklidir. İnekler sürü sağlığı açısından özellikle aborta neden olan hastalıklar açısından temiz olmalıdır. Taşıyıcı olarak düvelerde kullanılabilir. Sağmal olmamalarından kaynaklanan yüksek fertilitate oranına sahip olmaları avantaj yaratırken, transfer esnasında düvelerde serviksin geçilmesi daha sıkıntılıdır. Ayrıca, güç doğumla karşılaşma olasılığı düvelerde daha yüksektir. İneklerde süt üretiminden kaynaklanabilecek infertilite sorunları gebelik oranlarında düşüşe sebep olabilir. Ancak, inekler manipülasyonların kolay yapılması ve güç doğum oranlarının daha az görülmesi gibi önemli avantajlara sahiptir¹⁸.

Süperovulasyon

Gonadotropinlerin özellikle de FSH'un (Folikül stimüle edici hormon) kullanılmasıyla birden çok sayıda oositin üretilmesi işlemidir. Süperovulasyon süperovulasyon uygulanmayan ineklerden elde edilen tek bir embriyonun yaklaşık 10 katından daha fazla sayıda embriyo üre-

tilmesine neden olabilir. Süperovulasyon uygulanmayan ineklerden deneyimli uzmanlarca yapılacak embriyo yıkamalarının yaklaşık %60'undan embriyo elde edilebilmektedir. Aynı koşullar altında uygulanan süperovulasyon programından yıkama başına ortalama 6 adet transfer edilebilir embriyo kazanılmaktadır. Ancak, yıkamalar arasında büyük farklılıklar söz konusu olmaktadır. Genellikle yıkanan süperovule ineklerin %20-30'undan hiç embriyo kazanılmazken, diğer %20-30'undan 1-3 adet embriyo kazanılabilmektedir. İdeal embriyo sayısı olan 5-12 embriyo vericilerin sadece üçte birinden elde edilebilmektedir. Zaman zamanda çok küçük oranda bir donör inekten 20'den fazla sayıda transfer edilebilir embriyo kazanılabılırken, çok nadiren de 50'den fazla sayıda embriyo kazanılabilmektedir^{5,18}.

Süperovulasyon amacıyla PMSG (gebe kırsak serum gonadotropini) ya da daha yaygın olarak kullanılan FSH kullanılmaktadır. PMSG ile yapılan süperovulasyon uygulamalarında 2000-2500 IU PMSG kas içi yolla uygulanır. PMSG uygulamasından 2 ya da 3 gün sonra luteolitik dozda PGF_{2α} uygulanır. Birinci PGF_{2α} uygulamasından 12-24 saat sonra uygulanan ikinci PGF_{2α} uygulamasının ise embriyo sayısını arttırdığı bildirilmiştir^{5,18}. Son yıllarda FSH kullanımını PMSG kullanımından daha yaygın hale gelmiştir. FSH kullanımında deri altı ya da kas içi yolla 12 saat arayla azalan dozlarda FSH uygulanır. En yaygın kullanılan FSH uygulamasında 6,6,4,4,2,2,2 ve 2 mg dozda FSH 12 saat arayla uygulanır. PGF_{2α} enjeksiyonu ise 6. ya da 7. FSH uygulaması ile birlikte uygulanır. Uygulanan FSH dozları süperovulasyon uygulanan ineğin canlı ağırlığına göre azaltılabilir ya da arttırılabilir. Tablo 1'de donör ve taşıyıcı ineklerin programlanmasına ilişkin örnek program sunulmuştur¹⁸.

Tablo 1'de sunulan örnek süperovulasyon programı östrus takibini gerektirmekte iken, östrus siklusunun herhangi bir zamanında uygulanan progesteron salan preparatların kullanılmasıyla da süperovulasyon başlatılabilmektedir. Böylece süperovulasyon işlemi sonucunda donör başına elde edilen embriyo sayısının arttırılmamasına rağmen, belirli bir zaman diliminde donör başına üretilen toplam embriyo sayısı arttırılabilmektedir. Ayrıca, donör ineklerin süperovulasyonları arasında pas geçilecek iki östrus siklusunun eskiden inanıldığı gibi embriyo üretimi üzerinde olumlu etkisinin olmadığı ve donör ineklerin günümüzde 1-2 yıl süreyle her 40 ya da daha az günde tekrar tekrar başarılı biçimde yıkanabileceği bildirilmiştir¹².

