

Evcil Hayvanlarda Embrio Nakli

Erol ALAÇAM *

Embrio nakli, fekonde olmuş ve normal olarak gelişmesine devam eden ovum'un verici hayvanın oviduct veya uterusundan alınarak diğer bir hayvana transferi olarak tanımlanabilir. Ancak yöntemin ekonomik olabilmesi için hormon enjeksiyonları ile ovaryumlarda birden fazla sayıda follikül geliştirilip, ovulasyon yaptırılması gereklidir. Böylece yüksek verimli bir hayvandan bir batında ve ilk kuşakta, genetik olarak ananın tüm verim özelliklerini taşıyan, çok sayıda yavru elde edilmesi mümkün olmaktadır.

Embrio nakli sonuçlarına bakılarak cazip bir yöntem olarak görülmekle birlikte çok iyi bir organizasyon ve deneyime gereksinim göstermektedir. İyi ve planlı bir grup çalışması ile başarılı sonuç alınması mümkündür. Literatürlerde başarı oranı taze embrio ile ortalama % 70 ve dondurulmuş embrio ile % 55 olarak bildirilmektedir.

Biz bu yazıda embrio naklinin genetik ve ekonomik yönlerine daha fazla değinmeden, büyük ve küçük ruminantlarda uygulanma yöntemini gözden geçirmeyi amaçladık.

1. VERİCİ VE TAŞIYICI HAYVANLARIN SEÇİMİ:

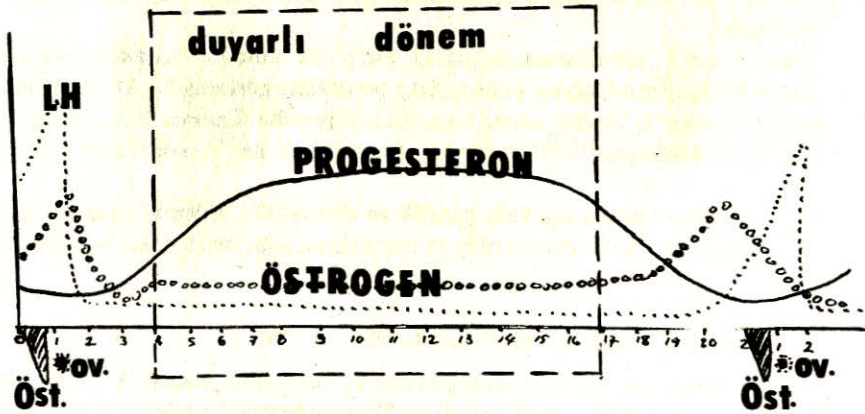
Verici (donor) hayvanların üstün genotip özelliklerinin yanısıra fertilitesi normal hayvanlar arasından seçilmesi önemlidir. Taşıyıcı hayvanlarında verimleri düşük olabilmekle beraber fenotip olarak vericilere yakın, iyi gelişmiş, normal besili, fertilitesi iyi, siklusları düzgün ve belirgin olmalıdır. Materyalin seçiminden sonra gerek verici gerekse alıcıların en az bir, iki siklusu izlenerek süreleri ve ovaryumlardaki fonksiyonel yapıların durumu kontrol edilmelidir. Bu muayeneler ineklerde rektal palpasyonla kolaylıkla yapılabilir. Küçük ruminantlarda ise koşullar elveriyor ise endoskopi ile ovaryumlar gözlenebildiği gibi sürüye arayıcı koç veya teke katılarak östrüsler izlenip, siklusların süresi buna göre hesaplanabilir.

* Doç.Dr.; A.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Dölerme Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara — TÜRKİYE.

2. VERİCİ VE TAŞIYICILARIN SİNKRONİZASYONU VE SÜPEROVULASYON:

Östrüs ve ovulasyonun istenen zamana göre planlanması şeklinde tanımlanabilen sinkronizasyon, özellikle belirli ve az sayıda materyalle çalışılan koşullarda mutlaka uygulanması gerekli bir yöntemdir. Taşıyıcı olarak çok sayıda hayvan bulunabilirse bunlar arasından verici ile aynı günde östrüs gösterenler seçilip, sinkronizasyon gerekmez.

