

SİĞİR EMBRİYOSUNUN DONDURULMASI ve TRANSFERİ * **(Freezing and Transferring on Bovine Embryos)**

Hüseyin SUNGUR**

Nafiz YURDAYDIN***

SUMMARY

In this study, the result of freezing of cattle embryos and reproductivity obtained by embryo transfer in Turkey were evaluated. The material of the study consisted of Brown Swiss and Black-White 5 cows of 5 - 6 years as donors and 14 heifers of 2 - 4 years as recipients from Konya and Lalahan Animal Livestock Research Institutes.

Superovulation and synchronisation in the research was induced by intra-muscular administration of 2500 I.U. PMSG to donors on the 10 th day of estrus cycle and 25 mg dinoprost tromethamine administration to both donors and recipients 48 hours after PMSG administration. Embryos were obtained by using Dulbecco Phosphate Buffer Saline (M-PBS) and foley catheters having two ways by recto-vaginal route. 1.5 M glicerol as freezing solution and 0.25 ml straws were used for freezing.

Transfer to recipients were carried out on the 6 - 7 th day of cycle bay recto-vaginal route. Of 5 recipient cattle, one did not respond to super ovulation and 17 embryos transferable for transfer out of 24 ova/embryos were frozen.

Average number of ova per donor and transferable embryos were found (24/4) 6.0 and (17/4) 4.25 respectively.

Gestation of recipients were determined by detecting plasma progesteron levels by RIA method on the 21 st of cycle and by recto-vaginal exploration on the 50 th day. According to the 21 st day RIA data from 14 embryos trasfered, gestation rate was found (14/6) 42.85 % and to the 50 th day rectal palpation findings it was found (14/4) 28.57 %.

* :Doç. Dr. N. Yurdaydın' ın danışmanlığında yürütölen Doktora çalışmasından özetlenmiştir.

** :Dr. Vet. Hek. TAGEM Gen. Md.lüğü.

*** :Doç. Dr. A. Ü. Vet. Fak. Sun'î Tohumlama ve Reprod. Ana Billm Dalı.

The results obtained suggested that there are some factors effecting the efficiency of embryo transfer and that gestation rate can be increased by acquiring experience in transfer of fresh or frozen embryos and by implementing a program based on assessing progesteron levels in milk or plasma in superovulation or synchronisation treatment.

ÖZET

Bu çalışmada sığır embriyolarının ülkemiz koşullarında dondurulması ve transferlerinden elde edilecek döl verimi sonuçlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırma materyalini Konya ve Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsüne ait 5 - 6 yaşlı 3 Esmer ve 2 Siyah Alaca verici inek ile alıcı olarak kullanılan 2 - 4 yaşlı 14 Esmer dişe oluşturmuştur.

Araştırmada süperovulasyon ve sinkronizasyon, seksüel siklusun 10. gününde İ.M. olarak enjekte edilen 2500 I.U. PMSG ve bu uygulamadan 48 saat sonra hem alıcı hemde vericilere uygulanan 25 mg dinoprost tromethamine ile sağlanmıştır.

Embrioların elde edilmesi rekto-vaginal yolla, 2 yollu foley kateteri yardımıyla ve Dulbecco fosfat buffer saline (M-PBS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dondurma solusyonu olarak 1.5 M gliserol ve 0.25 ml'lik payetler kullanıldı.

Alıcılara nakil ise sikluslarının 6 - 7. gününde yine rekto vaginal yöntemle gerçekleştirildi. Çalışmada verici olarak kullanılan 3'ü Esmer 5 inekten, birisi süperovulasyona cevap vermemiş, 4 ineğin uterus yıkaması sonucu elde edilen toplam 24 ovum/embryo'dan transfer edilebilir bulunan 17 embriyo dondurulmuştur. Verici başına elde edilen ortalama ovum oranı (24/4) 6.0, transfer edilebilir embriyo oranı ise (17/4) 4.25 olarak belirlenmiştir.

Alıcıların gebelikleri sikluslarının 21. gününde Radio İmmuna Assay (RIA) yöntemiyle kanda progesteron tayini ve 50. günde rektal palpasyon uygulanarak tespit edilmiştir. Nakli gerçekleştirilen 14 embriyodan 21. gün RIA bulgularına göre (14/6) % 42.85, 50. gün rektal muayene bulgularına göre (14/4) % 28.57 oranında gebelik sağlanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, embriyo transferinin başarısını etkileyen bir çok faktörün bulunduğu, gerek taze, gerekse dondurulmuş embriyo nakilleri ile ilgili çeşitli işlemlerde deneyim kazanılarak ve süperovulasyon ve sinkronizasyon tedavilerinde plasma veya süt progesteron seviyelerini esas alan bir program uygulaması ile gebelik oranlarının artırılabilceği sonucuna varılmıştır.

GİRİŞ

İnsanoğlu, kimi hayvanları evcilleştirdiği günden beri onun üremesini de kontrol etmek arzusunda olmuştur. Bu nedenle yavrular ana ve babalarına benzer düşüncesiyle en iyi erkekleri, en iyi dişilerle çiftleştirerek ve sürüdeki verimi düşük olanları ayıklayarak hayvan ıslahını bir ölçüde yapagelmiştir.

Suni tohumlamayı 1780' de bilimsel anlamda ilk gerçekleştiren Lazzaro Spallanzani ve Walter Heape' in 1890' daki embrio transferi denemelerine hep bu arzunun bir uzantısı olarak bakmak olasıdır. Öte yandan, 1969 yılında Pawson ve arkadaşlarının sığırlarda embrio transferini, 1973 yılında Wilmunt ve Rawson' un sığır embriosunun dondurulmasını başarı ile gerçekleştirmeleri ise, konunun ticari boyutunu geliştirmiştir. Embrio transferinin bilinen avantajları yanında süperovulasyon tekniği ile birlikte kullanılması ve bunun geniş bir varyasyon göstermesi de önemli bir sorun olmaya devam etmektedir.

Elde edilecek ovum veya embriyo sayısını önceden kestirmek mümkün değildir. Kimi ineklerde süperovulasyon meydana gelmeyeceği gibi, kimilerinde de çok sayıda ovum oluşabilir. Aynı ineğin değişik zamanlarda süperovulasyona vereceği cevapta farklı olabilmektedir. Bütün bunlar bir verici için kaç alıcının sinkronize edilmesi gerektiğini zorlaştırmakta, zaman zamanda embrio kayıplarına neden olmaktadır.

Çiftlik hayvanlarında invitro fertilizasyon, oosit maturasyonu, cinsiyet tayini, gen mühendisliği gibi araştırma konularında süper ovulasyon ve embrio transferi önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu bakımdan gerek yukarıda sayılan yararları, gerekse gen kaynaklarının muhafazasında, avantajlı bir yöntem olması açısından embriyonun dondurulması tekniğinin geliştirilmesinde ve yaygın olarak uygulanabilmesinde sayısız yararlar bulunmaktadır.

Bu çalışmada, verici ineklerden elde edilecek embrioların dondurularak, uzun süre muhafaza edilip, tıpkı dondurulmuş spermada olduğu gibi, nakillerden elde edilen döl verimi sonuçlarını ortaya koymak ve tekniğin ülkemiz koşullarında da uygulanabilirliğini ve ekonomik olup olmadığını belirtmek amacı güdülmüştür.

Günümüzde embriyo transferi bir çok türde, değişik amaçlarla uygulanmaktadır. Laboratuvar hayvanlarında teknik, daha çok üreme biyolojisine dönük araştırmalar için kullanılmaktadır. Bu konudaki ilk çalışmalar oosit maturasyonu, fertilizasyon ve embriyonun erken gelişim dönemleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Daha sonraki çalışmalar ise embrio uterus ilişkisine yöneliktir. En son çalışmalar ise daha çok memelilerin embriyolojisi üzerinedir. İnsanlarda ise, teknik fertilité bozukluklarının üstesinden gelmek için artan oranda kullanılmaktadır.