Tablo 1. Sığır işletmelerinde uygulanabilecek örnek embriyo yıkama ve transfer programı¹⁸.

Table 1. Sample embryo flushing and transfer program which might be applied in cattle farms.

Gün	Donör İnekler	Taşıyıcı İnekler
0	PGF _{2α} enjeksiyonu	Rektal palpasyonla ineklerin siklik olduklarının doğrulanması
11	PGF _{2α} enjeksiyonu	
12-16	Östrustaki ineklerin kaydedilmesi	
16		PGF _{2α} enjeksiyonu
25 akşam	6 mg FSH	
26 sabah	6 mg FSH	
26 akşam	4 mg FSH	
27 sabah	4 mg FSH	PGF _{2α} enjeksiyonu
27 akşam	2 mg FSH	
28 sabah	2 mg FSH + PGF _{2α} enjeksiyonu	
28 akşam	2 mg FSH + opsiyonel PGF _{2α} enjeksiyonu	
29 sabah	2 mg FSH	
28-32		Östrustaki taşıyıcı ineklerin kaydedilmesi
30 sabah	Donör ineklerde beklenen östrus zamanı	
30-31	Östrusun başlamasından 12 ve 24 saat donör vericilerin tohumlanması	
37	Embriyoların yıkama yoluyla kazanılması, dondurulması veya çözündürülmesi	Embriyoların taşıyıcı ineklere transfer edilmesi
37	PGF _{2α} enjeksiyonu	
47-54		Gebe kalmayan ineklerde östrus
75+		Rektal yoldan gebelik muayenesi
105+		Rektal palpasyonla gebelik bulgularının teyit edilmesi

Bu tür uygulamada östrus siklusunun herhangi bir döneminde uygulanan progesteron salan preparat 9 gün süre ile uygulanmaktadır. Uygulamanın 7. günü 12 saat ara ile yapılan 8 FSH enjeksiyonuna başlanmaktadır. Uygulamanın 9. gün sabahında PGF_{2α} enjeksiyonu uygulanmakta ve aynı günün akşamında progesteron salan preparat uzaklaştırılmaktadır. Uygulamanın 11. gününden itibaren östrusun gözlenmesi, ineğin tohumlanması ve yıkama işlemleri yukarıdaki Tablo 1’de sunulan örneğe benzer biçimde devam ettirilmektedir.

Donör İneklerin Tohumlanması

Süperovulasyon uygulamasını takiben, donör ineklerin östrusları yakından takip edilir. Normalde süperovulasyon uygulanmayan ineklere oranla süperovulasyon uygulanan inekler östrus davranışlarını açık biçimde sergilemeye bilirler. Bu nedenle östrus tespiti amacıyla çeşitli östrus tespit araçlarından faydalanmada yarar vardır. Yaklaşık olarak donörlerin %10’u hiç östrus göstermemekte ve bu donörler tohumlamada kullanılmamalıdır. Tohumlama zamanının

belirlenmesi bakımından başka hayvanca üzerinde atlandığında ilk gözlemlenen durma hareketi önem taşımaktadır. Süperovulasyon uygulaması ile birden fazla follikülün değişen zaman dilimlerinde ovule olmasından ve uygulama sonucunda sperm ve oositlerin transportunda ortaya çıkan değişikliklerden dolayı tohumlamaların normale göre daha sıklıkla ve daha yoğun sperm sayısı ile yapılması yerinde olacaktır^{6,18}.

Embriyoların Toplanması (Yıkama)

Embriyo transfer uygulamasına ilk başlandığı zamanlarda uterustan embriyolar cerrahi yöntemle toplanırlardı. Bu yöntem cerrahi olmayan embriyo yıkama prosedürünün geliştirilmesi ile rutinde kullanılmaz hale gelmiştir. Bu nedenle bu bölümde cerrahi olmayan yöntemle embriyo yıkama açıklanacaktır. Süperovulasyonla in vivo embriyo üretiminde östrusun tespit edildiği gün 0. gün kabul edilir ve genellikle östrus siklusunun 7. gününde embriyolar uterusun cerrahi olmayan yolla yıkanması sonucunda toplanırlar. Fertilizasyon sonrasında gelişen embriyolar normal şartlar altında yaklaşık östrus siklusunun 4. gününde oviduktan uterus lumenine geçerler. Embriyoların östrus siklusunun 5-9. günler arasında kolaylıkla yıkanabilmesine rağmen, 7. günde kazanılan embriyoların gelişim aşamaları hem dondurma işlemine hem de taze olarak gerçekleştirilecek embriyo transfer işlemlerine karşı daha toleranslı oldukları için embriyo yıkama işlemleri için 7. gün tercih edilmektedir¹⁹.

Uterusun cerrahi olmayan yöntemle yıkanması amacıyla 2 veya 3 yollu foley kateterleri kullanılmaktadır. Uygulanacak epidural anestezi işlemlerin yapılması sırasında, işlemleri uterusu yapılacak manipülasyonlar bakımından kolaylaştırırken, rektumun hava ile dolması önemli oranda güçlük yaratmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için yıkama alanında bir vakum pompasının bulundurulması gerekmektedir. Hijyen kuralları çerçevesinde foley kateteri ile serviks geçildikten sonra, hangi kornu yıkanacak ise o yönde ilerletilen kateter kornunun servikse yakın bölümünde sabitlenir ve ucundaki balon hava ile şişirilir. Katatere uygulanan hafif çekme ve itme hareketlerinde kataterin yerinden oynamaması işlemin başarıyla uygulandığını ifade eder. Daha sonra uterus içerisine embriyo yıkamaya elverişli embriyo yıkama solüsyonu (serum ilave edilmiş PBS, laktatlı ringer vs) gönderilir. Bu amaçla yıkama solüsyonunu inekten yaklaşık 1 m yukarıda tutmak gerekli akış hızını sağlamak için yeterlidir. Y konektörünün bir ucu yıkama solüsyonuna

takılı iken, diğ er ucu uterustan gelen ve içerisinde embriyoları bulduran sıvının filtre olduğu filtre sistemine bağıldır ve hayvanın karın bölgesinden aşağıdaki bir bölgede tutulur. Solüsyon uterus içerisine verilirken, filtre tarafından Y konektörü kapalı tutulurken, solüsyonun geldiği kısım açık tutulur. Solüsyon dışarı alınırken bunun tersi uygulanır. Böylece kornu içi yıkama solüsyonu ile 4-6 kez doldurulup-boşaltılarak yıkama işle mi gerçekleştirilir. İlk yıkama esnasında, kornunun tümü ile solüsyonla dolmaması büyük önem taşır. Böylece ovidukta yakın bölgede bulunabilecek embriyoların oviduktan geriye çıkışları önlenmiş olur. Aynı işlemler diğ er taraf içinde uygulanır ve yıkama işle mi tamamlanır. Yıkama sonrasında yıkama yapılan ineğe intra uterin antibiyotik ve PGF2□ enjeksiyonu uygulanır. Böylece hem uterusun enfekte olması hem de uterusta kalabilecek embriyo ya da embriyolardan kaynaklanabilecek gebelikler önlenmiş olur.

Embriyoların Aranması

Embriyoların aranması her iki kornunun yıkama işleminin tamamlanmasından sonra gerçekleştirilir. Bu amaçla kullanılan filtrenin özelliğine göre; ya filtrede tutulan yıkantı solüsyonu altı çizilmiş 100 mm çaplı petri kabına aktarılır ya da filtrenin kapağı uzaklaştırılarak petri kabına benzer bölümünün altı çizilerek direkt olarak embriyo arama işlemine geçilir. Petri kapları stereo mikroskop altında dikkatlice araştırılır. Mikroskop altında tespit edilen embriyolar, içerisinde temiz embriyo yıkama solüsyonu bulunan küçük petri kaplarına aktarılır. Arama işleminin sonunda embriyoların morfolojik değerlendirmesine geçilir. Embriyolar yaklaşık 20 °C oda ısısında 8 saate kadar canlı kalabilirler. Ancak ideal olanı embriyoların 3-4 saat içerisinde ya dondurulmaları ya da transfer edilmeleridir¹⁹.

Embriyoların Morfolojik Değerlendirilmesi

Memelilerde dişi gamet hücresi yumurta ya da ovum olarak adlandırılır. Yeni ovule olmuş dişi gamet için en doğru tanımlama oosit tir. Fertilizasyon sonrasında oosit tek hücreli embriyo (zigot) aşamasındadır. Daha sonra embriyo 2 hücre, 4 hücre gibi bölünme aşamalarına ulaşır ve 16 hücreden itibaren embriyo morula olarak adlandırılır. Morula aşaması embriyo içerisinde şekillenen bir boşluğun (blastosöl) ortaya çıkmasına kadar devam eder ve bu aşamadan sonra embriyo blastosist olarak adlandırılır.

Morula aşamasında embriyo hücrelerinin şekli küreselden poligonal forma dönüşür. Bu dönüşüm kompaktlaşma olarak adlandırılır. Kompaktlaşmanın başlaması embriyonun normal geliştiğinin önemli bir göstergesidir ve ineklerde östrustan sonraki 6. günde kompaktlaşmanın görülmemesi gelişimde gecikmenin olduğuna işaret eder. Blastosist aşamasına geçişte ise blastosöl formasyonu şekillenir. Blastosist aşamasına geçişte gelişimin normal devam ettiğinin önemli bir göstergesidir ve blastosöl oluşumunun ineklerde östrustan sonraki 7. ve 8. günlerde gözlenmemesi de gelişimde gecikmenin söz konusu olduğuna dair önemli bir işarettir^{6,18}.

Embriyo transfer işleminde yeni olanlar için en önemli sıkıntı embriyoların morfolojik değerlendirmelerinin yapılmasıdır. Fertilize olmamış ya da dejenere embriyoları transfer etmenin yanında, iyi kalitedeki embriyoların yanlış değerlendirilerek imha edilmesi bu işe yeni başlayanlar tarafından sıkça yapılan hatalardır. Değerlendirmenin doğru yapılması üç ana unsura bağıldır ve bunlar; eğitim, deneyim ve doğru ekipmanın kullanılmasıdır. Kısaca ifade etmek gerekirse, 7. günde yıkama yapıldığı için normal şartlarda elde edilen embriyoların büyük çoğunluğu kompakt morula ya da blastosist aşamasında olmalıdır. Ancak, içi boş zona pellusida, fertilize olmamış oosit, erken dönemde gelişimi durmuş, dejenere olmuş embriyolar ve zonasından dışarı çıkmakta ya da tümüyle çıkmış olan embriyolarla da karşılaşmak mümkündür. Yukarıda da değerildiği gibi, doğru bir değerlendirme ancak alınacak iyi bir eğitim ve sonrasında kazanılacak deneyime bağıldır. Kısaca özetlemek gerekirse; yıkama sonrasında elde edilen embriyolar altı ana gruba ayrılabilir. Bunlar;

- Çok iyi: gelişim dönemlerine göre kusursuz embriyolar,
- İyi: oval zona pellusida, çok az sayıda ve embriyo kütlesi dışında kalmış küçük hücreler veya hafif düzeyde asimetric şekil gibi önemsiz kusurlara sahip embriyolar,
- Orta: makul sayıda embriyo kütlesi dışında kalmış hücreler, normalden küçük büyüklük, az miktarda dejenerasyon ve gelişimde 1 güne kadar gecikme gibi net fakat ciddi olmayan anormalliklere sahip embriyolar,
- Zayıf: önemli derecede dejenerasyon, veziküllü hücreler, embriyo hücrelerinin büyüklüklerinde önemli değişiklikler, kompaktlaşmanın gerçekleşmemesi ve aynı zamanda gelişimde 2 güne kadar gecikme gibi bozukluklara sahip embriyolar,

- Dejeneratif: transfer edilemeyecek kadar şiddetli dejenerasyona sahip embriyolar,
- Fertilize olmamış ya da 2-3 hücreli embriyolar olarak tanımlanabilir¹⁸.

Embriyoların Dondurulması ve Çözündürülmesi

Morfolojik değerlendirme sonrası embriyolar ya direkt olarak senkronize edilmiş taşıyıcı ineklere transfer edilirler ya da sonradan kullanılmak üzere dondurulurlar. İlk kez 1972 yılında fare embriyolarının dondurulmasıyla başlayan gelişmeler, embriyo transfer uygulamasının yaygınlaşmasını ve ticari boyutta dünyanın birçok ülkesinde uygulama alanı bulmasını sağlamıştır. Embriyoların dondurulması ve çözündürülmesine ilişkin detaylı bilgi için Sağırkaya ve Bağış¹⁶ tarafından derlenen “Memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu” isimli derlemeye bakılabilir.

Embriyoların Transferi

Normal şartlarda östrus siklusunun 7. gününde yıkanan donör ineklerden elde edilmiş taze veya dondurulmuş blastosist aşamasındaki embriyolar östrus sikluslarının 6-8. günlerinde bulunan taşıyıcı ineklere transfer edilir. Taze embriyo transferleri için ineklerin senkronize edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla bilinen senkronizasyon yöntemlerinden uygun olan birisi kullanılabilir. Özellikle uzak bir işletmede toplu olarak çok sayıda dondurulmuş embriyonun transfer edileceği durumlarda senkronizasyon işleminden yararlanılabilir. Ancak, ulaşımı kolay yakın bir işletmede az sayıda dondurulmuş embriyonun transfer edileceği durumlarda senkronizasyon uygulamaksızın, takip edilen östrus sikluslarının 7. günlerinde transferler gerçekleştirilebilir. Bu durumun maliyet analizinin yapılarak karar verilmesinde yarar vardır. Bilindiği üzere senkronizasyon amacıyla kullanılan hormonlar önemli bir maliyet oluşturmaktadır. Senkronizasyon amacıyla yaygın olarak kullanılan hormonlar PGF_{2α}, GnRH (gonadotropin salıcı hormon) ve progesteron hormonları yaygın olarak kullanılmaktadır. Tablo 1’de 11 gün ara ile uygulanan PGF_{2α} senkronizasyon uygulamasına ait bir örnek sunulmuştur. Senkronizasyondaki ana hedef embriyonun transfer edileceği uterus ortamının embriyonun gereksinimlerine cevap verebilmesini ve implantasyonun gerçekleşmesini sağlamasıdır. Bu da ancak embriyo ile uterus ortamının senkronize olmasına bağlıdır. Başka bir deyişle ifade etmek gerekirse, 7. günde kazanılmış blastosist aşamasındaki bir embriyonun

östrusundan sonra 7 gün geçmiş bir ineğe transfer edilmesi gereklidir. Ancak bu aşamada ± 1 günün tolere edildiği de akılda tutulmalıdır.

Sığırlarda uygulanan embriyo transfer uygulamalarında başlangıçta uygulanan cerrahi yöntemin kullanılması günümüzde hemen hemen terk edilmiştir. Dolayısıyla pratikte yaygın olarak kullanılan cerrahi müdahale gerektirmeden yapılan embriyo transferi tartışılacaktır. İlk olarak 1 hafta (6-8 gün) önce östrus gösterdiği tespit edilmiş inekler transferin yapılacağı uygun alana getirilirler. Uygulamaya başlamadan önce, taşıyıcı ineklerin rektal muayeneleri yapılarak corpus luteumları dikkatlice incelenir. Uygun corpus luteumu bulunmayan ya da herhangi bir üreme kanalı patolojisine sahip inekler uygulamadan çıkartılır. Transferler uterus kornusuna yapılır ve dikkat edilmesi gereken önemli husus, embriyonun corpus luteumun bulunduğu ipsilateral kornuya nakledilmesidir. Aksi takdirde gebelik oranlarının azalacağı bildirilmiştir^{6,18}.

Korpus luteumların hangi tarafta bulduklarını tespit ettikten sonra, epidural anestezinin uygulanması yapılacak maniplasyonları kolaylaştıracaktır. Ancak, deneyim kazanmış kişiler epidural anestezi uygulamadan da bu işlemi başarıyla uygulayabilir. Gerekli temizlik ve hijyen işlemleri ile vulva ve çevresi dikkatlice temizlenir. Taze transferlerde embriyo yıkama medyumunu içerisinde hava ile ayrılmış biçimde payet içerisine yüklenir. Bu amaçla payet içerisine ilk olarak 5-6 cm’ye kadar solüsyon çekilir. Bu kısımda yaklaşık 0,5 cm hava boşluğu bırakıldıktan sonra, içerisinde embriyo bulunan solüsyon çekilir. İkinci hava boşluğu da bırakıldıktan sonra, payet solüsyon ile doldurulur. Ticari olarak satılan dondurulmuş embriyolar sahada kolaylıkla uygulama yapılması için direkt transfer edilecek tarzda payetler içerisinde dondurulmuştur. Bu durumda çözündürme sonrası payet sallanarak embriyonun bulunduğu hava boşluklarıyla sınırlanmış bölümün diğer bölümlerle karışması sağlanır. Daha sonra embriyo yüklü payet embriyo transferi için özel olarak tasarlanmış embriyo transfer kataterine yerleştirilir ve üzerine naylon kılıf takılarak vajen içerisine sokulan kataterin serviksi geçmesi sağlanır. Serviksin geçilmesi östrus zamanında uygulanan tohumlama işleminde olduğu kadar kolay değildir. Bu durumun nedeni östrustaki ineğin serviksinin daha açık yani geniş ve uterusun daha kontraktıl olmasındandır. Düvelerde bu işlem servikslerinin daha da küçük olmalarından dolayı daha da zordur. Serviksin geçilmesinden sonra, ilk olarak katatere takılan naylon kılıf

yırtılarak çıkarılır ve kataterin ucunun korpus luteumun bulunduğu taraftaki kornu lumenine travmaya neden olmadan hızlı ve nazik bir biçimde sokulması gerekir. Uygun pozisyon alan kataterin stilesi itilerek embriyonun lumene geçmesi sağlanır ve katater dikkatli bir biçimde dışarıya çıkarılır. Böylece embriyo transfer işlemi gerçekleştirilmiş olur. Çıkarılan kataterde kan görülmesi uygulama sırasında travmanın oluştuğuna işaret sayılır^{15,18}. Transfer sonrasında rutin gebelik kontrolleri yapılarak gebelikler tespit edilir.

Türkiye açısından embriyo transfer uygulamasının önemi

Dünyada 1970'li yıllarda ticari olarak uygulama alanı bulan embriyo transfer uygulaması, maalesef Türkiye'de hayvancılık alanında kullanılan biyoteknolojik yöntemler arasında uygulama açısından en geride kalmış uygulamalardan birisi olarak önümüze çıkmaktadır. Bilindiği üzere, dünyada suni tohumlama uygulamasına başlayan ikinci ülke olmamıza rağmen, kat ettiğimiz mesafe bu alanda da tatminkar düzeye ulaşamamıştır. Suni tohumlama uygulamasıyla sağlanması gereken genetik ilerleme ülkemiz açısından kullanılan boğaların seçim kriterlerinin yeterli düzeyde yapılmamasından ve suni tohumlama uygulamasının yaygınlaştırılmamasından dolayı arzu edilen düzeye ulaşamamıştır. Ancak, dışarıdan bakıldığında ülkemizin özellikle süt sığırcılığı açısından önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Bu durumu da son zamanlarda kurulan kapasitesi yüksek modern çiftliklerin artması desteklemektedir. Kurulan bu çiftliklere yenilerinin katılmasının sağlanması, ancak karlılığı yüksek hayvancılık işletme örneklerinin artmasıyla mümkün olacaktır. Suni tohumlama yolu ile sağlayamadığımız genetik ilerlemeyi, özellikle damızlık üretim yapacak işletmelerde embriyo transferi uygulayarak, kısa zaman içerisinde sağlayabiliriz. Bilindiği üzere suni tohumlama yoluyla boğadan aktarılacak genetik ilerleme %50 düzeyinde kalacaktır. Oysa pedigrî kayıtları çok iyi bilinen bir ineğin dünyadaki en iyi sperma ile tohumlanması sonucunda elde edilecek embriyolarının da çok iyi niteliklere sahip olacağı çok açıktır. Ülkemiz açısından mevcut popülasyonda yer alan ineklerin geriye dönük pedigrî kayıtları esas alındığında, oturmamış kayıt sisteminden dolayı, sağlıklı kayıtların olmadığı herkes tarafından bilinen ve kabul edilen bir durumdur. Pedigrî kayıtları yeni kurulan ve kurulacak olan modern çiftliklerce daha güvenilir bir şekilde tutulabilecektir.

İki yıl önce yaşanan kuraklığın neden olduğu yem fiyatlarının artması gibi sıkıntılara rağmen, süt ve et fiyatlarının sabit kalması ve üzerine geçen yıl dünya çapında ortaya çıkan ekonomik krizin etkileri sonucunda, ülkemizde birçok damızlık hayvanın kesime sevk edilmesiyle azalan hayvan popülasyonunun yetersizliği hayvansal ürünlere olan talebin karşılanmasını zora sokmuştur. Bunun sonucunda, ülkemizde özellikle son 1 yıl içerisinde süt ve et fiyatları artmaya başlamış ve piyasada bu artış eğiliminin önümüzdeki dönemde de devam edeceği ön görülmektedir¹⁹. Yukarıda bahsedilen büyük çaplı işletme sayısının artmasının yanı sıra, bu türden işletmelerin çeşitli hastalıklardan arı sürüler kurma istekleri de göze çarpmaktadır. Hastalık taraması işin içine girdiğinde, verim açısından istenilen düzeyde hayvan bulmakta büyük güçlük yaşanmaktadır. Embriyo transferi yapılacak taşıyıcı ineğin verim özelliklerinin çok iyi olması önem taşımamaktadır. Taşıyıcılar için aranan en önemli nitelik taşıyıcının gebe kalmasını ve gebeliğini sürdürebilmesini önleyecek herhangi bir reproduktif sorununun bulunmamasıdır. Zaten verim açısından birkaç nesil geriye pedigrisi bilinen yüksek verimli hayvanlara embriyo transfer etmek yerine, seçilecek iyi bir boğa sperması (cinsiyeti belirli de olabilir) ile tohumlama yapılması daha akıllıca ve daha ekonomiktir.

Yurt dışından bazı bilim insanları ile konuşulduğunda embriyo transferinin pahalı ve gereksiz olduğunu düşündükleri görülmektedir. Bu durum onların kendi ülkeleri ve şartları için geçerli olabilir. Çünkü popülasyona bakıldığında verim açısından bir homojenliğin söz konusu olduğu göze çarpmaktadır. Biraz önce açıklandığı gibi verim açısından istenilen niteliğe sahip bir hayvanı taşıyıcı olarak kullanmak zaten gereksiz ve ekonomik açıdan da pahalı bir iş olacaktır. Ülkemizde ise 15 litreden 80 ve üstü litrelerde süt veren ineklere rastlamak mümkün olmaktadır. Bu durumda düşük süt verimine sahip ineklerin taşıyıcı olarak kullanılmaları akıllıca olmaktadır. Ülkemizde genetik ilerlemeyi kısa zaman içerisinde sağlayabilmek amacıyla, ilk olarak ithal edilen anne ve baba kayıtları iyi olan embriyoların kullanılması daha akıllıca bir yol olarak görülmektedir. Böylece 1. kuşaktan yurt dışı kayıtları bilinen ve anneden kazanılan bağışıklık ile ülkemiz şartlarına adapte olmuş çekirdek bir sürü kurulabilir. Sonraki aşamada ise, elde edilen dişiler kendi ülkemizde donör olarak kullanılabilir ve böylece maliyetler minimize edilebilir.

İşletmelerin sayısı arttıkça kar marjları da artan hayvan başı ortalama günlük süt miktarı ile artmaktadır. Şöyle ki; 500 sağmal ineği olan bir işletmede verimsiz hayvanlara yapılacak embriyo transfer uygulaması ile inek başı ortalama günlük süt miktarı 2 lt arttığında toplamda 1000 lt fazladan süt üretimi gerçekleşecektir. Embriyo pedigrilerinin çok iyi olması durumunda elde edilecek günlük süt miktarı inek başına 3-5 lt hatta daha da fazla artırılabilir ve böylece sağlanacak kar marjının boyutu da önemli oranda yükselir. Süt verimi dışında diğer bazı önemli yetiştiricilik sorunlarının da (meme yapısı, ayak vs) embriyo seçimi ile genetik olarak iyileştirilebileceği akılda tutulmalıdır. Burada unutulmaması gereken en önemli husus, kurulan sürünün genetik potansiyelinin ne kadar iyi olursa, karlılığın da o kadar iyi olacağı hususudur. Süt ortalamasının ülkemiz ortalamasından daha yüksek olduğu bir işletmeden satılacak düvelerin satış fiyatlarının da daha yüksek olacağı ön görüşünü yapmak yanlış olmayacaktır. Bu türden işletmeler için sürekli bir embriyo transfer uygulaması yapmaları da gereksiz olacaktır. Bakım, besleme, hijyen ve koruyucu önlemler ile sürüde oluşacak hedef süt verimi yakalandığında embriyo transferi yapmadan iyi nitelikli boğa spermaları kullanarak yüksek süt verimini devam ettirmek mümkün olacaktır. Ayrıca, sürüdeki çok iyi ineklerden diğer verimi düşük çiftliklere satılmak üzere embriyo elde etmek amacıyla da kullanım söz konusu olacak ve bu hayvanların karlılığı işletme için daha da artırılabilir.

Ülkemiz açısından embriyo transfer uygulamasının gelişen süt sığırcılık işletmeleri ve bu işletmelerde en iyi verimi alabilmek için genetik ilerlemenin iyileştirilmesi amacıyla yakın gelecekte uygulama şansı bulacağı öngörüsü ağırlık kazanmaktadır. Saha şartlarında bu tür uygulamaları yapabilecek düzeyde eğitilmiş ve deneyimli veteriner hekimlere olan talebin artacağı gerçeği, sahada büyükbaş çalışan ya da çalışmayı planlayan veteriner hekimlerce değerlendirilmesi gereken önemli bir konu olarak akılda tutulmalıdır.

Kaynaklar

1. Akyol, N., Kızıl, S.H., Karaşahin, T., 2007. İn vitro sığır embriyosu üretim ve transferi. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 47, 1-8.
2. Ambrose, J.D., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Leibfried-Rutledge, M.L., Thatcher, M.J., Kassa, T., Bineli, M., Hansen, P.J., Chenoweth, P.J., Thatcher, W.W., 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 82, 2369-2376.
3. Arat, S., Taş, A., Bağış, H., Sağırkaya, H., Nak, Y., Nak, D., Pabuççuoğlu, S., Cirit, Ü., Karaman, E., Demir, K., Ak, K., Akkoç, T., Çetinkaya, G., 2008. Anadolu Boz sığır irkinin klonlanması. *III. Veteriner Jinekoloji Kongresi* (Uluslararası katılımı), 23-26 Ekim 2008, Sözlü Tebliğ, Sayfa 84-85, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kervansaray Lara Otel, Antalya.
4. Brock, K.V., Lapin, D.P., Skrade, D.R., 1997. Embryo transfer from donor cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology*, 47, 837-844.
5. Bülbül, B., Dursun, Ş., 2005. İneklerde süperovulasyon cevabına etki eden faktörler. *Hay. Araşt. Derg.*, 15, 16-25.
6. Curtis, J.L., 1991. Cattle embryo transfer procedure, 2nd ed., Academic Press, Inc., San Diego, California USA.
7. Drost, M., Thatcher, J.D., Cantrell, C.K., Wolfsdorf, K.E., Hasler, J.F., Thatcher, W.W., 1994. Conception rates after artificial insemination or transfer of frozen/thawed embryos to lactating cows during summer. *J. Dairy Sci.*, 77, 380.
8. Elsdon, R.P., Nelson, L.D., Seidel, G.E., Jr., 1979. Embryo transfer in fertile and infertile cows. *Theriogenology*, 9, 17-26.
9. Faber, D.C., Molina, J.A., Ohlrichs, C.L., Vander Zwaag, D.F., Ferre, L.B., 2003. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, 59, 125-138.
10. Givens, M.D., Marley, S.D., 2008. Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology*, 69, 129-136.
11. Hansen, P.J., Arechiga, C.F., 1999. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *J. Anim. Sci.*, 77, 36-50.
12. Hasler, J.F., 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 79, 245-264.
13. Hasler, J.F., McCauley, A.D., Lathrop, W.F., Foote, R.H., 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27, 139-168.
14. Mapletoft, R.J., Hasler, J.F., 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 24, 393-403.
15. Mollo, A., Lora, M., Faustini, M., Romagnoli, S., Cairoli, F., 2007. Some factors affecting embryo transfer success in dairy cows. *J. Anim. Vet. Adv.*, 6, 496-499.
16. Sağırkaya, H., Bağış, H., 2003. Memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 22, 127-135.

17. Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N.L., Parrish, J.J., Memili, E., 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.*, 101, 225-240.
18. Seidel, G.E., Seidel, S.M., Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal <http://www.fao.org/DOCREP/004/T0117E/T0117E00.htm>. Production and health paper 77.
19. Smith, A.K., 2009. Embryo transfer – opportunities for vets and scientists. *Cattle Pract.*, 17, 16-25.
20. Willet, E.L., Black, W.G., Casida, E.L., Stone, W.H., Buckner, P.J., 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 113, 247.