Gerek vericilerin gerekse taşıyıcıların sinkronizasyonu ya progesteronların, oral, deri altı implant, kas içi enjeksiyon veya vaginal süngerler biçiminde uygulanması ile ya da $PGF_2\alpha$ veya analoglarının kas içi, uterus içi enjekte edilmesiyle yapılır. Progesteronlarla östrüs ve ovulasyon istenen süre geciktirilebilirken, prostaglandinler ile fonksiyonel corpus luteum ortadan kaldırılarak kısa sürede bir follikül gelişmesi ve östrüs sağlanabilir. İneklerde rektal palpasyon ile corpus luteumun kolaylıkla belirlenebilmesi nedeniyle $PGF_2\alpha$ veya analoglarının 25-35 mg. dozlarda kas içi yolla enjekte edilmesi en pratik yöntem olarak kabul edilmektedir. Pro-östrüs, östrüs veya meaostrüs dönemindeki ineklerde ise 11 gün ara ile iki enjeksiyon yapılması gerekir. Östrüs son enjeksiyonu izleyen 2-5 gün içinde şekillenir.



Şekil: 1

İnekte seksüel siklus sırasındaki hormonal düzen ve prostaglandinlerin uygulanma zamanları

Küçük ruminantlarda ise progesteron emdirilmiş süngerler (40-60 mg) vagina uygulanıp, 13-16 gün burada bırakılırlarsa, süngerlerin çıkartılmasını izleyen 36-48. saatler içinde östrüsler şekillenir. Sinkronizasyon için prostaglandinler çift enjeksiyon şeklinde (7.5 mg) dozda uygulanabilirse de küçük ruminantlar için sünger uygulamaları daha pratik ve ucuz olmaktadır.

Embryo nakli için alıcı ve vericiler arasındaki sinkronizasyon farkı ± 24 saati geçmemelidir.

Ovaryumlarda çok sayıda follikül geliştirilmesi ve ovulasyonun sağlanması şeklinde tanımlayabileceğimiz süperovulasyon ise gonadotropik hormonların enjeksiyonu ile sağlanır. Bu amaçla PMSG (Gebe kısrak serumu) ineklerde 2000 ± 500 IU, küçük ruminantlarda 1200-1300 IU dozda kullanılabilir.

PMSG, ineklerde vericinin sinkronize edilmediği doğal siklusun 16. gününde, prostaglandinler kullanılmışsa son enjeksiyondan 40-48 saat önce enjekte edilir. Küçük ruminantlarda ise süngerlerin çıkartılmasından veya son prostaglandin uygulamasından 24 saat önce verilir. Süperfolliküasyon için FSH hormonu da kullanılabilir. Ancak yarı ömrü kısa bir hormon olduğundan son progesteron uygulamasından bir gün önceden başlayarak 12 saat ara ile 3 gün bölünmüş dozlarda enjeksiyonu gerekmektedir.

Böylece gonadotropin enjeksiyonları ile ortalama 8-12 ovulasyon sağlanabilmektedir.

3. TOHURLAMA:

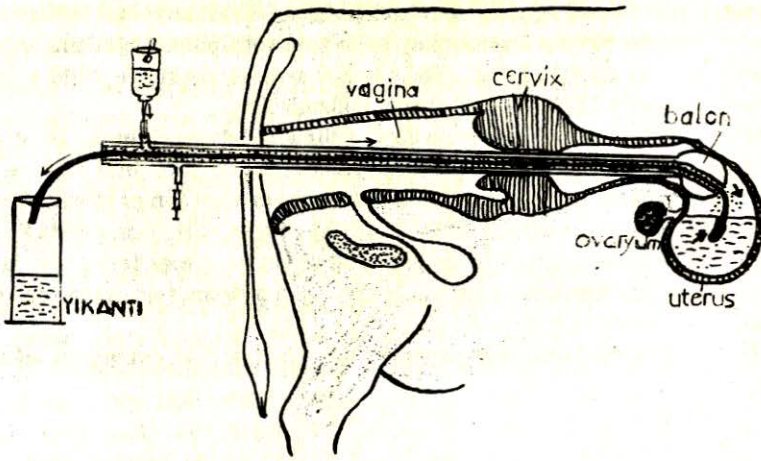
Gerek verici gerekse taşıyıcıların östrüs gösterip göstermedikleri özenle izlendikten sonra sıra vericinin tohumlanmasına gelir. İneklerde doğal aşım ile en iyi sonuçlar alınmaktadır. Bu durum spermanın nitelik ve niceliğinin yanı sıra östrüsün iyi olarak belirlenmesine de bağlıdır. Suni tohumlama yapılacaksa östrüs ve sonrasında 12 saat ara ile çift doz kullanılarak iki defa tohumlama yapılması yeterli olur.

Küçük ruminantlarda ise doğal aşım yapılıyorsa hayvanlarda seksüel istek so-na erene kadar 12 saat ara ile aşım yapılması gerekir. Araştırmadan median çizgiden yapılan laparatomiden sonra 0.01-0.02 ml. spermanın doğrudan cornu uterilere, utero tubal noktanın 3-4 cm. gerisinden, verilmesi ile en iyi sonuçların alındığını göstermektedir.