Çiftlik hayvanlarında ise embriyo nakilleri sadece araştırma için değil, verimi düşük ırkları ıslah, üremeyi arttırmak ve ticari amaçlı olarak da kullanılmaktadır (51).

1969' da Pawson ve ark.'larının embriyo transferi yönteminin uygulanabilirliğini göstermelerinden sonra çok çeşitli deneyler yapılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (1, 53).

Avrupa Embriyo Transferi birliğinin 1987 yılı kayıtlarına göre, Batı Avrupa Devletlerinde 35 bin, ABD' de 125 bin ve diğer ülkelerde 20 bin olmak üzere toplam 180 bin embriyo transferinin gerçekleştirildiği kaydedilmektedir (1).

1990 yılında, 24 Avrupa ülkesinde 32.737 vericiden 238.236 embriyo elde edildiği, bunlardan transfer edilebilir bulunan 169.464 embriyodan (verici ortalaması: 5.18) 87.416 tanesinin taze 76.396' sının ise dondurularak transfer edildiği bildirilmektedir (59).

1991 yılında, Almanya' da 3946 verici üzerinde 4170 uterus yıkamasının gerçekleştirildiği, elde edilen 37.948 embriyonun 22.372 tanesinin transfer edilebilir olduğu ve transferi gerçekleştirilen 12.916 taze, 8289 donmuş embriyodan sırasıyla % 59.9 ve % 51 gebelik elde edildiği bildirilmektedir (56).

Türkiye' de bu konuda ilk çalışma Kılıçoğlu ve ark.' ları (30) tarafından koyunlarda yapılmış ve bu yolla iki yavru elde edilmiştir. Öte yandan İleri (27), sığırlarda yaptığı bir çalışmada 59 transfer edilebilir embriyo kazandığını, 49 tanesinin transferini gerçekleştirerek, % 57.1 oranında gebelik elde ettiğini kaydetmektedir. Ülkemizde bu konuda diğer bir çalışmada ise Sungur ve arkadaşları (54) dondurulmuş olarak ithal edilen Brangus embriyolarını Esmir düvelere naklederek % 32.81 oranında gebelik elde etmişlerdir.

Embriyo programlarında yeter sayıda transfer edilebilir embriyo elde etmek üzerinde önemle durulan bir husustur. Bu konuda iki yaklaşım söz konusu olup, ilki hormon tedavisi ile süperovulasyon oluşturmak diğeri ise direkt olarak ovaryumlardan alınan oositlerin maturasyonunun sağlanması ve in-vitro fertilizasyon yöntemidir. Süperovulasyonun temel amacı verici inek başına ovum veya embriyo sayısını arttırmaktır. Bu süperovulasyonun başarısının ölçüsüdür. İneklerde süperovulasyon denemesi ilk defa Casida ve ark.'ları tarafından uygulanmış, daha sonra bunu bir çok araştırmacı takip etmiştir (2, 13, 18).

Öte yandan ovulasyon sonucu bir ovum oluşur. Bu olayda FSH' nin etkisi yıllardan beri bilinmektedir. Genellikle süperovulasyon için hormon tedavisine istenilen kızgınlık gününden 4 - 9 gün önce başlanır. Süperovulasyon amacıyla 35 - 50 mg FSH yada 2500-3000 I.U. PMSG enjekte edilebilir. Bu uygulamadan 48 saat sonra prostaglandin F2 alfa yada analoglarından birisiyle östrus başlatılabilir. PMSG' nin tek dozda verilmesi yeterli olurken, yarılanma süresi çok kısa olan FSH' nin günde iki defa olmak üzere 4 - 5 gün süreyle verilmesi önerilmektedir (2, 9, 13).

Embriyo transferi süresince başarıyı belirleyen önemli faktörlerden biriside embrionun değerlendirilmesidir. Başarılı bir embriyo transferi için öncelikle yapılması gereken doğru bir morfolojik değerlendirmedir. 9. güne kadar embriyo 0.16 mm çapında zona pellucida ile çevrili bir hücre kitlesinden ibarettir. Zona pellucida ile embriyonik hücre kitlesi arasındaki boşluğa perivitellin alan denir. Başlangıçta embriyo blastomerlerden ibaret olup geometrik olarak çoğalarak 1, 2, 4, 8, 16 hücre sayısına ulaşır. Bu safhadan sonra hücre bölünmesi eş zamanlı değildir ve blastomerleri ayırt etmek güçleşir. Embriyo 40 - 60 hücreye ulaştığında yoğunlaşmaya başlar ve blastomerler simetrik yapısını kaybeder. Bu safhada embriyo "kompakt morula" diye adlandırılır. Geç morula safhasından sonra blastomerler farklılaşmaya başlar ve "trofoblast ve inner cell mass" denilen iki tip hücre kolayca ayırt edilebilir. Blastocyst; blastosel adı verilen boşluğun etrafında oluşan trofoblast plaklarıdır. Blastocyst safhasına genellikle 8. günden sonra rastlanır. 8 - 10. günlerde blastocyst zonanadan kurtulacağı için embrionun maniplasyonlar esnasında hasar görme riski artar. Uterustan elde edilen yıkama sıvısı içinde embriyo şu özellikleri ile ayırt edilir vaziyettedir (2, 51).

1. Yan şeffaf yapısı ile zona pellucida bir sınır taşı görüntüsü ile diğer döküntülerden farklıdır.
2. Embriyonun rengi koyu kehribardır.
3. Embriyo küre şeklinde petri kutusunun tabanında yuvarlanır vaziyettedir.

Embriyo değerlendirilmesinde; boyama testi, enzim aktivitesinin ölçülmesi, glikoz tüketimi, morfolojik değerlendirme gibi yöntemlerin kullanıldığı bildirilmektedir (60). Bu yöntemlerin çoğu kompleks ekipmanları ve uzun süre kültüre etmeyi gerektirdiğinden çiftlik şartlarında morfolojik değerlendirme yönteminin tercih edildiği ve bu değerlendirmede; şekil renk, hücre kitlesinin görünümü, perivitellin alanının genişliği, dejenere hücre sayısı gibi kriterlerin esas alındığı bildirilmektedir (51). Sığır

embriosunun çapı zona pellucida ile birlikte 150 -190 mikron olarak ölçülmüştür. Bu büyüklük tek hücre safhasından blastocyst safhasına kadar değişmeden kalmaktadır. Morfolojik tanımlama morula (beş gün yaş), kompakt morula (altı gün yaş), erken blastocyst (dokuz gün yaş) şeklinde yapılmakta, mükemmel, iyi, orta, zayıf, dejenere şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Embriyo transferinin en önemli ve zor safhalardan birisinde embrioların kimliğinin belirlenmesi (identification) ve sınıflandırılması (classification) aşamasıdır. Çünkü fertilize olmamış yada dejenere bir embriyonun transfer edilmesi gebelik sağlamayacağı gibi maliyetinde yükselmesine sebep olacaktır (3).

Canlı bir hücrenin dondurulması hücre ile onu çevreleyen ortam arasındaki ısı ve su transporotunu içine alan fiziko-kimyasal olaylar kompleksinden ibarettir (4, 7, 16, 17). Son yıllarda farklı hücrelerin, çok kompleks dokuların hatta organların kryopreservasyonu geliştirilen, memeli gametlerinin dondurulmasında da başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (40).

Değişik araştırmacılar (15, 16, 44, 47) embrio kryoprezervasyonu üzerindeki çalışmaların iki önemli gerekçe ile sürdürüldüğünü belirtmektedir.

1. Bütün embrioların yaşayabileceği basit ve çok etkili bir muhafaza yöntemin bulunması,

2. Embriyo' ya zarar veren mekanizmaların ve embriyo kryobiolojisinin anlaşılması.

Embriyonun kazanılması, dondurulması ve çözündürülmesi aşamalarında, fosfat buffer saline (PBS) temel solüsyon olarak kullanılmaktadır. Hayvansal protein kaynağı olarak BSA bovine serum albumin yanında Polyvin alchol' ünde (PVA) kullanılabilirliği bildirilmektedir (40).

Suni tohumlama ve Embriyo Transferini modern biyolojinin ilgi çekici konuları olarak tarif eden Schneider (48) embriyonun dondurulmasının faydaları şöyle sıralamaktadır;

1. Alıcıların sinkronizasyonuna gerek olmaksızın embriyo transferine imkan verir.

2. Başarılı sürü idaresi ve besin kaynaklarının optimum kullanımı açısından doğum mevsimi ayarlanabilir.

3. Genetik materyalin bir yerden bir yere kolay ve hastalık riski olmaksızın taşınmasına imkan verir.

4. Progeny ve performans testinde kolaylık sağlar.

5. Varlığı tehlikeye düşen ırkların saklanmasını mümkün kılar.

Dondurulmuş embriyo nakillerinde başarıyı; etkiliyen embriyonun kalitesi, taşıyıcıların döl sağlığı, seksüel sinkronizasyonun uygunluğu, nakil için zamanlama, uygulayıcının deneyimi gibi faktörlerin önemli ölçüde etkilediği bildirilmektedir (4, 7, 17, 33, 57).

Kennedy ve ark. (29) ve Niemann ve Smidt (40), yaptıkları çalışmalarda 7. günde erken gelişme aşamalarındaki (geç morula, erken blastosist, blastosist) embriyoların daha fazla yaşama şanslarının olduğunu ve bunlardan daha yüksek gebelik elde ettiklerini bildirmektedir.

Embriyonun kalitesi yönünden yapılan çalışmalarda ise; Shea, kötü kaliteli embriyoların yaşama şansının az olduğunu ve donma - çözülmeye iyi kaliteli olanlar kadar dayanamadığını ileri sürmektedirler.

Bazı araştırmacılar (41, 45, 48, 60), yüksek oranda gebelik için iyi kaliteli embriyoların dondurulmasını ve alıcı - verici arasında tam bir sinkronizasyon sağlanmasını önermektedirler.

Kennedy ve ark. (29) embriyoları mükemmel, iyi ve orta olarak tasnif etmişler ve invitro yaşama şansını sırasıyla % 91, 50 ve 29 olarak belirlemişlerdir. Wright ve Cinder (60) ise mükemmel kalitedeki embriyoların gelişme aşamasına bağlı olarak gebelik oranları yönünden bir farklılık göstermediklerini bildirmektedir.

Hahn ve Schneider (22) cerrahi ve servikal yolla yaptığı taze embriyo nakillerinde % 58 ve % 33 oranında gebelik sağlamıştır.

Dondurulmuş inek embriyoları ile yapılan saha çalışmalarında, Chupin ve ark. (10) % 41.4, Eisden ve ark. (14) % 50, Seidel ve ark. (50) % 34 oranında gebelik elde ettiklerini bildirmektedirler.

Lehn-Jensen (31) dondurulmuş 16 embriyonun ipsilateral kornuya nakillerinden % 44 oranında gebelik sağlandığını bildirmektedirler.

Tek aşamalı, rekto-vaginal yöntemle donmuş çözdürülmüş embriyo transferi Leibo ve ark. ile Renard ve ark. tarafından 1982 yılında geliştirilmiştir. Bu metodun temeli 1,5 M gliserol ile sukroz solusyonunun aynı payette yer alması ve çözdürülmeden sonra, rehidrasyonun aynı payet içinde gerçekleştirilerek transferin yapılabilmesidir (40).

Bu yöntemle Massip ve Zwalman (36) tarafından yapılan çalışmada, 6 vericiden elde edilen 6,5-8 günlük embriyolar iki gruba ayrılarak, gruplardan birisi 1.36 M gliserol PBS diğeri ise 1.36 M gliserol+0.25 M sukroz/PBS içinde mini payetlere konularak direkt -7 °C' ye kadar soğutulmuş, birinci gruptaki 13 embriyodan 5 (% 38.5) gebelik, ikinci gruptaki 10 embriyodan 5 (% 50) gebelik elde edildiği bildirilmektedir.

Schneider ve ark. (45) dondurulmuş embriyo nakillerinde taşıyıcılardaki sinkronizasyon farklılığını + 12 saati geçmemesi gerektiğini bildirmektedir.

Cherly (9) yaptığı bir çalışmada; 7, 7.5, 8 ve 9 günlük taze embriyolardan 69 (35/51), % 65 (115/178) % 67 (149/224), % 67 (4/6) dondurulmuş embriyolardan % 61 (17/28) % 52 (52/100), % 60 (132/221), % 50 (3/6) oranlarında gebelik elde ettiğini bildirmektedir.

Bousequet (6) erken blastosist, blastosist ve expanded blastosist safhasındaki embriyoları ovidukt hücreleri ile kültüre ettikten sonra gerçekleştirdikleri 15 taze embriyo transferinden 2 (% 40) gebelik, 10 dondurulmuş embriyodan ise 5 (% 50) gebelik elde ettiğini bildirmektedir.

Campo ve Akesson (8) ise yaptığı dondurulmuş embriyo nakillerinde gebelik oranını % 20 (2/10) olarak belirlemiştir.

Tervit (55) çeşitli araştırmacılara dayanarak dondurulmuş embriyo ile yapılan nakillerde, % 3 ile % 60 arasında değişen oranlarda gebelik elde edilebileceğini ve çözmeden sonra embriyonun kültüre edilmesinin gebelik oranını düşürdüğünü ileri sürmektedir. Kendisinin yaptığı bir çalışmada ise donmuş embriyo naklinden % 25 oranında gebelik elde ettiğini bildirmektedir.

Michaelis ve ark. (37) 1981-1986 yılları arasında yaptığı 5 ayrı çalışmada; toplam 470 dondurulmuş embriyonun nakillerinden sırasıyla % 46.4, % 45.5, % 40.8, % 45.0, 44.7 oranında gebelik sağlamıştır.

Neiman (39), 1.4 M gliserol içinde, -7 °C'ye kadar 1 °C /dk, -7 ile -28 °C ile 35 °C arasında ise 0.1/dk soğutarak dondurduğu emriyo-

ların çözdürme sonrasında morfolojik olarak % 95 'ni normal bulduğunu ve % 51 oranında gebelik elde ettiğini bildirmektedir.

Hubbert ve Hopkins (25) operatif yolla yada servikal yoldan uterusun yıkanmasıyla elde edilen embriyoların dondurularak, uzun süreler saklanabildiklerini, eldeki embriyoların uygun taşıyıcı bulunana kadar korunabildiklerini, etçi sürülerde aşım sezonu dışında toplanan embriyoların aşım sezonunda kullanılabilirdiğini bildirmekte ancak yöntemin taze nakillere pahalıya mal olması ve donma-çözme sırasında embriyoların hasara uğraması ile dezavantajlarında bulunduğunu eklemektedirler.

Yapılan çeşitli araştırmaların sonuçlarına göre, taze embriyo nakilleri ile % 60-80 oranında gebelik elde edilirken, dondurulmuş embriyo nakilleri ile alınan sonuçlar % 35-50 arasında değişmektedir (17, 20). Greve ve Jensen (20) embrio nakillerinden sonra HCG hormonu enjekte edilen ineklerde aksesör korpus luteumların şekillendiğini ve kan progesteron hormonu düzeylerinin diğerlerine kıyasla yüksek olduğunu, böylece gebelik şansının artırılabilceğini ileri sürmektedir. Foot (15) 666 Holştayn ırkı inekte yaptığı embriyo transferi denemelerinde verici başına ortalama 10.3 ovum, 6.7 embriyo ve % 68 oranında gebelik elde edilirken % 14 vericide hiç embriyo bulunamadığını ve arka arkaya yapılan süperovulasyon denemelerinin embriyo sayısı üzerine olumsuz etki ettiğini bildirmektedir.

Struthers ve Marchall (52) iki ayrı tohumlama sezonunda 26 ve 62 baş süperovulasyon oluşturulmuş inekte ortalama korpus luteum sayısını sırasıyla 9.5 ve 12.3, embrio sayısını 7.5 ve 9.5, embriyo kazanma oranını %76.5 ve %77.2 gebelik oranlarını ise 1. ve 2. grupta % 29.0 ve % 54.8 olarak belirlemiştir. Segerson (49) 16 verici üzerinde yaptığı bir çalışmada ortalama korpus luteum ve embrio sayısı ile gebelik oranını sırasıyla 12.1, 7.7 ve % 40.8 olarak belirlemiştir.

Church ve Shea (11) 37 vericiden oluşan 2 grup hayvanda seksüel siklusun 10. ve 16. günlerinde 2000 IU PMSG enjeksiyonu ile oluşturdukları süperovulasyon sonucunda ortalama korpus luteum 13.4, 7.2, embriyo kazanma oranı % 81.5 ve % 75.2 ve gebelik oranının verici başına 3.76, 3.31 olarak belirlemiştir.

Niemann ve Smidt (40) kendi araştırma sonuçlarına bağlı olarak tek aşamalı veya artan oranlarda kryoprotektan ilavesinin, embriyonun yaşama gücüne etkisinin aynı olduğunu bildirmektedir. Bu da tek aşamalı kryoprotektan ilavesi yöntemini saha uygulamalarında üstün kılmakta embriyonun hiperosmotik çevreye, osmotik olarak tepki göstermesi nedeniyle, büzüşüp-

küçülmesi daha sonrada tekrar eski hacmine dönmesi bir canlılık belirtisi olarak kaydedilmektedir.

Heyman (24) 3 grup üzerinde yaptığı çalışmalar 1. gruba 83, 2. gruba 64 embriyo 3. gruba 24-48 saat 37 °C'deki kültür vasatında bekletilmiş 45 embriyo transferlerinden 90. gün rektal palpasyon bulgularına göre gebelik oranlarını % 54.4, % 46.8 ve % 33.3 saptanmıştır. Yine aynı araştırmacı her üç grupta 21. günden 90. güne kadar embriyonik ölüm oranlarını, 1, 2, 3. grupta sırasıyla 22, 28.5 ve % 46.4 olarak bildirmektedir.

Wilmot ve Rawson'un ilk çalışmalarında dimethyl sulfoxide (DMSO)'i kryoprotektan olarak kullanmış olmalarına karşın gliserolün 1-1.5 M konsantrasyonlarının daha iyi sonuç verdiği araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (5, 10, 27, 37).

Leibo (33) 1981-83 yılları arasında değişik mevsimlerde, değişik saha şartlarına 12 farklı grupta 493 dondurulmuş embriyo ile gerçekleştirdiği transferlerden % 6 (4/69) ile % 55 (6/11) arasında değişen oranlarda gebelik elde etmiştir. Öte yandan kendisinin yaptığı 3 farklı çalışmada toplam 1259 donmuş embriyodan % 24.9, % 29.7 , % 23.1 oranında gebelik elde ettiğini bildirmektedir.

4. MATELYAL ve METOT

4.1. MATERYAL

Bu çalışmada, verici olarak Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsüne ait 3 adet 6 yaşlı esmer ve Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsüne ait 2 tane 5-6 yaşlı Siyah Alaca inek ile alıcı olarak da Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsüne ait 2-4 yaşlı 14 Siyah Alaca inek kullanılmıştır.

Alıcı ve vericilerin seçiminde, kurum kayıtları incelenerek östrus sikluslarının düzenli olmasına, hastalık taşımamasına ve doğum aralığının en az 60 gün olmasına dikkat edilmiştir.

Deneme hayvanlarına yetiştirilmenin olağan bakım ve beslemesi dışında ayrı bir özel uygulama yapılmadı.

4.2.METOT

4.2.1. Süperovulasyon ve sinkronizasyon:

Verici ve alıcı olarak seçilen ineklere öncelikle rektal

muayene uygulanarak genital organlarının durumu ve ovaryumlarının siklik işlevleri kontrol edildi. Vericilere siklusun 10. gününde 2500 IU PMSG (gebe kısrak serumu gonadotropini), bu uygulamadan 48 saat sonra 25 mg dinoprost tromethamine (dinolytic, Eczacıbaşı) İ.M. enjekte edildi. Verici hayvanlar prostaglandin enjeksiyonundan 24 saat sonra sabah-akşam izlenerek kızgınlıkları tespit edildi ve 12 saat ara ile üç kez ikişer doz sperma ile tohumlandı.

Taşıyıcıların seksüel sikluslarının sinkronizasyonu ise 11 gün ara ile iki defa 25 mg dinoprost tromethamine İ.M. olarak enjekte edilerek sağlandı. İkinci enjeksiyon sonrasında hayvanlar 24. saatten başlamak üzere sabah-akşam izlenerek kızgınlıkları belirlendi. Östrusları izleyen 7. günde taşıyıcılara rektal muayene uygulanarak, korpus luteumun şekillendiği ovaryumlar belirlendi. Korpus luteumlar büyüklerine ve derinliklerine göre belirgin olanlar KL1, küçük ve zor hissedilenler KL2 olarak değerlendirildi.

4.2.2- EDİbriolann Elde Edilmesi:

Uterusun yıkanması rekto-vaginal yolla, 2 yollu foley kateteri yardımıyla aşağıda bileşimi verilen steril Dulbecco fosfat buffer saline (M-PBS) kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 1- Dulbecco' nun modifiye phosphate buffer saline (M-PBS) yıkama sıvısı.

Kimyasal Madde	Mg/lt
CaCl ₂	0.10
KCl ₃	0.20
KH ₂ PO ₄	0.20
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.10
NaCl ₂	8.00
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	2.16
D-glucose	1.00
Sodium Pyruvate	0.36
Peniciline	10.000 IU
Streptomycine	10.000 IU

Verici inekler tespit edilerek perineal bölge ve vulva civarı önce iodin, sonra alkol ile dezenfekte edildi ve 5 cc novacaine ile epidural anestezi sağlandı. Uterusu yıkamak için iki yollu foley

kateteri rekto-vaginal yöntemlerle doğum kanalına, kornuların ikinci üçte birine kadar ilerletilip, kateterin ucundaki balona 15-20 ml hava verilerek kataterin orada fikse olması sağlandı. Daha sonra 50 ml' lik şırınga ile yıkama sıvısı uterusu verilip geri alınmak suretiyle her kornu uterusunun 4-5 kez yıkanması gerçekleştirildi. Toplama kabına alınan yıkama sıvısı (Yaklaşık 500-600 ml) embriyoların geçmesine mani bir filtreden 50 ml kalıncaya kadar filtre edilerek, embriyoları taşıyan bu sıvı 9 cm çapındaki petri kutularına konulup, steromikroskop altında 10-15 büyütmede arandı.

4.2.3- Embriyoların Evaluasyonu ve Dondurulması:

Arama işleminden sonra embriyolar pastör pipeti yardımıyla yıkama sıvısından alınarak aşağıda bileşimi verilen kültür vasatına alınarak 40-50 büyütme ile morfolojik yönden Wright ve Cinder (60)' ın belirttiği kriterler doğrultusunda değerlendirilerek embrioların gelişme aşamasına göre (identifikasyon), morula, erken blastosist, blastosist, ekspanded blastosist, fertilize olmamış ovum ve dejenere embriyo şeklinde yapıldı. İkinci sınıflandırmada ise embriyonun kalitesi gözönünde tutuldu.

Embriyoların Değerlendirildiği Kültür Vasatı:

100 ml	M-PBS
0.4 gr	BSA (bovine serum albumin)
1.0 ml	Antibiotik

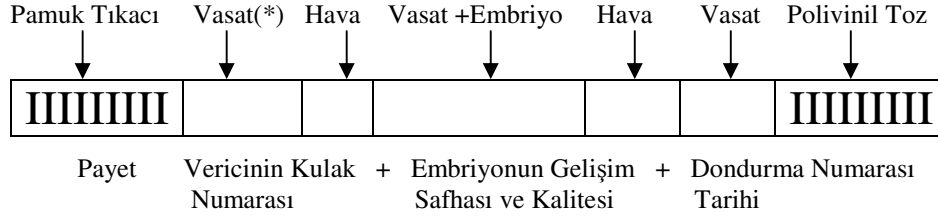
Bu arada bileşimi aşağıda verilen 1.5 M gliserol dondurma vasatı, daha sonrada bu vasat kullanılarak, konsantrasyonu tedricen artan diğer solusyonlar (Sol. E, Sol. D, Sol. C, Sol. B) hazırlandı. Daha sonra transfer edilebilir bulunan her safhadaki, birinci, ikinci kalitedeki embriyolar hazırlanan bu solusyonlarda beşer dakika tutularak dehidrasyon işlemi tamamlandı.

Dondurma Vasatı:

- Sol A: 1.5 M Gliserol : 2.74 ml + 25 ml M-PBS + % 0.4 BSA
1. Aşama: Sol. E (0.25 ml gliserol) : 1 ml sol A + 5 ml M-PBS + % 0.4 BSA
 2. Aşama: Sol. D (0.50 ml gliserol) : 2 ml sol A + 1 ml M-PBS + % 0.4 BSA
 3. Aşama: Sol. C (0.75 ml gliserol) : 3 ml sol A + 3 ml M-PBS + % 0.4 BSA
 4. Aşama: Sol. B (1.25 ml gliserol) : 5 ml sol A + 1 ml M-PBS + % 0.4 BSA
 5. Aşama: Sol. A (1.5 M gliserol)

Embriyolar dehidrasyon işleminden sonra şekilde görüldüğü üzere payetlere çekildi.

Şekil 1- Embriyoların Payetlere Çekilmesi



*: 1.5 M Gliserol (M-PBS + % 0.4 BSA)

Payetlerin üzerine vericinin kulak numarası ile embriyonun gelişme aşaması ve kalitesi yazıldı (Örn: 14-87, MG1). Daha sonra dondurma cihazı aşağıdaki grafikte gösterilen soğutma programına ayarlanarak dondurma işlemi gerçekleştirildi. Isının -35 °C' ye ulaşmasından sonra 5-10 dakika beklenerek payetler -196 °C' deki sıvı azotda muhafazaya alındı.

Embriyo Dondurma Programı:

Başlama Isısı (°C)	Oran °C/dk	Hedeflenen Isı (°C)	Bekleme Süresi (dk)
20	2.0	-7.0	10 (Seeding)
	0.3	-30.0	0
	0.1	-35.0	5

4.2.4- Dondurulmuş Embriyoların Transfere Hazırlanması ve Transferi:

Sıvı azot da payetler içinde saklanan embriyoların çözülmesi için dondurma sırasında uygulanan yöntem bu defa son aşamadan ilk aşamaya doğru tekrarlandı. Bu amaçla payetler öncelikle 30 °C' lik su banyosunda 15 saniye tutuldular. Daha sonra uç kısımları kesilerek içlerindeki embriyolar, steril bir tel yardımıyla dip kısımlarındaki pamuktan itilerek % 10' luk gliserol solüsyonuna aktarıldılar. Bunu takibinde beşer dakikalık süreyle aşağıdaki solüsyonlarda sırasıyla tutularak rehidrasyon işlemi tamamlandı. Rehidrasyon işleminde kullanılan solüsyonlar, stok A, B, C mediumlarından yararlanılarak aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Sol A: 342 gr. Sukroz + 100 ml PBS + % 0.4 BSA = 1 M Sukroz.

Sol B: 10 ml Gliserol + 90 ml PBS + % 0.4 BSA = % 10 Gliserol (Freezing Medium).

Sol C: 100 ml PBS + % 0.4 BSA

1. Aşama: % 6.6 gliserol + 0.3 M Sukroz

2. Aşama : % 3.3 gliserol + 0.3 M Sukroz

3. Aşama: 3 M Sukroz

4. Aşama: M-PBS + % 0.4 BSA

Embrioların değişik solusyonlara aktarılması sırasında pastör pipetlerinden yararlanıldı. Rehidrasyon işlemi tamamlandıktan sonra embriyolar morfolojik yönden tekrar mikroskopta, dondurma öncesinde olduğu gibi incelenerek transfer edilebilir bulunanlar 1. kalite (G1), 2. kalite (G2), 3. kalite (G3) şeklinde değerlendirildi.

Embriyoların Transferi: Transfer edilebilir olan embriyolar 0.25 ml'lik payetlere kültür mediumu içine alınarak sinkronize edilen ve seksüel sikluslarının 6 - 7. gününde bulunan alıcılara epidural anestezi uygulandıktan sonra rekto-vaginal yöntemle, nakil gerçekleştirildi. Nakil korpus luteumun bulunduğu taraftaki kornu uteriye yapılarak hangi safhadaki ve kalitedeki embriyonun hangi derecede korpus luteum taşıyan alıcılara nakil edildiği ve sinkronizasyon farklılıkları kayıt edildi.

4.2.5- Gebelik Kontrolleri:

Araştırmada, embriyo nakledilen inek ve düvelerden siklusların 21., transferin de 16. gününde kan örnekleri alınarak RIA yöntemiyle progesteron tayini yapılarak, ayrıca 50. günde ise, rektal muayene yapılarak gebelik kontrolleri yapıldı.

5. BULGULAR

Çalışmada, verici olarak kullanılan 5 baş inekten birisi süperovulasyon tedavisine cevap vermemiş, 4 ineğin uterus yıkanması sonucu elde edilen toplam 24 embrio-ovumdan transfer edilebilir bulunan 17 tanesi ise dondurulmuştur. Verici başına elde edilen ortalama ovum oranı (24/4) 6.0, transfer edilebilir embriyo oranı ise (17/4) 4.25 olarak belirlendi. Elde edilen embriyoların morfolojik değerlendirme sonuçları Tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2- Çalışmada elde edilen embriyoların morfolojik değerlendirme sonuçları.

Embriyonun Gelişim Aşaması	N	Embriyo Kalitesi			Dondurularabilir Embriyo
		G1	G2	G3	
Morula	10	4	5	1	10
Erken Blastosist	3	1	2	-	3
Blastosit	3	0	2	1	3
Ekspanded Blastosit	1	0	1	-	1
Fertilize olmamış Or.	4	-	-	-	-
Dejenere Embriyo	3	-	-	-	-
TOPLAM	24	5	10	2	17

Tablodan da izlenebileceği gibi, embriyoların stero-mikroskopta yapılan değerlendirmesinde 10 tanesinin morula, 3 tanesinin erken blastosit, 3 tanesinin blastosit olduğu belirlenmiş, 1 tanesinin expanded blastosit, 4 tanesinin fertilize olmamış ovum ve 3 tanesinin ise dejenere embriyo olduğu belirlenmiştir. Yine aynı değerlendirmeye göre transfer edilebilir bulunan 17 embriyo dondurma işlemine tabi tutulmuştur. Embriyo ise çözme esnasında hasara uğramıştır. Embriyoların çözme sonrası yeniden değerlendirilmesinde Tablo 3'deki bulgular elde edilmiştir.

Tablo 3- Dondurulmuş embriyoların çözüm sonrası değerlendirme sonuçları.

Embriyonun Gelişim Aşaması	Embriyo Sayısı	Embriyonun Kalitesi		
		G1	G2	G3
Morula	9	4	4	1
Erken Blastosist	3	1	2	-
Blastosit	2	0	1	1
Ekspanded Blastosit	0	-	-	-
TOPLAM	14	5	7	2

Tabloda da görüldüğü gibi, çözme sonrası embriyoların yeniden yapılan değerlendirilmesinde 9 tanesinin morula, 3 tanesinin erken blastosit, 2 tanesinin blastosit evresinde ve 3 adet embriyoda ise çözme esnasında hasar görüldüğü tespit edilmiştir.

Östrus izlemesine göre belirlenen verici ve alıcılar arasındaki sinkronizasyona ilişkin veriler ise Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4- Alıcı ve vericiler arasındaki sinkronizasyon farkı.

Sinkronizasyon Farkı (+ Saat)	+24	+12	0	-12	-24	Toplam
N (ALICI)	1	3	6	4	0	14

Tabloda da görülebileceği gibi, verici-alıcı sinkronizasyon farklılığı 6 inekte sıfır, 3 inekte + 12 saat, bir inekte + 24 saat, 4 inekte ise -24 saat olarak saptanmıştır.

Bu arada embriyo nakledilen 14 inekte 21. gün RIA ve 50. gün rektal palpasyon verilerine göre sırasıyla % 42.85 ve % 28.57 oranında gebelik saptanmıştır (Tablo 5).

Tablo 5- Dondurulmuş embriyo transferinden elde edilen dölverimi sonuçları.

Embriyonun Gelişim Aşaması	21. Gün RIA Bulguları			50.Gün Rektal Palpasyon Bulguları	
	Transfer Yapılan İnek Sayısı (N)	Gebe (%)	Gebelik Oranı	Gebe (%)	Gebelik Oranı
Morula	9	4	44	2	22
Erken Blastosist	3	2	66	2	66
Blastosit	2	0	0	0	0
Genel Sonuç	14	6	42.85	4	28.57

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1- Embriyoların Elde Edilmesi.

Embriyonun derin dondurulması evcil ve laboratuvar hayvanlarında rutin hale gelmiş olmasına karşın, tekniği basitleştirmek ve etkin hale getirmek için, hala bir çok araştırma yürütülmektedir. Araştırmalar genelde kryoprotektanın kullanım şekli, soğutma ve çözme oranlarının tespiti ve kryoprotektanın embriyodan uzaklaştırılması (rehidrasyon) konularında yoğunlaşmıştır (34).

Gerek taze, gerekse dondurulmuş embriyo transferlerinde dölverimine; dondurmadan önce ve çözmeden sonra embriyonun kalitesi ve gelişim safhası, alıcı ve vericilerin sinkronizasyon farklılığı, alıcıların fertiliteleri, teknisyen becerilerine, transfe-

rin kolaylık derecesi, kullanılan kültür vasatları, embriyoların uterustan alınmasından yada çözülmesinden transfere kadar geçen süre ve makro-mikro çevre gibi bir çok faktörün etki ettiği ancak bunların kontrol altına alınmasıyla istenilen başarının sağlanabileceği ve tekniğin yaygınlaşacağı bildirilmektedir (13, 30, 57).

Bu araştırmada, süper ovulasyon oluşturulan vericilerden ortalama 6.0 ovum ve 4.25 transfer edilebilir embriyo elde edilmiştir. Bu sonuçlar Foote (15), Stuthers ve Marshall (52), Segerson ve ark (46) ile Church ve Shea'nın bulgularına göre düşük bulunmuştur. Elde edilen embriyo sayısının düşük olması, işletmedeki bakım ve beslenmenin yetersizliği yanında, uterus yıkaması sonucu embriyoların tamamının elde edilememiş olmasıyla izah edilebilir. Nitekim İleri ve Sayın (27), süperovulasyon oluşturduğu 10 inekten ortalama korpus luteum sayısını $11 + 2.58$ olarak saptamış olmasına karşın sadece 4 vericiden kayda değer sonuçlar elde edilmiştir. Öte yandan Monniaux ve ark. (38), süperovulasyon tedavisine fertlerin cevabının değişkenlik gösterdiğini belirtmektedir. Transfer edilebilir embriyo bulgularımız Hasler ve ark. (23) in Holştaynlardaki 5, 6, 7. gün verileri ve Görlach ve Hanh (19) in 343 inekte FSH, HMG, PMSG uygulamaları sonucunda elde ettiği veriler ile benzerlik gösterirken Monniaux ve ark. (38) nın, Şarole ineklerde PMSG ve FSH ile sağlanan süperovulasyon sonuçlarından oldukça düşüktür. Buradaki farklılık Hasler' inde bildirdiği gibi vericinin ırkından, laktasyon döneminden, yada mevsimden kaynaklanmış olabilir.

6.2- Dondurulmuş Embriyo Nakli İle Elde Edilen Sonuçlar:

Bu araştırmada, dondurulan 7 günlük 17 embriyodan 14 tanesi transfer edilerek, 21. gün RIA bulgularına göre % 42.85 (14/6), 50. günde yapılan rektal palpasyon verilerine göre ise % 28.57 oranında gebelik sağlanmıştır. 21. RIA ve 50. gün rektal palpasyon verileri arasındaki % 14 ' lük fark embriyonik ölümlerden veya test hatalarından ileri gelmiş olabilir. Ancak bu çalışmada embriyonik ölümlerin sebepleri araştırılmamıştır.

Heyman (24) 90 güne kadar olan kayıpları yaptığı bir çalışmada üç farklı grupta sırasıyla % 22, % 28.5 ve % 46.4 olarak belirlemiştir.

Yapılan çeşitli çalışmaların sonuçlarına göre, taze embriyo nakilleri ile gebelik oranları % 60-80 iken, dondurulmuş embriyo nakilleri ile alınan sonuçlar % 30-50 arasında değişmektedir (17, 20).

Leibo (33) değişik saha şartlarında ve değişik mevsimlerde gerçekleştirdiği donmuş embriyo transferlerinden % 6 ile % 55 arasında değişen oranlarda gebelik elde ettiğini bildirmektedir.

Yine Tervit (55), değişik araştırmacıların sonuçlarına dayanarak donmuş embriyo nakillerinden elde edilen gebeliklerin % 3 - % 60 arasında değiştiğini belirtmektedir. Bu çalışmada elde edilen % 28.57' lik gebelik bulgusu bu oranlar arasında yer almakla birlikte Michaelis ve ark. (54) 1981-86 yılları arasında yürüttüğü beş ayrı çalışmada elde ettiği bulgulardan düşük, Tervit (37) ve Leibo (33) nun bulgular ile uyumlu bulunmuştur.

Compo ve Akesson (8) nun 10 dondurulmuş embrionun naklinden elde ettiği % 20 gebelik oranına göre bizim bulgularımız yüksek bulunmuştur. Burada bizim az sayıda embriyo ile elde ettiğimiz sonuçlar etkili olmamış olabilir.

Bizim bulgularımız dondurulmuş inek embriyoları ile yapılan saha çalışmalarından Seidel ve ark. (50) ile Wright ve Cinder (60)'ın bulgularına yakınlık gösterirken Chupin ve ark. (10), Elsdén ve ark. (14)' nın bulgularından düşüktür. Yine bizim bulgularımız Cherly (12)' nin 7, 7.5, 8 ve 9 günlük taze ve dondurulmuş embriyolar ile gerçekleştirdiği transfer sonuçlarından hemen hemen yarı yarıya düşüktür.

Değişik çalışmalarda Neiman (41) % 51, Bouseget (6) % 50, Lehn-Jensen (31) % 44, Massip ve Swalman (36) % 38.5 ve % 50 oranında gebelik elde ettiklerini bildirmektedirler. Sunulan çalışmadaki sonuçlarımız bu bulgular ile de farklılık göstermektedir.

Bondurant ve ark. (5) iki ayrı teknisyen kullanarak yaptıkları embriyo nakillerinde alınan sonuçlar arasında önemli farklılıklar olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada nakiller aynı kişi tarafından yapılmakla bu faktör bir derece elimine edilmişse de deneyimin önemli rolü olduğu bir gerçektir.

Hubbert ve Hopkins (25), vericilerden kazanılan embriyoların dondurularak uzun süreler saklanabileceğini, eldeki fazla embriyoların uygun vericiler bulunana kadar korunabileceğini bildirmekte, ancak yöntemin taze nakillerden daha masraflı olması ve donma-çözülme esnasında embriyo kayıpları gibi olumsuz yönlerinde bulunduğunu eklemektedirler. Bizim çalışmamızda da bu olumsuzluklar yaşanmış 17 embriyo dondurulmuş olmasına karşın çözme esnasında 3 embriyo kaybedildiği için sadece 14 transfer gerçekleştirilebilmiştir.

Embriyo transferinin başarısını etkileyen bir çok faktörün bulunduğu ve gebelik oranının geniş bir varyasyon gösterdiğini değişik araştırmacılara (9, 12, 31, 32, 59) dayanarak belirtmiştik. Bizim çalışma sonuçlarımızın Complo ve ark. (8), Tervit (55), Leibo (32), Seidel ve ark. 550) hariç bir çok araştırmacının sonuçlarına göre düşük olmasının nedeni öncelikle teknisyen becerisine bağlanabilir. Ayrıca az sayıda embriyo ile yapılan çalışmalarda, gebelik oranındaki varyasyondan dolayı her türlü sonuç doğal karşılanmalıdır. Wright ve Cinder (60) ında belirttiği gibi embriyo transferi sürecinde başarıyı belirleyen önemli faktörlerin başında embriyonun morfolojik değerlendirmesi gelmektedir. Doğru değerlendirilmeyen embriyoların naklinin yapılması daha işin başında başarısızlıktır. Bizim ise bu konuda yeterli tecrübemizin olmayışı olumsuz bir faktör olarak değerlendirilmelidir. Yine aynı araştırmacının ifade ettiği gibi alıcı-verici arasındaki sinkronizasyon farklılığının donmuş embriyoların daha az tolere edebildiğidir. Bizim çalışmamızda östrusların belirlenmesi sadece gözleme dayanılarak yapıldığı hormon seviyeleri belirlenemediği için sinkronizasyon farklılığı asgariye indirilememiştir.

Bilinen avantajları nedeniyle embriyo nakli uygulama ve araştırmalarına olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Embriyo transferi yöntemleri gelişmiş olmasına rağmen, tekniğin pahalı ve bu konuda yetişmiş insan sayısının az oluşu nedeniyle, ülkemizde henüz yoğun olarak kullanılmamaktadır.

Sonuç olarak gerek taze, gerekse dondurulmuş embriyo ile ilgili çeşitli işlemlerde deneyim kazanılarak, iyi kalitede ve erken gelişme aşamasındaki embriyolar kullanılarak taşıyıcıların bakım, besleme ve döl sağlığı kontrol altında tutularak süperovulasyon ve sinkronizasyon tedavilerinde plasma veya sütte progesteron seviyelerini esas alan bir program uygulanması ile gebelik oranlarını arttırabileceği kanısına varılmıştır. Ancak tekniğin hayvan ıslah programlarının bir parçası olabilmesi için Araştırma Enstitülerinde ve fakültelerde sadece bu işle uğraşan ünitelerin ve ekiplerin kurulmasına ihtiyaç vardır.

LİTERATÜR LİSTESİ

1. ANONİM (1987): Avrupa Embrio Birliği 3. Bilimsel Toplanması. Lyon
2. BETTERIDGE. K. J. (1977): Techniques and result obtainable in Embryos Transfer in farm animals Canada. Dept. of Agric. Monograph: 16.
3. BETTERIDGE. K.J. (1981): An historical look at embryo transfer. J. Reprod Fert. 62. 1.
4. BIELANSKI, A., SCHNEIDER, U., PAWLYSHYN, VP. and MAPLEOFT, R. J. (1986): Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos invitro The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. Theriogenology 25: 429 -437.
5. BONDURANT, R. H., ANDERSON, G. B., BOLAND, M. P., CUPPS, P. T., HUGHES, M. A. (1982): Preliminary studies on bovine embryo survival following short-term storage at 4 °C. Theriogenology, 17, 2, 223 -230.
6. BOUSQUET, D. (1993): Pregnancies after transfer of fresh and frozen thawed blastocysts produced from 8-to 16 cell cattle embryos cultured in vitro. Medicin veterinaire du quebec, 1992, 22, 4, 155-158. Canada ABA 1719, VOL 62, 3.
7. BRITT J. H., HOLT. C. L. (1988): Endocrinological screening of embryo donors and embryo transfer recipients: A review of research with cattle. Theriogenology, 29, 1, 189 -195.
8. CAMPO, M. R. DEL., AKESSON, C. (1987): Freezing of cattle embryos using a freezer with manual freezing control. ABAVOL, 5, 6436.
9. CHERLY, F. (1988): Cryopreservation of 7 to 9 day bovine embryos Theriogenology, 29, 1, 281.
10. CHUPIN, D., FLORIN, B., PROCUERUR, R. (1984): Comparison of two methods for one - step in straw thawing and direct transfer of cattle blastocysts, Theriogenology, 17, 1, 1 -9.
11. CHURCH, R. B., SHEA, B. (1975): Some aspects of bovine embryo transfer in egg transfer in cattle in the EEC programme of coordination of research on beef production Cambridge, Abstract, 168.
12. COCERO, M. J., PROCUREUR, R., DELFUENTE. J., CHUPIN, D. (1988): Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. Theriogenology 29: 238.
13. DANIEL, M., CHUPIN, D., SAUMANDA, J. (1983): Super ovulatory responses of cattle, Theriogenology, 19, 55 -81.

14. ELDBSEN, R. P., SEIDEL, G. E., TAKEDA, T., FARRAND, G. D. (1982): Field experiments with frozen thawed bovine embryos transferred nonsurgically, *Theriogenology*, 17, 1, 1-9.
15. FOOTE, H. R. (1983): New development in embryo transfer and related technology, *Holstein science report*, 1 -9.
16. FRANKS, G. C., COLEY, S. L., BETTERBED, B. and PAGE, R. D. (1986): The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology* 26: 135.
17. GARCÍA, M. A., FAHNING, M. L., GRAHAM, E. F. (1986): In vitro culture, freezing, thawing and transfer of bovine embryos versus transfer of fresh embryos from the same collection: Preliminary results, *Theriogenology*, 26, 6, 803-81.
18. GORDAN, İ. (1983): Controlled breeding in farm animals page: 35 -43
19. GÖRLACH, A., HAHN, R. (1984): Studies on superovulatory responses in bovine embryo transfer by use of different gonadotrophic hormones combined with antigonadotrophins, 10 th Int. Congress Animal Reprod and A. I. Abstract: 226 USA. JUNE 10 -14.
20. GREVE, T. and JENSEN, H. L. (1982): The effect of HCG administration on pregnancy rate following non-surgical transfer of viable embryos. *Theriogenology*, 17, 1, 91.
21. HAFIZ, E. S. E. (1987): Reproduction in farm animals in. Preservation and cryopreservation of gametes and embryo, Page: 571 -601.
22. HAHN, J., SCHNEIDER, U. (1997): Effect of donor on egg quality and transfer results. *Annales de Biologie Animale, biochimie, biochimie*, 1979, 19, 5, 1613 -1617.
23. HASLER, J.F., Mc CAULEY, A.D., SCHERMERHORN, E.C. and FOOTE, R. H. (1983): Superovulatory responses of holstein cows, *Theriogenology*, 19, 1, 83 -97.
24. HEYMAN, H. (1984): Embryonic loss in cattle after transfer of fresh, frozen and culture embryos. Abst.: 228 10 th Int. Cong. Animal Reprod. and AI. USA.
25. HUBBERT, K. G., HOPKINS, S. M. (1984): Bovine embryo transfer-Present and Future, *Iowa State Veterinarian*, 46, 2, 113 -116.
26. INSKEEP, E. K. : Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic Animal, *J. Anim. Sci.*, 36: 1149 -1155.

27. İLERİ, K., SAYIN, T. (1986): Sığırlarda Embriyo Transferi Çalışmaları. İ. Ü. Vet. Fak. derg. 12, 1, 23 -35.
28. İLERİ. K. (1987): Sığırlarda ET çalışmaları ve elde edilen sonuçlar. Vet. He- kimlikte Biyoteknoloji paneli. İZMİR.
29. KENNEDY, L. G., BOLAND, M. P., GORDON, I. (1987): The effect of emb- ryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. Theriogenology, 19, 6, 823 -831.
30. KILIÇOĞLU. Ç., ALAÇAM, E., İZGÜR, H., TEKELİ. T. (1984): Koyunlarda embrio nakli üzerinde çalışmalar. Doğa Bilim Dergisi, 8. 3, 257 -270.
31. LEHN-JENSEN. H. (1984): Deep freezing of cattle embryos. 10 th internat Congress Anim. Reprod and A. I.
32. LEIBO. S. P. (1981): Preservation of ova and embryos by freezing p: 127 - 139. Ed: Brackett. B. G. and Others In: "New technologies in animal breed- ing" London.
33. LEIBO, S. P. (1984): A one - step method for direct nonsurgical transfer of frozen thawed bovine embryos. Theriogenology 21: 767 -785.
34. LEIBO, S. P. (1988): Cryopreservation of embryos 11 th internal. Congress Anim. reprod and A. I. Vol: 5 PP: 370, Dublin.
35. LINDER. G. M., ELLIS, D. E. (1985): Refrigeration of bovine embryos. The- riogenology 23: 203 -215.
36. MASSIP, A., ZWALMEN, V. D. (1984): Direct transfer of frozen cow emb- ryos in glycerol-sucrose Veterinary Record. 115, 327 -328.
37. MICHAELIS, U., HAHN, J., ROSELIUS, R.: Deep frozen preservation of cattle embryos. ABA, Vol : 55. No: 10.
38. MONNIAUX, D., CHUPIN, D., SAUMANDE, J. (1993): Superovulatory res- ponses of cattle. Theriogenology, 19, 1, 55 -81.
39. NIEMANN, H. (1985): Freezing on Bovine embryos. Effect of A one - step addition of 1.4 M glycerol Theriogenology 23: 369 -379.
40. NIEMAN, H., SMIDT, D. (1986): Deep freezing of cattle embryos; methods and significant factors. ABA VOL: 54, 6, 474.
41. NIEMAN. H. (1991): Cryopreservation of ova and embryos from live stock current status and research needs. Theriogenology. 35, 2, 209 -222.

42. ODEN. A. J. (1986): Embryo Transfer Manuel 4: 5 -6.
43. PRATHER. R. S., SPIRE. M. F., SCHAILER. R. R. (1987): Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos. Theriogenology 28: 195 - 205.
44. SACHER. B. (1987): Biotechnology in Animal Breeding. BERLIN
45. SCHNEIDER, U., HAHN, J., ROSELIUS, R., BAUMGARTNER, G. : Storage of frozen cattle embryos and first result of transfer. ABA 1875.
46. SCHNEIDER, H. J., CASTLEBERRY, R. S., GRIFFIN, J.L. (1980): Commercial aspects of bovine embryo transfer. Theriogenology, 13, 1, 73 -85.
47. SCHNEIDER, U., MAZUR, P. (1984): Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and it's relation to the survival of frozen-thawed embryos Theriogenology 21: 68-79.
48. SCHNEIDER, U., MAZUR. P, (1987): Implications and applications of the long term preservation of embryos by freezing p: 81 -83, Ed: Marrow, D, A, In: Current therapy in Theriogenology, London.
49. SEGERSON. E. C., REDMAN. D. R.. MURRAY, F. A. (1976): Bovine embryo transfer in Ohio. In Beef Cattle Day. 1976. Wooster. USA (Anim. Breed. Abst. 45: 1880.)
50. SEIDEL. G.E.. ELSDEN. R.P.. TAKEDA,T.. FARRAND. G.D. (1983): Field trials with cryopreserved bovine embryos. "As guated" Beier. H.M. and Linder. H.R. (Editors) Fertilization of the Human Egg in vitro. Springer-Verlag. 343 -352. Berlin.
51. SHEA, B. F. (1981): Evaluating the bovine embryo Theriogenology 15. 13-42.
52. STRUTHERS. G. A., MARSHALL, D. P. J. (1976): Egg transfer in cattle. Proceeding of the New Zealand society of animal production. 36. 58 - 66 ABA 3220.
53. SUGIE, T. (1965): Succesfull transfer of fertilized bovine egg by non - surgical techniques. J. Reprod. Fert. 10, 197 -201.
54. SUNGUR. H.. ALAÇAM. E.. TEKELİ. T. (1989): İsviçre Esmeri düvelerde dondurulmuş embrio nakli uygulamaları. L.H.A.E. Dergisi. Cilt 29, 89 -90.
55. TERVIT. H. R. (1981): Development and viability of frozen- thawed cattle embryos Theriogenology. 15 (4). 395-403.

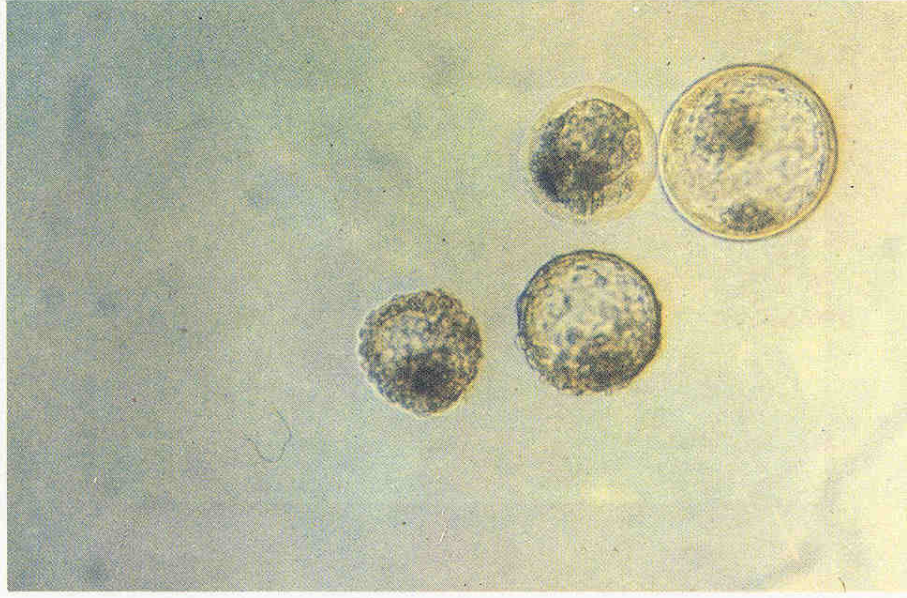
56. TIERZOCHTER, A. (1992): Slight decline in embryo transfer leichter rückgang, Tierzühler, 44, 7, 5, ABA 813. Vol 61, No: 21993.
57. TROUNSON, A. O., SHEA, B. F., OLLIS, G. W., JACOPSON, M. E. (1978): Frozen storage and transfer of Bovine embryos journal of Animal, Science, 47: 677 -681.
58. TUENER, E. K., PETERSON, G. A., DAVIS, M. E., WILSON, G. R., IRVIN, K. M., FORY, J. T. Y. (1987): Synchronization of estrus in beef cattle and heifer with fen prostalene, cloprostenol sodium and PGF2 alfa treatmeant, Therogenology, 28, 15 -23.
59. WILMUT, I., ROWSON, E. A. (1973): The succesfullow-temperature preservation of mouse and cow embryos. J. Reprod. Fert. 33: 352.
60. WRIGHT, R. W., CINDER, M. G. (1980): Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20, 407 -416.



Resim 1- Embriyo toplanması ve değerlendirilmesinde kullanılan malzemeler.



Resim 2- Uterusun Yıkanması.



Resim 3- Morula safhasındaki embrioların görünümü.



Resim 4- Blastosit safhasındaki embrioların görünümü.