4. EMBRİOLARIN ELDE EDİLMESİ:

İneklerde embrioları elde etmek için en uygun yöntem uterusun vaginal yolla yıkanmasıdır. Embrioların 3-5 günlerde çoğunlukla 4. günden sonra, uterusu indiği gözönünde tutulmalıdır. Gerek uterusun yıkanması gerekse nakledilene kadar embrioların saklanması için değişik vasatlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında "Zenginleştirilmiş fosfat buffer (PBS) (Whittingam PB₁)⁵ vasatı oldukça sık kullanılmaktadır. Bu vasat hazırlandıktan sonra deep-freeze de dondurularak 3 ay kadar saklanabilir. Kullanılacağı zaman 30-37°C ye ısıtılmalıdır.

İneklerde uterusun yıkanması için iki veya üç kanallı foley kateteri en sık kullanılmaktadır. Bu kateterler rekto vaginal yöntemle cervix uteri kanalından geçirilerek uterusu sokulurlar. Yıkancak kornu uterinin uç kısmına kadar itildikten sonra, verilen sıvı vasatın sadece kateter aracılığı ile geri alınabilmesi için, ucundaki balon hava verilerek şişirilir. Böylece kateterin ucu uterusun cidarları arasında sıkışır. Daha sonra her defasında 50 ml. vasat kullanılarak her iki cornu uteri ayrı ayrı 500'er ml. vasat ile yıkanır. Sıvının geri alınması sırasında rektumdaki elle cornu uteriler hafifçe yukarı kaldırılarak ve hafif masajlar yapılarak sıvının akışı kolaylaştırılmış olunur.



Şekil: 2
İneklerde kornu uterilerin yıkanması

Koyunlarda ise uterusun yıkanması laparotomi ile yapılır. Median çizgiden yapılan ensizyondan sonra uterus dışarı alınarak oviduct'un serbest ucuna cam bir kanül yerleştirilir. Daha sonra utero tubal noktanın 4-5 cm. uzağından küt bir iğne ile uterusu girilerek 10 ml. vasat lumene enjekte edilir. Vasatın geriye doğru akmasını engellemek üzere bifurkasyon noktasından uterusu bir barsak pensi uygulanabilir. Daha sonra uterus duvarına yapılan özenli masaj hareketleri ile uterustaki sıvı oviduct'tan geçirilip ucundaki kanül yardımıyla bir petri kutusunda toplanır. Aynı işlemler diğer kornuda da tekrarlanır.

Uterusların yıkanmasından sonra lumenine bir miktar antibiyotik verilmesi koruyucu olarak faydalı olur.

Elde edilen yıkantılar steril cam mezürler veya petriler içinde 30 dakika kadar dinlenmeye bırakılır. Bu arada embriolar ağırlıkları nedeniyle dibe çökerler.

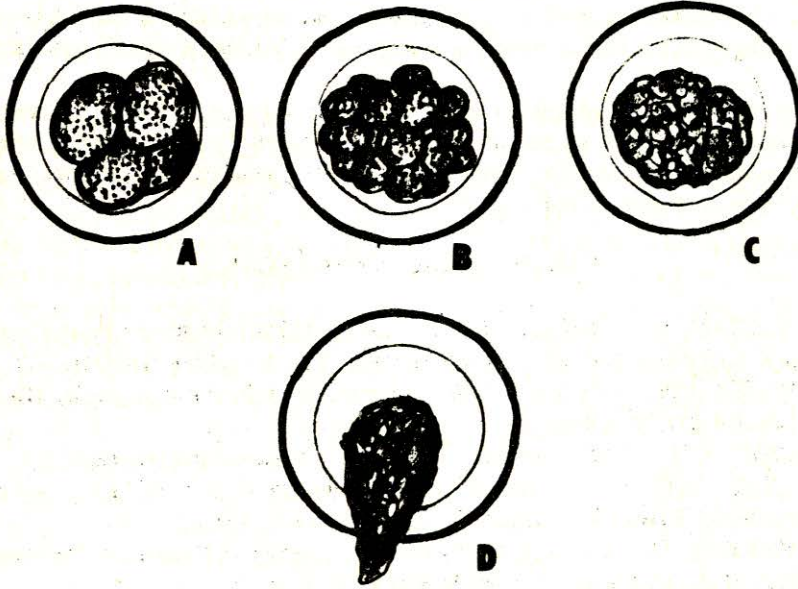
5. EMBRİOLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ:

Mezürlerin üst kısmındaki vasat bir pipet ile çekilerek alınabilir. Kalan dip kısımdaki vasat saat camı biçimindeki çukur camlara veya ufak petri kutularına dağıtılarak Stereo mikroskopta X12-X50 büyültmelerde kontrol edilir. Mikroskopta saptanan embriolar teker teker, ucuna tüberkülin şırıngası iliştirilmiş ince pastör pipetleri ile alınarak ayrı kaptaki taze vasat içinde toplanırlar. Yıkantılardaki embrioların tamamı toplandıktan sonra embrioların değerlendirilmesine geçilir. Değerlendirme morfolojik olarak yapılır. Döllenenmiş olanlar kolaylıkla ayırt edilebilir. Tablo: 1 de günlere göre embrioların morfolojik özellikleri verilmiştir.

Fekonde olmuş ve bölünmelerini normal olarak sürdüren embriolar nakil amacı ile kullanılabilirler. Embrio naklinde embrioların değerlendirilmesi başarıyı etkilemesi yönünden çok önemlidir.

Tablo: 1
Embrioların Morfolojik Özellikleri (Günlere göre)

Toplama Günü	İnek	Koyun	Keçi
2	2 hücreli	2-4 hücreli	1-2 hücreli
3	4 hücreli	8 hücreli	4-8 hücreli
4		8-20 "	8-20 "
5	16 hücreli	Erken morula	Erken morula
6	Morula	Geç morula	Morula
7	Erken blastocyst	Sarkan blastocyst	Geç morula



Şekil: 3

Değişik dönemdeki inek embrioları

a) 4 hücreli (3. gün), b) 16 hücreli (5. gün)

c) Morula (6. gün), d) Açılan blastocyst (10. gün).

6. EMBRİOLARIN TAŞIYICILARA NAKLİ:

Nakil işlemi ineklerde operatif veya operatif olmayan yöntemlerle yapılabilir. Koyunlarda ise operatif nakil en sağlıklıdır.

İneklerde operatif yöntemde açıklık çukurluğunun biraz gerisinden düşey bir ensizyonla laparotomi yapılarak pelvis boşluğunda yer alan uterus mümkün olduğun-

ca dışarı çekilir. Corpus luteumu taşıyan ovaryum tarafındaki kornu uterinin uç kısmına küt bir iğne ile delik açılır. Buradan pastör pipeti içine 0.2 ml. vasatla birlikte alınan embrio uterus lumenine yavaşça enjekte edilir. Operatif olmayan yöntemde ise embrio, mini payetlere veya uygun uzunluktaki polietilen sondalara alındıktan sonra suni tohumlama şırıngası veya özel bir madeni kateter ile cervix uteri kanalından geçirilip kornunun uç kısmına bırakılır. Embrionun nakli sırasında içinde bulunduğu vasat miktarı 0.2-0.5 ml. olmalıdır. Aksi takdirde uterus kontraksiyon yaparak embrioyu dışarı atar. Nakilden sonra hayvana progesteron enjeksiyonu yapılması yararlı olur.

Küçük ruminantlarda ise nakil operatif yöntemle yapılır. Median çizgiden yapılan ensiyonla karın boşluğuna girilip, uterus dışarı alındıktan sonra pastör pipetine alınan embrio ineklerde yapıldığı gibi kornu uterin ucuna doğru enjekte edilir.

Gerek büyük gerekse küçük ruminantlarda embriolar 5. günde uterustan toplanarak yine uterusu nakledilirlerse en iyi sonuçları vermektedirler. Daha erken dönemde oviduct'tan toplanan embriolar ise operatif yöntemle oviduct'a nakledilmelidirler.

Böylece nakiller yapıldıktan sonra izleyen ilk östrüs zamanında nakil yapılan taşıyıcıların izlenmesi ve uygun zamanlarda yapılan gebelik muayeneleri ile gebeliklerin araştırılması yerinde olur. Vericiler ise 2-3 ay ara ile birkaç defa üstüste süper-ovulasyon ve toplama için kullanılabilirler.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. ALAÇAM, E., Ç. KILIÇOĞLU, H. İZGÜR (1983): İneklerde Prostaglandinlerle çalışmalar. I. Östrüs Sinkronizasyonu. U.Ü. Veteriner Fak. Derg. 3.1.
2. HAFEZ, E.S.E. (Editor) (1980): Reproduction in Farm Animals, 4th Ed. Lea, Febiger, Philadelphia.
3. HAHN, D.H. (1982): Personal Communication. Hannover, Germany.
4. KILIÇOĞLU, Ç., E. ALAÇAM (1983): Veteriner Doğum Bilgisi ve Üreme Organlarının Hastalıkları. Oğun Kardeşler Matbaası, Ankara.
5. MORROW, D.A. (Editor) (1980): Current Therapy in Veterinary Theriogenology, W.B. Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto.