T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAANEN KEÇİLERİNDE EMBRİYOLARIN VİTRİFİKASYON YÖNTEMİYLE DONDURULMASI

Ayşe Merve KÖSE

DOKTORA TEZİ

DOĞUM ve JİNEKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Tevfik TEKELİ

KONYA-2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAANEN KEÇİLERİNDE EMBRİYOLARIN VİTRİFİKASYON YÖNTEMİYLE DONDURULMASI

Ayşe Merve KÖSE

DOKTORA TEZİ

DOĞUM ve JİNEKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Tevfik TEKELİ

BAP 11202030

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11202030 proje numarası ile desteklenmiştirtir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Keçiler; kötü çevre koşullarında kolaylıkla yetiştirilebilen, adaptasyon yeteneği yüksek olan hayvanlardır. Keçi yetiştiriciliği, bitkisel üretim yapılacak arazisi bulunmayan orman içi ve kenarı yerleşim birimlerinin en önemli hayvansal geçim kaynağıdır.

Türkiye, 8 milyon baş keçi varlığına sahiptir. Sayı bakımından Avrupa ve Akdeniz ülkeleri arasında birinci, dünyada on beşinci sıradadır. Türkiye'deki keçi varlığının % 98' ini kıl keçisi oluşturur. Bunun yanında, Batı Anadolu kıyı şeridinde Saanen ve Saanen melezlerinin varlığı da gözlenmektedir. Bu sütçü tipler Türk Saanen'i olarak adlandırılmaktadır. Saanen ırkı keçiler İsviçre'nin Saanen vadisinde yetiştirilen İsviçre Alpleri merkezli bir keçi ırkıdır. Bu ırk dünyanın birçok ülkesinde, yerli keçileri süt verimi ve döl verimi bakımından geliştirmek amacıyla hızla yayılmış değerli bir ırktır. Değişik ortamlara kısa bir süre içerisinde uyum sağlayabilen ve en fazla süt üreten keçi ırklarının başında gelir. İyi koşullarda yetiştirilen bir Saanen keçisinin ortalama verimine 10 adet kıl keçisi ancak ulaşabilmektedir. Saanen keçisi 1959 yılı başında Türkiye'ye de getirilmiş, kıl keçilerinin kullanılması ile çevirme melezlemelerine başlanmıştır. Zamanla elde edilen damızlık erkek ve dişi materyaller üreticilere dağıtılarak Türkiye'de yaygınlaşması sağlanmıştır.

Son yıllarda çok sayıda memeli hayvan türü yok olmakta, türlere ait mevcut populasyonların da büyük bir kısmı yok olma tehlikesi ile karşı karşıya bulunmaktadır. Tüm dünyada hayvancılık alanında biyoteknolojik yöntemlerden yararlanarak birim hayvan başına verimin artırılabilmesi ve yüksek verimli yavrular elde edilebilmesinin yanı sıra memeli hayvanların mevcut gen kaynaklarının korunması için de sürekli gelişen ve yeni boyutlar kazanan birçok yardımcı üreme teknikleri kullanılmaktadır. Bu tekniklerin esas amacı üstün erkek ya da dişi genotipinin yaygınlaştırılmasını sağlamaktır. Günümüzde kullanılan yardımcı üreme tekniklerinin başlıcaları; suni tohumlama, embriyo transferi ve gen kaynaklarının korunmasında büyük öneme sahip olan embriyoların dondurulması (kriyoprezevasyonu) tekniğidir. Sperma, oosit ve embriyoların dondurulması sayesinde dişi ve erkek gametlerinden maksimum ölçüde faydalanarak dölveriminin artırılması sağlanabildiği gibi gen kaynaklarının saklanması ve bu sayede soyu

tükenmekte olan tür ve ırkların korunmasının sağlanabilmesi de mümkün olabilmektedir. Bu amaçla, çeşitli hayvan türlerinde ve hatta insanlarda oosit, follikül, ovaryum korteksi ve çeşitli bölünme dönemlerindeki embriyolar dondurulmakta ve hücreler uzun yıllar saklanmaktadır. Günümüzde dondurulmuş embriyoların transferi ile üstün verim özelliklerine sahip sürülerin oluşturulması, hastalıkların kontrolü ve genetik materyallerin uzun süre saklanması mümkün olabilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, üreme sezonu içinde bulunan Saanen ırkı keçilerde, süperovulasyon sonrası elde edilen embriyoların kalite değerlendirmesi, sonrasında kaliteli embriyoların vitrifikasyon yöntemiyle dondurularak çözdürülmelerini takiben viyabilitelerinin (canlılıklarının) değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu nedenle sunulan tez çalışmasında, embriyoların dondurulmasında, ümit verici sonuçlar veren ve sürekli olarak geliştirilen vitrifikasyon yöntemi ile Türkiye'de ve tüm dünyada büyük ekonomik öneme sahip olan Saanen keçisinin gen kaynağının saklanarak korunması ve bu yöntemin, pratik, uygulama süresinin kısa ve kolay uygulanabilir olması gibi avantajları nedeniyle pratikte zorluklarla karşılaşılan embriyo dondurulması tekniğine az da olsa bir katkı sağlanılması hedeflenmektedir.

Sunulan bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü (Proje No: 11202030) tarafından desteklenmiştir. Araştırma projesi 20.04.2011 Tarih ve 2011/45 sayılı karar ile Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul onayı almıştır.

Doktora eğitimim süresince teorik ve pratik bilgilerinden yararlandığım Danışmanım Prof. Dr. Tevfik TEKELİ başta olmak üzere Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ, Prof. Dr. Mehmet GÜLER, Prof. Dr. Ahmet SEMACAN, Prof. Dr. Hüseyin ERDEM ve Doç. Dr. İbrahim AYDIN'a şükranlarımı sunarım. Tez projemin gerçekleştirilmesine büyük katkı sağlayan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam sırasında ve diğer tüm konularda bana her zaman yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Enver YAZAR'a ve mesai arkadaşlarım Sakine Ülküm ÇİZMECİ ve İrfan TUR' a teşekkür ederim.

Bugüne kadar desteklerini esirgemeyen bana her zaman moral ve güç veren sevgili eşim ve meslektaşım Serkan İrfan KÖSE'ye, ayrıca bu süreçte aramıza katılan mutluluk ve neşe kaynağımız canım kızım Dilge Beren KÖSE' ye teşekkür ederim. Bu süreçte maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her konuda yanımda bulunan bana çok emeği geçen sevgili annem Aynur ULUTAŞ ve değerli babam Burhan ULUTAŞ'a; canım kardeşlerim Şenay ULUTAŞ KEÇELİ ve Burak ULUTAŞ' a; bu süreçte desteklerini esirgemeyen kayınvalidem Şadan KÖSE' ye ve kayınpederim Ali KÖSE' ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez projemin yürütülebilmesi için gerekli desteği sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... Vİ
1. GİRİŞ 1
1.1. Saanen Keçilerinin Genel Özellikleri 1
1.2. Keçilerde Seksüel Olgunluk Yaşı (Pubertas) 4
1.3. Keçilerde Seksüel Siklusun Hormonal Mekanizması ve Östrus Siklusunun Evreleri 5
1.4. Keçilerde Yardımcı Üreme Teknikleri 6
1.4.1. Keçilerde Östrus Senkronizasyonu 8
Progestagenler 9
GnRH. 11
$PGF_2\alpha$ ve analogları 11
Melatonin 12
1.4.2. Süperovulasyon 12
1.4.3.Embriyonun Gelişimi 16
1.4.4. Embriyoların Elde Edilmesi 17
Embriyoların cerrahi yöntem ile elde edilmesi 17
Cerrahi olmayan yöntem ile embriyoların elde edilmesi 19
Laparoskopik yöntem 19
Servikal yöntem 19
1.4.5.Embriyoların Değerlendirilmesi 20
1.4.6. Embriyoların Dondurularak Saklanması (Kriyoprezervasyon) 23
Kriyoprotektanlar 25
İntrasellüler kriyoprotektanlar 26
Ektrasellüler kriyoprotektanlar 26
Geleneksel yavaş dondurma (Slow-freezing) 27
Hızlı dondurma (Rapid-freezing) 28
Vitrifikasyon 28
1.4.7. Embriyoların Çözdürülmesi 31
2. GEREÇ VE YÖNTEM 35
2.1. Materyal 35
2.2. Metot 35
2.2.1. Klinik Muayene 35

2.2.2. Senkronizasyon Protokolü 35
2.2.3. Süperovulasyon Protokolü 36
2.2.4. Laparotomi Yöntemi ile Embriyoların Elde Edilmesi 36
2.2.5. Embriyoların Değerlendirilmesi 40
2.2.6. Embriyoların Dondurulması 40
2.2.7. Embriyoların Çözdürülmesi 41
2.3. İstatistik Analizler 44
3. BULGULAR 45
3.1. Östrus Senkronizasyon Bulguları 45
3.2. Süperovulasyon Bulguları 45
3.3. Embriyoların Değerlendirilme Bulguları 46
3.4. Çözdürülen Embriyoların Viyabiliteleri 50
4. TARTIŞMA 58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 66
6. ÖZET 67
7. SUMMARY 68
8. KAYNAKLAR 69
9. EKLER 74
EK. A: Etik Kurul Kararı 74
10. ÖZGEÇMİŞ 75

SİMGELER VE KISALTMALAR

CIDR	Controlled Internal Drug Release; Kontrollü İntravaginal Salınım Yapan Cihaz
Cl	Corpus luteum
CL	Corpora Lutea
DMSO	Dimetil sülfoksit
D-PBS	Dulbeccos Phosphate Buffer Saline
eCG	Equine Chorionic Gonadotropin; Kısrak Koryonik Gonadotropini
EG	Etilen Glikol
ELR	Early Luteal Regression; Erken Luteal Regresyon
ET	Embriyo Transferi
FCS	Fetal Calf Sera; Fötal Buzağı Serumu
FGA	Flugeston Asetat
FSH	Follicle Stimulating Hormone; Follikül Uyarıcı Hormon
G	Gliserol
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone; Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	Human Chorionic Gonadotropin; İnsan Koriyonik Gonadotropini
hMG	Human Menopausal Gonadotropin; İnsan Menapozal Gonadotropini
LH	Luteinizing Hormone; Luteinleştirici Hormon
MA	Megestrol Asetat
MAP	Medroksiprogesteron Asetat
MGA	Melengesterol Asetat
MOET	Multiple Ovulation and Embryo Transfer; Çoklu Ovulasyon ve Embriyo Transfer
$PGF_2\alpha$	Prostaglandin $F_2\alpha$
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin; Gebe Kısrak Serum Gonadotropini

SOF	Synthetic Oviduct Fluid; Sentetik Ovidukt Sıvısı
TCM 199	Tissue Culture Medium; Doku Kültürü Vasatı
UFO	Unfertilized Oocytes; Fertilize Olmamış Oosit
βME	Beta-Merkaptoetanol

1. GİRİŞ

Embriyoların dondurularak saklanması (Kriyoprezervasyon) işleminde kullanılan yöntemleri geleneksel yavaş dondurma (slow freezing), hızlı dondurma (rapid freezing) ve vitrifikasyon (vitrification) olarak üç grupta incelemek mümkündür. Başlangıçta embriyoların dondurulmasında kademeli soğutmayı gerektiren yavaş dondurma yöntemi kullanılmıştır. Son yıllarda ise embriyoların dondurulma işleminde hızlı dondurma yöntemlerinin yanı sıra özellikle vitrifikasyon yöntemi oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Uygulanmakta olan tüm dondurma yöntemlerindeki temel prensip; donma ve çözünme işlemleri sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek hücrelerin buz kristallerinden görecekleri zararı önlemektir. Bunu sağlamak amacıyla hücre içi sıvısının, hücre mebranından geçebilen bir başka deyişle hücre içerisine nüfuz edebilen ve hücrelere olabildiğince zararsız olabilen kriyoprotektan maddelerle yer değiştirmesi hedeflenmektedir. Vitrifikasyonda ise çeşitli kriyoprotektanlar ile yüksek donma hızları kullanılarak buz kristallerinin hiç şekillenmediği vitröz ya da camsı bir durum almaları sağlanarak hücrelerin, dokuların ve organların direkt olarak sıvı azot içerisine daldırılmasıyla dondurulmaları sağlanmaktadır.

Geleneksel bir yöntem olan yavaş ya da kademeli dondurma prosedürüyle daha başarılı sonuçların elde edilmesi, bir avantaj gibi görülmekle birlikte dondurma prosedürünün uzun sürmesi ve embriyoların dondurulması için çok pahalı ve komplike olan cihazlara gereksinim göstermesi bu yöntemin başlıca dezavantajlarını oluşturmaktadır. Vitrifikasyon yöntemi sayesinde hem zaman kaybı hem de pahalı ve donanımlı cihazlara olan gereksinim gibi dezavantajlar ortadan kalkmakta ve embriyoların kısa süre içinde ve her türlü saha koşulunda dondurulabilmelerine olanak sağlanabilmesi mümkün olabilmektedir.

1.1. Saanen Keçilerinin Genel Özellikleri

Keçiler Türkiye' de, Akdeniz bölgesi orman içi ve kenarı köylülerinin önemli geçim kaynaklarından biridir (Özer ve Doğruer 2011). Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2012 verilerine göre Türkiyedeki keçi varlığı 8 357 286 baş kadardır. Türkiye'deki keçi varlığının % 98' ini kıl keçisi oluşturmaktadır (TÜİK 2012).

Bunun yanında Batı Anadolu kıyı şeridinde Saanen ve Saanen-Kıl keçisi melezlerinin varlığı da gözlemlenmektedir. Araştırıcılar bu sütçü tipleri Türk Saanen'i olarak adlandırmaktadırlar (Ceyhan ve Karadağ 2009). Türkiyede olduğu gibi dünyada da süt keçisi denildiğinde ilk akla gelen Saanen ırkıdır. Saanen ırkı keçiler İsviçre'nin Saanen vadisinde yetiştirilmektedir. Bu ırk dünyanın hemen hemen her tarafına götürülmüş, saf ya da melezlenerek keçi ıslahında kullanılmıştır. Saanen ırkı, 1959 yılı başında Türkiye'ye de getirilmiş yerli ırklarla melezlenip süt veriminin artırılması için ilk çalışmalar yapılmıştır. Son yıllarda Türkiye'de özellikle dondurma ve peynir üreticisi birçok firmanın Saanen yetiştiriciliğine yöneldiği ve büyük işletmeler kurulduğu bilinmektedir (Savaş 2008, Ceyhan ve Karadağ 2009, TÜDKİYEB 2012).

Türk Saanen keçisi, verim özellikleri yönüyle Türkiyede süt ve döl verimi bakımından en yaygın yetiştirme alanı bulmuş bir melez ırktır. Renkleri kremden beyaza doğru değişmektedir. Genel olarak kısa kıllı, dik ve küçük bir kulak yapısına sahiptir (Resim 1.1.1). Her iki cinsiyette de boynuz, küpe ve sakala rastlanılabilmektedir (Resim 1.1.2). Meme yapısı "koltuk meme" olarak tabir edilen diz üstünde kalan sarkık olmayan formdadır. Ergin dişilerde canlı ağırlık 50-60 kg arasında değişmektedir. Ergin tekelerde ise canlı ağırlık 60-80 kg arasında olup 100 kg' a kadar ulaşabilmektedir. Döl verim özellikleri bakımından söz konusu genotip incelendiğinde, iyi bakım koşullarında erken yaşta cinsel olgunluğa ulaşmakta ve damızlıkta kullanma yaşı 8-10 aylarda başlamaktadır. Ortalama oğlaklama oranı 1,8 olarak ifade edilmekte, ortalama oğlak doğum ağırlığı da 3-3,5 kg olarak gözlenmektedir (Resim 1.1.3). Laktasyon süt verimleri 500-650 lt arasında değişmekte olup laktasyon süreleri ortalama 270-280 gün arasındadır (Ceyhan ve Karadağ 2009, Atay ve ark 2011, Keskin ve ark 2012).



Resim 1.1.1. Renkleri kremden beyaza doğru değişen, genel olarak kısa kıllı, dik ve küçük kulaklı Saanen keçileri (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği, 2011).



Resim 1.1.2. Saanen ırkı keçilerde boynuz, küpe ve sakal görüntüsü (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği, 2011).





Resim 1.1.3. Saanen keçisi oğlaklarının görüntüsü (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği, 2012).

1.2. Keçilerde Seksüel Olgunluk Yaşı (Pubertas)

Keçilerde seksüel olgunluk yaşı, dişilerde ilk ovulasyonlu östrüsün, erkeklerde ise ilk spermatozoon içeren ejakülatın görüldüğü yaş olarak kabul edilir. Pubertasın canlı ağırlıkla yakından ilişkili olduğu ve pubertasa ulaşmak için gerekli canlı ağırlığın ise ergin ağırlığının en az % 40-50 arasında olması gerektiği bildirmektedir (Özer 2007, Abebe 2008, Edmondson ve ark 2012). Keçiler, 3–12 ay arasında değişmekle birlikte genellikle 5-7. aylarda pubertasa ulaşırlar. Pubertas hem genetik (ırk) ve hem de çevre faktörleri (ısı, ışık, besleme) tarafından etkilenmektedir (Abebe 2008). Dişilerin doğum zamanı yavrularda pubertas yaşını belirleyen önemli bir faktör olarak bildirilmektedir (Kalkan ve Horoz 2005).

Keçiler; tropikal bölgelerde yıl boyu östrus gösterebilmelerine karşın Türkiyede mevsime bağlı üreme özelliği göstermeleri nedeniyle; mevsimsel poliöstrik hayvanlar olarak tanımlanmaktadır (Abebe 2008, Fatet ve ark 2011). Keçilerde seksüel aktivite, Türkiye' nin de içinde bulunduğu kuzey yarımkürede gün uzunluğunun azaldığı, yaz sonu ve sonbahar aylarında (Eylül-Ocak) görülmektedir (Gomez-Brunet ve ark 2012). Keçilerin bir sezonda, gebe kalmadıkları müddetçe 4-7 kez östrus gösterdikleri belirtilmektedir (Kalkan ve Horoz 2005). Mevsimsel üremenin başlaması ve süresini kontrol eden en önemli çevresel faktörün fotoperiyot olduğu, gün uzunluğunun kısalmasıyla keçilerin üreme sezonuna girdiği bildirilmektedir (Brackel-Bodenhause ve ark 1994). Bunun yanında çevre sıcaklığının düşmesi, laktasyon, ırk, teke katımı, yaş ve önceki reprodüktif durumlarının da keçilerde ovaryum fonksiyonlarını etkileyebileceği vurgulanmaktadır (Kalan ve Horoz 2005). Keçiler gün ışığı sürelerinin arttığı dönemlerde anöstrüse girmektedir. Anöstrus döneminde hipofiz bezi inaktif olup, gonadotropin salgısı düşük düzeyde kalmakta, folliküler aktivitenin uyarılmamasına bağlı olarak, anöstrus döneminde keçilerde östrus ve ovulasyon şekillenmemektedir (Kalkan ve Horoz 2005).

Azalan gün ışığı etkisiyle retinadaki optik sinirlerin beyinin chiasma opticum'una sinirsel uyarılar ilettiği ve gün ışığı süresindeki azalmanın pineal bezden melatonin salınımını arttırdığı bildirilmektedir. Melatoninin keçilerde gonadotropik etkili olduğu ve Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH;

Gonadotropin Salgılatıcı Hormon) salınımına yol açarak sezonu başlattığı bilinmektedir (Özer 2007).

1.3. Keçilerde Seksüel Siklusun Hormonal Mekanizması ve Östrus Siklusunun Evreleri

Keçilerde üreme mevsimi sırasında seksüel siklusun süresi ortalama 21 (17–24) gün olup siklus iki ayrı evreden oluşmaktadır. Bu evrelerden ilki; yumurta ya da ovumun gelişip atıldığı folliküler evre, ikincisi ise; ovulasyonla başlayan ve corpus luteumun (Cl) oluştuğu luteal evredir (Abebe 2008, Fatet ve ark 2011). Anöstrus sezonunda ve östrus boyunca plazma progesteron konsantrasyonu 1 ng/ml'den daha az olmasına karşın luteal evre süresince progesteron düzeyi 4-8 ng/ml'ye ulaşmaktadır (Edmondson ve ark 2012).

Üreme mevsiminde önce hipotalamustan salınan GnRH' nın etkisiyle hipofiz ön lobundan Follicle Stimulating Hormone (FSH; Follikül Uyarıcı Hormon) ve Luteinizing Hormone (LH; Luteinleştirici Hormon) salınımı uyarılır. Folliküler evre sırasında, hipofiz bezinden salgılanan FSH ovaryumda folliküllerin gelişimini uyararak ovaryum üzerinde 2-3 mm çapında çok sayıda antral folliküllün oluşumuna neden olur. Bu folliküllerden yalnızca 2-3 adedi daha sonra dominant follikülü oluşturmak üzere 4 mm çapa ulaşır. Luteinleştirici Hormonun etkisiyle alt folliküller dejenere olurken (folliküler atrezi), ovulasyon öncesi follikül çapı 6-9 mm'ye ulaşır. Büyük folliküllerden salgılanarak periferik kanda konsantrasyonu artan östradiol 17-β, hayvanda östrus davranışlarının görülmesine neden olur (Abebe 2008, Fatet ve ark 2011, Gibbons ve Cueto 2011). Östrojen belirli bir düzeye ulaşınca pozitif feedback etki ile hipotalamustan salınan GnRH hipofiz ön lobundan tekrar FSH ve LH salgılanmasına neden olur. Folliküler gelişim sırasında östrojen salınımının yanısıra inhibin salınımı da gerçekleşir. İnhibin FSH sekresyonunu inhibe ederek LH salınımını uyarır. Luteinleştirici Hormonun etkisiyle 20-26 saat sonra ovulasyon ve daha sonra folliküllerin luteinizasyonu başlatılır. Luteal evre ovulasyonla başlar ve östrus sonrası evre olarak adlandırılır. Periferal kanda progesteronun yükselmeye başladığı dönem metöstrus; luteinizasyonun başladığı ve periferal kanda progesteronun en yüksek seviyeye ulaştığı dönem diöstrus olarak ifade edilir. Östrus başlangıcından 5 gün sonra ovüle olan follikül hücrelerinin luteal hücrelere dönüşmesi sonucu Cl şekillenir. Corpus luteum'lardan (CL; Corpora lutea)

salgılanan progesteronun kandaki konsantrasyonu giderek artar ve siklusun 16.gününde en yüksek düzeye (>1ng/ml) ulaşır. Gebelik şekillenmişse Prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) ' nın CL üzerindeki luteolitik etkisinin ortadan kalkması sonucu siklik CL gebelik CL' sine dönüşür. Eğer gebelik şekillenmemişse luteal evrenin sonunda, siklusun 16-18. günlerinde uterus endometriyumundan salgılanan $PGF_2\alpha$ CL' nin regresyonuna (luteolizis) neden olması sonucu kan progesteron konsantrasyonunun düşmesine bağlı olarak hipotalamo-hipofiziyal sistem üzerindeki negatif feed-back etkisi ortadan kalkar ve yeniden gonadotropin salınımı sonucu yeni bir folliküler evre başlar (Abebe 2008, Fatet ve ark 2011, Gibbons ve Cueto 2011).

Üreme mevsiminde seksüel aktivite gösteren keçilerde östrus siklusu proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus evrelerinden oluşur (Çizelge 1.3.1). Keçilerde östrus davranışları; huzursuzluk, ürinasyonun artması, süt üretimin azalması, meleme, kuyruk sallama, diğer keçilerin üzerine atlama ve teke önünde bekleme gibi hareketlerle karakterizedir (Abebe 2010). Keçiler üreme mevsiminin dışında uzun süren bir anöstrus evresine sahiptir. Proöstrus 2–3 gün, östrus 30–36 saat, metöstrus 2 gün, diöstrus ise 16–17 gün sürmektedir (Özer 2007).

Çizelge 1.3.1. Keçilerde östrus siklusunun evreleri (Abebe 2008).

Östrus siklusunun evresi	**Östrus siklusunun günü**	**Belirtileri**
Östrus	1-2	Folliküllerin büyümesi ve ovulasyon, servikal mukusun artması ve incelmesi, çiftleşmeyi kabul etme,
Metöstrus	3-4	Corpus luteumun şekillenmesi,
Diöstrus	5-18	Luteal faz,
Proöstrus	19-21	Folliküllerin büyümesi.

Keçilerde östrus süresi ortalama 36 saat (24–48 saat) olarak bildirilmektedir. Ovulasyon, östrus başlangıcından 24–36 saat sonra spontan olarak meydana gelmekte ve her siklus sırasında ortalama 2–3 adet oosit ovule olmaktadır (Vivanco 1985, Fatet ve ark 2011, Mellado 2011, Edmondson ve ark 2012).

1.4. Keçilerde Yardımcı Üreme Teknikleri

Keçilerde fertilitenin doğal yöntemler (teke etkisi ve besleme) ya da uygulanan yardımcı üreme teknikleri ile artırılabilmesi mümkün olabilmektedir

(Paramio ve Izquierdo 2014). Bu teknikler; östrus senkronizasyonu, süperovulasyon, suni tohumlama, Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET; Çoklu Ovulasyon ve Embriyo Transfer), in vitro fertilizasyon, in vivo embriyo üretimi, in vitro embriyo üretimi ve embriyo transferi, embriyo ve spermanın dondurulması, embriyonun bölünmesi, kopyalama, transgenik hayvan üretimi ile arzu edilen cinsiyette yavru üretimi gibi tekniklerdir (Vivanco 1985, Paramio ve Izquierdo 2014).

Yüksek genetik ve verim özelliğine sahip olan hayvanlardan yardımcı üreme teknikleri uygulanarak daha fazla yavru elde edilebilmesi, doğal yöntemlerle yavru elde edilmesinden daha kolay olmaktadır. Özellikle üremenin mevsimsel olduğu keçi gibi hayvanlarda, bu yardımcı üreme teknikleri sayesinde yıl boyunca yavru ve süt elde edilebilmesi mümkün olmaktadır (Baldassarre ve Karatzas 2004). Bu teknikler arasında suni tohumlama, tüm dünyada en yaygın olarak kullanılan ve genetik iyileşmeye en önemli katkı sağlayan yardımcı üreme tekniklerinden biridir. Yardımcı üreme teknikleri arasındaki MOET sayesinde de genetik olarak değerli dişi hayvanlardan daha çok sayıda yavru elde etmek mümkün olmaktadır (Gama ve Bressan 2011, Paramio ve Izquierdo 2014).

Embriyolar in vivo ve in vitro olarak üretilebilmektedir. İn vivo embriyo üretimi;

- Donör hayvanların seçimi,
- Senkronizasyonu,
- Süperovulasyonu,
- Tohumlanması,
- Embriyonun gelişimi,
- Embriyoların elde edilmesi (uterusun yıkanması),
- Embriyoların toplanması ve değerlendirilmesi,

- Embriyoların dondurularak saklanması ve çözdürülmesi veya embriyoların taze transferi gibi aşamaları içermektedir (Ishwar ve Memon 1996, Mellado 2011, Kaymaz 2012).

Laparoskopik veya ultrasonografik (OPU-Ovum pick up) yöntemlerle canlı hayvandan elde edilen oositlerin in vitro fertilizasyonu sonrası in vitro embriyo üretimi de hayvanlarda genetik ilerleme için bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu yöntem cerrahi yöntem ile embriyo toplanmasına göre daha az travmatik olduğundan, üreme ömrü boyunca dişi hayvanın birçok kez kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. (Baldassarre ve Karatzas 2004).

1.4.1. Keçilerde Östrus Senkronizasyonu

Östrus senkronizasyonu, suni tohumlama ve embriyo transfer prosedürünün uygulanması ve başarısı açısından önemlidir (Mellado 2011, Abecia ve ark 2012). Östrus senkronizasyonun; östrusların kısa bir süre içine toplanması, çiftleşmeyle bulaşan hastalıkların önlenmesi, sürüde bir örnek gençleşmeyi sağlaması, süt talebine göre doğumların ayarlanması gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Mellado 2011, Abecia ve ark 2012, Uçar ve Özyurtlu 2012). Östrus senkronizasyonu, keçilerin üreme mevsiminde östrusları senkronize etmek ve gebelik oranlarında artış sağlamak, üreme mevsimi dışında östrusları uyarmak amacıyla uygulanır. Üreme mevsimi dışında bulunan keçilerde senkronizasyon amacıyla ışık uygulaması, teke etkisi, progestagen, melatonin (Çizelge 1.4.1.1) ve ayrıca ovulasyon ve gebelik oranını yükseltmek amacıyla da Pregnant Mare Serum Gonadotropin (Gebe Kısrak Serum Gonadotropini; PMSG), $PGF_2\alpha$ ve analogları, GnRH, Human Chorionic Gonadotropin (hCG; İnsan Koriyonik Gonadotropini) gibi hormonlardan yararlanılmaktadır (Chemineau ve ark 1992, Özer 2007, Uçar ve Özyurtlu 2012).

Çizelge 1.4.1.1. Keçilerde östrus senkronizasyonu için kullanılan yöntemler (Edmondson ve ark 2012).

Aşım sezonu	Geçiş sezonu	Aşım sezonu dışı
Prostaglandinler	Teke etkisi	Progesteron+gonadotropin+prostaglandin
Progesteron	Progesteron+gonadotropin+prostaglandin	Işık uygulaması
Progesteron+gonadotropin	Progesteron+gonadotropin+teke etkisi	Melatonin uygulaması

Progestagenler

Progestagenler veya progestinler, doğal progesteron hormonu da dahil olmak üzere progesteron molekülünde modifikasyon yapılarak oluşturulmuş progesteron benzeri etki yapan yapılar şeklinde tanımlanmaktadır. Progesteronlar steroid yapıda hormanlardır, bazı hayvan türlerinde plasenta ve adrenal bezden de salgılandığı bilinmekle birlikte ana kaynağı Cl' yi oluşturan luteal hücrelerdir (Alaçam 2005a).

Pratikte kullanılan progestagenler; Flugeston Asetat (FGA), medroksiprogesteron asetat (MAP), megestrol asetat (MA), melengesterol asetat (MGA), klormadinon asetat (CAP), norethandrolon asetat (NEA) ve norethisteron asetattır (NET). Progestagenler premiks, tablet, kapsül ve solüsyon formlarında oral olarak; enjeksiyon, deri altı implant ve intravaginal araçlar şeklinde kullanılmaktadır (Alaçam 2005b, Özyurtlu ve Bademkıran 2010, Uçar ve Özyurtlu 2012).

Progestagenlerle seksüel siklusun denetlenmesinde, progestagenlerin GnRH ve gonadotropik hormonlar üzerine negatif feedback etki oluşturarak siklik aktivitenin başlamasını baskılaması amaçlanır. Progesteron kaynağı uzaklaştırıldığında bu baskı ortadan kalkmakta, östrus ve ovulasyon şekillenmektedir (Alaçam 2005b, Amiridis ve Cseh 2012, Edmondson ve ark 2012). Anöstrus dönemindeki uygulamalarda ovulasyonsuz östruslar şekillenebilmektedir. Bu yüzden progesteron uygulamaları ile birlikte follikül gelişimini uyarmak amacıyla kas içi PMSG enjeksiyonları önerilmektedir (Uçar ve Özyurtlu 2012).

Progestagen içeren intravaginal süngerler üreme mevsimine geçişte, üreme mevsiminde ve anöstrusta yaygın olarak kullanılmaktadır. Vaginaya yerleştirilen poliüretan köpükten yapılmış süngerler, vaginal mukozaya difüzyon yoluyla geçebilen ve endojen progesteron gibi etki eden sentetik progesteron analoglarını içerir. Vaginal sünger uygulamasında normal seksüel siklustaki diöstrus süresi taklit edilmektedir (Uçar ve Özyurtlu 2012). Günümüzde yaygın olarak iki tip vaginal sünger kullanılmaktadır. Bunlardan biri, FGA diğeri ise MAP içeren vaginal süngerlerdir. Aynı amaçla etken maddenin kontrollü olarak salınımını sağlayan Controlled internal drug release device (CIDR; Kontrollü İntravaginal Salınım Yapan Cihaz); CIDR-S ve CIDR-G adlı iki tip progestagen de bulunmaktadır. Kullanılan CIDR, % 9-12 (300 mg) progesteron içeren sert medikal silikondan yapılmıştır.

Uygulama sonrası kan progesteron seviyesinde çok hızlı bir yükselme sağlamaktadır (Whitley ve Jackson 2004, Holtz 2005, Flores-Foxworth 2007, Abecia ve ark 2012).

Keçilerde yapılan bir çalışmada PMSG ile birlikte kullanılan FGA ve MAP içeren cihazlarla CIDR' ın karşılaştırılmasında östrus senkronizasyonları ve gebelik oranları üzerinde herhangi bir fark olmadığı belirtilmektedir (Motlomelo ve ark 2002). Saanen keçileri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, üreme sezonu içinde ve üreme sezonu dışında intravaginal FGA ve MAP kullanılarak elde edilen östrus senkronizasyonlarının oranları arasında herhangi bir fark bulunmadığı ifade edilmektedir (Doğan ve ark 2004). Keçilerde yapılan bir çalışmada MAP' ın farklı dozlarda (30-60 mg) uygulanmasının senkronizasyonlar üzerinde farklı bir etkisinin olmadığı ifade edilmektedir (Greyling ve van der Nest 2000). Üreme mevsimi dışında genç keçilerde yapılan bir çalışmada östrusların uyarılmasında FGA vaginal sünger ve Norgestomet kulak implantı karşılaştırılmıştır. Kısa süreli (8 gün) ve uzun süreli (12 gün) intravaginal sünger ve kulak implantı uygulamalarında östrus gösterme oranları arasında bir farklılık olmadığı ancak elde edilen gebelik oranlarının kısa süreli vaginal sünger ve implant uygulamalarının uzun süreli uygulamalara göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Kılboz ve Karaca 2010). Üreme sezonu içerisinde yapılan bir diğer çalışmada ise FGA içeren vaginal sünger ve norgestomet içeren kulak implantının PMSG ve $PGF_2\alpha$ ile kombine kullanımlarında östrusların başarılı bir şekilde senkronize edildiği, uygulamaların kısa (6 gün) veya uzun (14 gün) süreli olmasının fertilite oranları üzerinde bir farklılık oluşturmadığı bildirilmektedir (Özer ve Doğruer 2011). Keçilerde anöstrus döneminde yapılan başka bir çalışmada progestagen olmaksızın 6 gün süreyle azalan dozlarda (300 IU, 200 IU, 200 IU, 100 IU, 100 IU, 50 IU) Equine Chorionic Gonadotropin (eCG; Kısrak Koryonik Gonadotropini)' in kas içi enjeksiyonunun östrus senkronizasyonunda başarılı olduğu belirtilmektedir (Karaca ve ark 2009).

Gerek sezon içi ve gerekse sezon dışında östrus senkronizasyonu amacıyla en yaygın ve etkili olarak uygulanan protokoller; progestagenlerin intravaginal poliüretan süngerler (30–45mg FGA ya da 60 mg MAP), intravaginal dağıtıcılar (330 mg progesteron içeren CIDR-G®) ya da derialtı çıkarılabilir implantlar (inekler için kullanılan implantların 1/5'i ya da 1/2'si 1,2–6 mg norgestomet)' ın 9 ile 21 gün süren tedavi şeklindeki uygulamalardan oluşmaktadır (Mellado 2011, Amiridis ve

Cseh 2012, Edmondson ve ark 2012). Bu dönemde sünger uygulamaları ile birlikte follikül gelişimini uyarmak amacıyla kas içi PMSG (375-750 IU) ya da hCG, progestagen tedavisi bitiminden 1 gün önce (sezon dışı) ya da progestagen içeren süngerlerin çıkartıldığı gün (sezon içi) uygulanmaktadır. Eğer progestagenin uygulama süresi (9-11 gün) luteal evreden daha kısa ise progestagen tedavisi bitiminden 48 saat önce $PGF_2\alpha$ enjeksiyonu gerekmektedir. Keçiler genellikle bu tedavi bitiminden 72 saat sonra östrus göstermektedir (Mellado 2011, Amiridis ve Cseh 2012).

Oral progestagen olarak MA günde bir veya iki kez; 400 IU PMSG + 200 IU hCG veya PMSG ile kombine şeklinde kullanılabilmektedir. Ancak uygulama zorluğu nedeniyle çok yaygın kullanılmamaktadır (Whitley ve Jackson 2004, Uçar ve Özyurtlu 2012). Melengesterol asetat bir diğer sentetik progestagendir ve 8-14 gün süreyle genellikle 0,25 mg/gün olarak kullanılmaktadır (Abecia ve ark 2012, Edmondson ve ark 2012).

GnRH

Hipotalamustan sentezlenen ve adenohipofizden FSH ve LH salınımını kontrol eden GnRH; ovaryum faaliyetlerini ve senkronize sikluslarda ovulasyonu artırmak amacıyla kullanılabilmektedir. Bu amaçla GnRH (Gonadorelin 100 µg) intravaginal süngerlerin çıkartılmasından 24 saat sonra kas içi enjeksiyon tarzında uygulanmaktadır (Özyurtlu ve Bademkıran 2010).

$PGF_2\alpha$ ve analogları

Keçilerde üremenin denetlenmesi için alternatif diğer bir yöntem prostaglandinlerin kullanılmasıdır. Prostaglandinlerin kullanılması için keçinin diöstrus başlangıcında olması ve ovaryumlarda aktif bir Cl' nin bulunması gerekmektedir (Edmondson ve ark 2012). Prostaglandinler luteolizisi sağlayarak CL' nin regresyonunu ve takip eden folliküler evrede ovulasyonu uyarmaktadır (Abecia ve ark 2012). Keçilerde 10-14 gün arayla çift doz kullanımı önerilmekte (1,25-15 mg dinoprost trometamine; 62-250 mg cloprostenol) ve enjeksiyondan 2-4 gün sonra östruslar görülmektedir (Whitley ve Jackson 2004, Alaçam 2005b, Mellado 2011, Uçar ve Özyurtlu 2012).

Melatonin

Melatonin, gün ışığının azalmasıyla karanlık sürecin reprodüktif aktiviteyi etkilemesine benzer bir mekanizmayı taklit etmektedir (Özyurtlu ve Bademkıran 2010, Gomez-Brunet ve ark 2012). Epifiz bezinden salgılanan melatonin, keçilerde özellikle anöstrustan üreme sezonuna geçiş döneminde hipotalamusa etki ederek gonadotropin salınımını artırmaktadır. İmplant, enjeksiyon veya oral yolla kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan melatonin deri altı implant (18 mg melatonin) şeklinde olanıdır ve anöstrusta çiftleşme mevsiminden 40-60 gün önce kullanılmaya başlanarak ovaryum aktivitesini uyarabilmektedir (Brackel-Bodenhausen ve ark 1994, Abecia ve ark 2012, Edmondson ve ark 2012, Gomez-Brunet ve ark 2012). Keçilerde yapılan bir çalışmada melatonin implantlarının çiftleşmeden 40 gün önce uygulamaya başlanıp progesteron kombinasyonu ile başarılı sonuçların elde edildiği bildirilmektedir (Çetin ve ark 2009).

1.4.2. Süperovulasyon

Süperovulasyon, memeli ovaryumlarında çok sayıda follikül gelişimine ve gelişen bu folliküllerin ovulasyonunu sağlayarak ovum sayısının artışına yol açan hormonal bir tedavi yöntemidir. Süperovulasyon; folliküllerden salınan kullanılabilir oositlerin sayısını artırmakla beraber, ovulasyonu ve oositin maturasyonunu da sağlamaktadır (Tekeli 2005, Aminoor Rahman ve ark 2008, Sağırkaya 2009, Sousa ve ark 2011).

Süperovulasyon amacıyla gonadotropik hormonlardan yaralanılmaktadır (Flores-Foxworth 2007, Amiridis ve Cseh 2012). Bunların başında FSH, PMSG, Human Menopausal Gonadotropin (hMG; İnsan Menapozal Gonadotropini) (Flores-Foxworth 2007 Aminoor Rahman ve ark 2008, Kaymaz 2012). İnsan menapozal gonadotropini ile elde edilen süperovulasyon cevaplarının eCG ile elde edilen cevaplarla benzer olduğu ancak Early Luteal Regression (ELR; Erken Luteal Regresyon)' u uyarması ve pahalı olması gibi ciddi dezavantajları nedeniyle çok geniş kullanım alanı olmadığı bildirilmektedir (Amiridis ve Cseh 2012). Bu hormonlardan PMSG, gebeliğin 40-130. günleri arasında bulunan kısrakların kan serumlarından, elde edilen hem FSH hem LH' nın biyolojik özelliklerini taşıyan glikoprotein yapıda bir hormondur (Kaymaz 2012). FSH ise at, domuz veya koyun hipofiz bezi ekstraktından elde edilmektedir. Bu hormonların temel etki

mekanizmaları, küçük ve orta büyüklükteki folliküllerde FSH reseptörlerini aktive etmek ve bağlanmak suretiyle follikül gelişimini uyarmalarıyla açıklanmaktadır (Aminoor Rahman ve ark 2008). Gebe kısrak gonadotropininin yarılanma ömrü uzun (21 saat) olup, başarısız ovaryum stimülasyonuna, ovule olmayan folliküllere, anormal endokrin değişikliklere ve düşük kaliteli embriyoların oluşumuna neden olmaktadır (Cognie 1999, Gibbons ve Cueto 2011, Edmondson ve ark 2012). Ovule olmayan folliküllerden salgılanan östrojen, folliküllerden atılan oositler üzerine olumsuz olarak etki etmekte ve fertilizasyon sırasında salınan östrojen ise embriyotoksik etki oluşturmaktadır (Cognie 1999, Kaymaz 2012).

Follikül uyarıcı hormonun elde edilme yönteminden dolayı pahalı olması, yarılanma ömrünün kısa olması (3-4 saat) nedeniyle 12 saat arayla uygulamayı gerektirmesi; daha ucuz ve yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle tek enjeksiyon şeklinde uygulanan PMSG' ye göre dezavantaj oluşturmaktadır (Gordon 2004, Gibbons ve Cueto 2011, Kaymaz 2012). Yapılan birçok çalışmada, keçilerde süperovulasyon amacıyla uygulanan FSH'nın PMSG'den daha etkili olduğu vurgulanmaktadır (Pintado ve ark 1998, Cognie 1999, Menchaca ve ark 2007, Aminoor Rahman ve ark 2008, Hu ve ark 2010). Tekrarlayan eCG uygulamalarıyla yapılan süperovulasyon çalışmalarında, eCG' ye karşı antikor oluşumundan dolayı düşük fertilite ile karşılaşıldığı bildirilmektedir (Baldassarre ve Karatzas 2004, Amiridis ve Cseh 2012).

Keçilerde süperovulasyonun prensibi, inek ve koyunlardaki süperovulasyon prensibi ile benzerlik taşımaktadır (Ishwar ve Memon 1996, Bulnes ve ark 2003, Menchaca ve ark 2007, Rahman ve ark 2008). Keçilerde uygulanan çok çeşitli süperovulasyon protokolleri olduğu bildirilmektedir (Flores-Foxworth 2007). Süperovulasyon protokolünde FSH'nın kullanımı, diğer ruminantlarda olduğu gibi keçilerde de ovulasyon cevabı ve embriyo verimi açısından öncelik taşımaktadır (Gordon 1997).

Keçilerde süperovulasyon amacıyla yaygın olarak uygulanan protokoller; eCG' nin 1500-2000 IU tek enjeksiyon şeklinde uygulanması ya da 20 mg FSH'nın azalan dozlarda günde iki kez dört gün boyunca uygulanması olarak bildirilmektedir (Mellado 2002, Gibbons ve Cueto 2011, Edmondson ve ark 2012). Keçilerde yapılan bir çalışmada FSH' nın deri altı ya da kas içi uygulamalarının transfer edilebilir

embriyo sayısı bakımından fark göstermediği belirtilmektedir (Lehloenya ve Greyling 2009). İneklerde yapılan bir çalışmada da FSH' nın epidural ve kas içi uygulamalarının karşılaştırılmasında ortalama CL sayısı, transfer edilebilir ve transfer edilemez embriyo oranları ve UFO oranları açısından fark olmadığı bildirilmektedir (Taşdemir ve ark 2012). Ayrıca FSH ile yapılan bir başka çalışmada sezon içi ve sezon dışı süperovulasyon uygulamalarında transfer edilebilir embriyo sayısı bakımından fark olmadığı bildirilmektedir (Lehloenya ve ark 2008). Taşdemir ve ark (2011) anöstrus döneminde Ankara (AG) ve Kilis (KG) keçilerinde FSH ile yaptıkları süperovulasyon çalışmasında senkronizasyon oranları (AG; % 88, KG; % 91) arasında, sağ (AG; % 44, KG; % 53) ve sol (AG; % 56, KG; % 47) ovaryumlardaki CL oranlarında fark olmadığını ancak transfer edilebilir embriyo oranlarında (AG; % 74, KG; % 35) ırklar arasında önemli farklılık olduğu belirtilmektedir (Taşdemir ve ark 2011).

Keçilerde geleneksel süperovulasyon protokolünün; progestagen içeren süngerlerin genellikle 12-18 gün süreyle intravaginal uygulanması ve süngerin çıkartılmasından 24-48 saat önce gonadotropinlerin enjeksiyonu şeklinde olduğu ifade edilmektedir (Arthur ve ark 1989, Gordon 1997, Aminoor Rahman ve ark 2008, Perera ve ark 2009, Sağırkaya 2009, Paramio 2010). Bu amaçla FSH altı veya sekiz bölünmüş doz halinde 3-4 gün süreyle (Gordon 1997, Flores-Foxworth 2007), PMSG ise seksüel siklusun 17. gününde tek enjeksiyon tarzında uygulanmaktadır (Tekeli 2005). Gonadotropin uygulamasından 24-72 saat sonra $PGF_2\alpha$ enjeksiyonu uygulanmakta ve bunu izleyen 24-36 saat içinde de östruslar gözlenmektedir (Arthur ve ark 1989). Uygulanan gonadotropin enjeksiyonlarının bitiminden sonraki 24-48. saatte hayvanlara suni tohumlama veya doğal aşım yaptırılmaktadır (Tekeli 2005, Edmondson ve ark 2012).

Süperovulasyon cevabını etkileyen faktörler; follikülogenezis, ırk, aşım sezonu, besleme ve ovaryumlar üzerindeki folliküllerin, corpus luteum' un varlığı ve tekrarlayan süperovulasyon çalışmaları şeklinde belirtilmektedir (Gibbons ve Cueto 2011, Ağaoğlu ve ark 2014). Güney Afrika ırkları arasında yapılan süperovulasyon ve embriyo transfer çalışmasında Indigenous ırkında süperovulasyon cevabı %87,5 iken, Boer ırkında %50 oranında olduğu bildirilmektedir (Greyling ve ark 2002).

Keçilerde embriyo transferi uygulamalarında başarıyı sınırlayan önemli iki faktörün; süperovulasyon cevaplarının çeşitlilik göstermesi ve CL' nin erken regresyonu (%0-27) olduğu bildirilmektedir (Gordon 2004, Gibbons ve Cueto 2011, Paramio ve Izquierdo 2014). Keçilerde FSH' nın yanında LH bulunan preperatlarla ya da eCG ile yapılan süperovulasyon uygulamalarında prematür ovulasyon, ovule olmamış folliküller (persiste folliküller) ya da luteinize olmuş folliküler ile karşılaşmak mümkündür. Erken luteal regresyon görülme oranının ırklar arası %10'dan (Alpine ve Saanen) %32' ye (Murciana) kadar farklılık gösterdiği de bildirilmektedir (Cognie ve ark 2003). Erken luteal regresyonun oluşum nedeni henüz açık olmamakla birlikte embriyo kalitelerinde azalmaya ve embriyo kazanım oranlarında azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (Cognie ve ark 2003). Corpus luteumun erken regresyonu, prostaglandin inhibitörleri (Flunixine meglumine ya da progesteron) kullanılarak engellenebilmektedir. Bu nedenle ovulasyon günü ile embriyo toplama günü arasında uygulanan Flunixine meglumine ile luteolizisin engellenmesi sayesinde erken luteal regresyon oluşumunda azalma olacağı ve transfer edilebilir embriyo sayısında artış olacağı belirtilmektedir (Guerra ve ark 2011). Süperovulasyondan 3-4 gün sonra büyük östrojenik folliküllerin varlığı luteolizisin erken şekillenmesini başlatmaktadır. Bu gibi durumlarda; süperovulasyon uygulanan keçilerde, östrustan 3.5 gün sonra uygulanan hCG ile büyük folliküllerin ovulasyonları uyarılabilmekte ve ELR önlenebilmektedir (Cognie ve ark 2003).

Gonadotropin tedavisine başlandığı sırada ovaryum üzerinde dominant bir folllikülün varlığı süperovulasyon cevaplarını olumsuz yönde etkilemektedir (Cognie ve ark 2003, Gordon 2004, Flores-Foxworth 2007). Bu nedenle, süperovulasyon uygulamalarının dominant follikül bulunmayan yeni bir folliküler dalganın başlangıcında uygulanması (Day 0 protokolü), ya da süperovulasyon uygulamalarının başladığı günde GnRH antogonistlerinin uygulanması önerilmektedir (Gordon 2004, Menchaca ve ark 2007, Paramio 2010). Bu protokolde FSH sıfırıncı günden (day 0) başlanarak günde iki kez altı azalan doz halinde uygulanmaktadır. Beşinci ve altıncı FSH uygulaması ile eş zamanlı yarım doz $PGF_2\alpha$ verilmektedir. Ovulasyon senkronizasyonu için GnRH anoloğu, $PGF_2\alpha$'nın ilk uygulamasından 24 saat sonra uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu protokol ile elde edilen sonuçların keçilerde geleneksel protokole göre embriyo verimi ve ovulasyon oranları bakımından daha başarılı olduğu bildirilmektedir (Menchaca ve

ark 2007, Paramio 2010). Anöstrus döneminde Ankara ve Kilis keçilerinde yapılan bir diğer çalışmada da keçilerde sezon dışı süperovulasyon uygulamalarında day 0 protokolünün başarıyla kullanılabileceği, ancak transfer edilebilir embriyo oranlarında ırklar arasında farklılık olduğu belirtilmektedir (Taşdemir ve ark 2011).

Keçilerde yapılan bir çalışmada, süperovulasyondan önce GnRH antagonistinin uygulanması ile süperovulasyon ve embriyo geri kazanım oranlarının artış göstermesiyle birlikte fertilize olmamış oosit sayısının da artışına neden olduğu bildilirmektedir (Heidari ve ark 2010).

1.4.3.Embriyonun Gelişimi

Suni tohumlama ya da doğal aşımı izleyen başarılı bir fertilizasyon sonrası oluşan zigot, ilk 5 günde hızla bölünerek ovidukt'tan uterusa doğru göç eder. Bu bölünmeler sonucunda embriyo oluşur. Fertilizasyondan sonra 5. günde embriyo, blastomerler arasındaki sıkı bağlantıların oluşması ile kompakt bir hal alır. Bu kompakt yapı oluşumu embriyo kalitesi için önemlidir (Kaymaz 2012). Bu aşamadaki embriyo "morula" (6.gün) olarak adlandırılır (Gordon 1997, Flores-Foxworth 2007). Hücreler arası sıkı bağlantılar ile blastomerlerin büzüşmesi ve perivitellin boşlukta artış meydana gelmesi sonrası oluşan embriyo "kompakt morula" adını almaktadır (Gordon 2004, Kaymaz 2012). Daha sonra hücre dışından hücre içine sodyum geçişi sonucu oluşan osmotik basınç değişikliği, hücre kümesinin alt kısmında sıvı birikimine neden olur ve hücre kümesinin altında blastosist kavitesi (blastosel formasyonu) şekillenir. Blastosel formasyonu embriyonun sadece bir tarafında oluşmaya başlar. Embriyonun bu evresi "erken blastosist" (7. gün) olarak adlandırılır. Bu aşamada blastosist kavitesi embriyonun total hacminin % 50 sinden daha azdır. Blastosist kavitesi embriyonun % 50'sinden daha fazlasını kaplamaya başladığında ise embriyo "blastosist" (7-8. gün) adını alır. Blastosist kavitesinin osmotik basıncı artış gösterdiğinde embriyo genişlemeye devam edererek dış çapı artar, zona pellusida gerilip incelir. Bu aşamadaki embriyo "ekspanded" (genişlemiş) blastosist (8-9. gün) adını alır. Fertilizasyon sonrası 9-11. günlerde zona pellusida yırtılarak embriyo zonadan dışarı sarkar, bu aşamadaki embriyo "hatching embriyo" olarak adlandırılır. Embriyonun zona pellusidanın tamamen dışarı çıkmış olduğu evresi "hatched" embriyo adını alır (Flores-Foxworth 2007, Robertson ve Nelson 2010, Kaymaz 2012).

1.4.4. Embriyoların Elde Edilmesi

Keçilerde embriyoların elde edilme işlemi ineklere göre daha komplike prosedür içermektedir. Embriyolar suni tohumlama ya da doğal aşımdan 6-8 gün sonra laparatomi ile uterus kornularının bir vasat yardımıyla yıkanması ile elde edilmektedir. Bu prosedür her bir keçi için 2-3 kez uygulanabilmekle birlikte, her uygulama sonrası sıklıkla post operatif yapışmalara neden olmakta ve bu da elde edilecek embriyo sayısını sınırlamaktadır (Paramio 2010, Paramio ve Izquierdo 2014). Klasik laparotomi yöntemi ile aynı hayvanda tekrarlayan embriyo toplama işlemi postoperatif yapışmalara neden olduğundan laparoskopik yöntem tercih edilmektedir. Ancak bu yöntem için de klasik laparatomi yönteminde olduğu gibi hayvanın genel anesteziye alınması, ekipman ve teknik beceriyi gerekmektedir (Gordon 2004, Holtz 2005, Amidiris ve Cseh 2012, Paramio ve Izquierdo 2014). Birçok araştırıcı tarafından keçilerde embriyoların toplanması için hala cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde ise embriyoların toplanması için cerrahi olmayan ve transservikal embriyo toplama teknikleri gibi yöntemler geliştirilmektedir (Flores-Foxworth 2007, Guerra ve ark 2011, Edmondson ve ark 2012). İn vivo üretilen embriyolar normal olarak ovidukta 4.gün, uterotubal bağlantı bölgesine 5.gün ve kornu uteriye 6.günde ulaşmaktadır. Buna göre ilk 4 günlük embriyolar ovidukt, 5 günlük embriyolar ovidukt ve kornu uteriler, 5 günden sonraki embriyolar ise kornu uteriler yıkanarak (flushing) elde edilmektedir (Kaymaz 2012). Bu nedenle embriyonun elde edilmesi sırasında uygulanması gereken teknik; embriyoların elde edileceği güne bağlı olarak değişmektedir. Embriyolar en erken çiftleşmeden sonraki birinci gün, en geç çiftleşmeden sonraki 7-8. günde elde edilebilmektedir (Flores-Foxworth 2007).

Embriyoların cerrahi yöntem ile elde edilmesi

Embriyoların cerrahi yöntem ile toplanmasından 36 saat önce keçilere yem ve su verilmemelidir (Gibbons ve Cueto 2011, Edmondson ve ark 2012). Bu sayede mide içeriğinin geri kaçışı ve aspirasyonu engellenmiş, diyaframa üzerine olan baskısı azaltılmış ve anestezi sırasında hayvanın daha kolay solunum yapması sağlanmış olmaktadır. Ayrıca abdominal gerginlik azalarak uterusun dışarıya alınması ve maniplasyonu daha kolay olmaktadır (Edmondson ve ark 2012).

Bu yöntemde embriyoların elde edilme işlemi genel anestezi altında yapılır. Bu amaçla keçilere xylazine (0,29 mg/kg) ve ketamine (4,4-6,6 mg/kg) uygulanır (Arthur ve ark 1989, Ishwar ve Memon 1996). Ayrıca, 5-12 ml % 2 lidokain ile epidural anestezi de yapılabilir (Amoah ve Gelaye 1991). Hayvanlar önce 20-30 derecelik bir eğim ile sırt üstü pozisyonda baş aşağı yatırılır (Flores-Foxworth 2007, Edmondson ve ark 2012). Genital organların her iki tarafına da kolayca ulaşabilmek için memelerin önünden başlayarak ventral median hat boyunca 15-20 cm uzunluğunda bir ensizyon yapılır (Ishwar ve Memon 1996). Önce ovaryumların süperovulasyon cevabının değerlendilmesi ve daha sonra uterusun yıkanması için kornu uteri ve ovaryumlar ensizyon hattının dışına alınır (Bowen 2003). Kornu uterilerin yıkanması amacıyla yıkama medyumu olarak dengeli çözeltiler (Laktat Ringer solüsyonu), Tissue Culture Medium (TCM 199; Doku Kültürü Vasatı) ya da en yaygın olarak % 1 Fetal Calf Sera (FCS; Fötal Buzağı Serumu) ve % 1 antibiyotik (Penicilin 10000 IU/ml, Streptomycin 1000 mcg/ml) ilave edilmiş Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (D-PBS, pH 7.2) kullanılmaktadır (Amoah ve Gelaye 1991, Ishwar ve Memon 1996, Bowen 2003, Edmondson ve ark 2012). Oviduktlar ve uterus kornularının yıkanması için genellikle 20-50 ml yıkama medyumu kullanılmaktadır (Mellado 2002). Oviduktların yıkaması işlemi sırasında; plastik bir kateter oviduktun fimbriya ucuna yerleştirilir, utero-tubal birleşim yerine ise bir kanül yardımıyla 20 ml uterus yıkama vasatı verilerek embriyoların toplanması işlemi gerçekleştirilir. Uterus yıkaması işlemi sırasında ise; iki yollu bir Foley kateteri (No:8-10) önce uterusun bifurkasyo bölgesinde kornunun proksimaline yerleştirilerek balon kısmı hava ile şişirildikten sonra kornunun utero-tubal birleşim yerinde, lümene 18g'lik bir kanül yerleştirilip ortalama 30-40 ml yıkama vasatının kornu uteri boyunca verilmesiyle yapılır. Yıkama sırasında elde edilen yıkantılar steril plastik petri kaplarına alındıktan sonra bir stereo mikroskop altında inceleme ve sayım yapmak amacıyla kontrol edilir. Kontrol sonrası elde edilen embriyolar taze PBS içeren petrilere aktarıldıktan sonra 37^{o}C'de CO_2'li inkübatörlere alınır (Ishwar ve Memon 1996, Flores-Foxworth 2007, Edmondson ve ark 2012). Operasyon uygulanan hayvanlarda abdominal yapışmaların en aza indirilmesi amacıyla operasyon boyunca dekstran solusyonunun (Dekstran 70' in % 6'lık solusyonundan 50-100 ml) peritoneal boşluk içerisine verilmesi önerilmektedir (Ishwar ve Memon 1996). Uterusun yıkama işlemi tamamlandıktan sonra genital

organlar abdominal boşluğa reddedilerek ensizyon hattı uygun yöntemle kapatılır (Ishwar ve Memon 1996, Bowen 2003). Bu yöntem ile embriyoların geri kazanım oranının ortalama % 85 olduğu bildirilmektedir (Flores-Foxworth 2007).

Cerrahi olmayan yöntem ile embriyoların elde edilmesi

Embriyoların cerrahi olmayan yöntem ile elde edilmesi; ya laparoskopik olarak ya da serviksin bir kateter yardımıyla mekanik olarak gevşemesinin veya prostaglandin E_2 ve östradiol kullanılarak açılmasının sağlanması ile transservikal olarak gerçekleştirilmektedir (Ishwar ve Memon 1996, Guerra ve ark 2011).

Laparoskopik yöntem

Bu yöntemde donör hayvanlar genellikle laparoskopiden 36 saat önce aç ve susuz bırakılır. Laparoskopiden önce hayvana preanestezik olarak atropin sülfat verilir, anestezi için ise önce xylazine (0,22 mg/kg, IM) 5 dk sonra da ketamine hydochloride (11,0 mg/kg, IM) uygulanır. Hayvan önce sırt üstü pozisyonda 45 derece açıyla baş aşağı olarak yatırılır. Laparoskopi uygulanacak bölgede ventral kıllar temizlendikten sonra laparoskopi öncesi peritonal boşluğa yaklaşık 4-5 l CO_2 gazı verilerek pneumoperitoneum oluşturulur. Laparoskopoi sırasında hayvanın ovaryumlarına ait süperovulasyon cevapları değerlendirildikten sonra uterus kornuları tutulur ve takiben linea albaya 2,5 cm'lik bir ensizyon yapılır. Enzisyon hattından dışarıya alıan utero-tubal birleşim yerine yakın kornu uterinin uc kısmına intravenöz kateter (18 gauge) yerleştirilerek yaklaşık 60 ml DPBS verilir, foley kateteri ile de verilen yıkama vasatı geri alınır. Aynı işlemler diğer kornuya da uygulanır ve laparoskop ekipmanları dışarı alındıktan sonra abdominal ensizyon hattı kapatılır (Kraemer 1989, Ishwar ve Memon 1996). Bu teknik ile embriyo toplama oranının %50-80 arasında değişebildiği bildirilmektedir (Flores-Foxworth 2007). Bir hayvanda cerrahi yöntemle embriyo toplama işlemi 2-3 kez uygulanabilirken laparoskopik yöntem ile uygulamaların 7 kez yapılabildiği belirtilmektedir (Paramio 2010).

Servikal yöntem

Cerrahi ve laparoskopik yöntemlerle embriyo elde etme teknikleri koyun ve keçilerde genellikle genital organlar ve ovaryumlarda yapışmalara neden olmaktadır. Bu durum keçilerde embriyoların elde edilmesi amacıyla kullanılacak donör hayvan

sayısını sınırlandırmaktadır. Servikal yöntemde, serviksin prostaglandin E_2 ve östradiol ile gevşemesi sağlandıktan sonra embriyolar serviks yoluyla toplanabilmektedir. Uygulama için, prostaglandin E_2 tabletleri izotonik tuzlu solüsyon ile eritilerek servikse sürülmekte ve aynı zamanda 1 mg östradiol kas içi enjekte edilmektedir. Genel anestezi altında serviks forseps ile geri çekilip kornulara yerleştirilen kateter yardımıyla yıkama işlemi gerçekleştirilmektedir. Prostaglandin E_2 ve östradiolün embriyoların canlılıkları üzerine olumsuz etkilerinin olmadığı belirtilmektedir (Kraemer 1989, Ishwar ve Memon 1996, Flores-Foxworth 2007). Saanen keçilerinde yapılan bir çalışmada servikal yöntem ile uterus yıkanmasının yıkama medyumu ve embriyo geri kazanımı için etkili bir şekilde kullanılabileceği belirtilmektedir (Fonseca ve ark 2013).

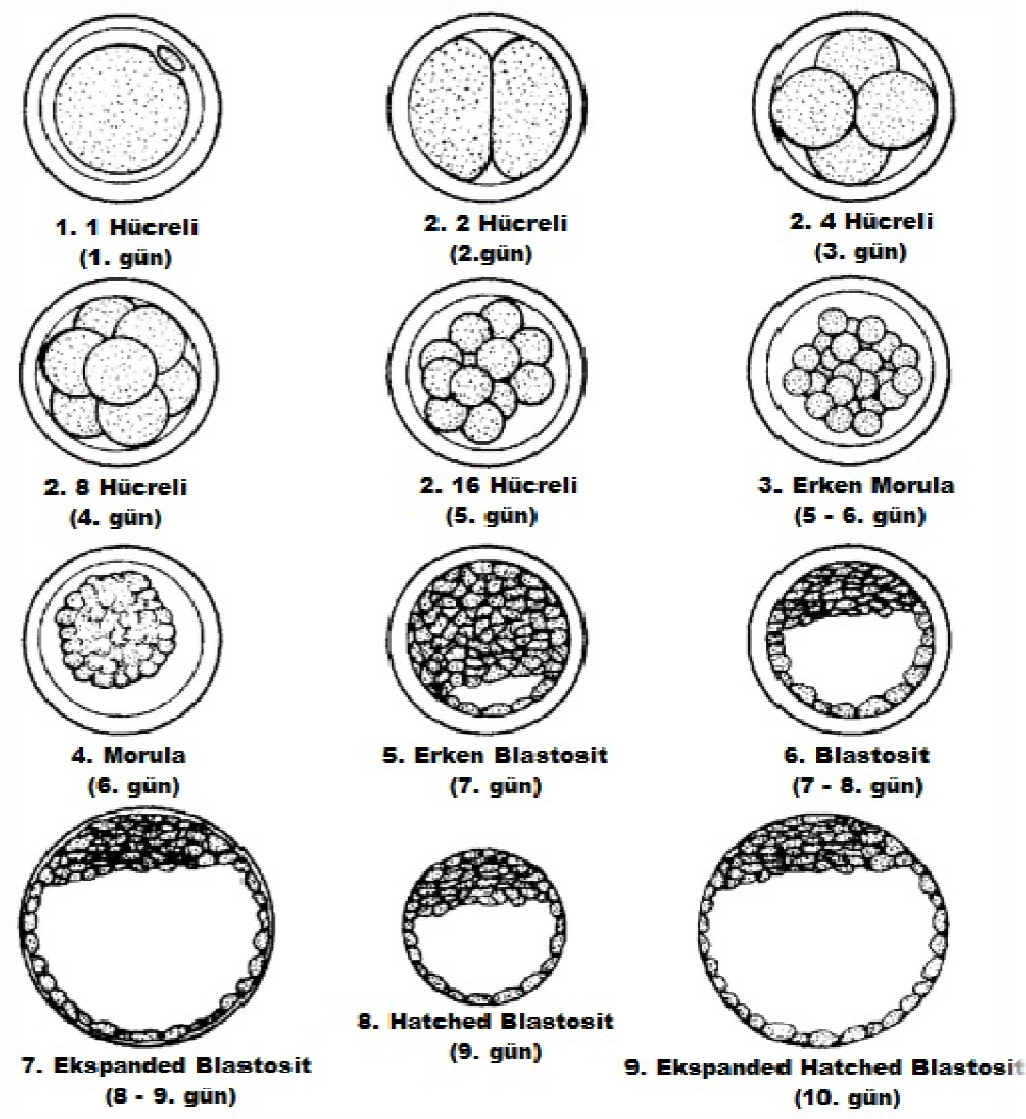
1.4.5.Embriyoların Değerlendirilmesi

Uterusun yıkama işlemi sonrasında toplanan yıkama medyumu, stereo mikroskop altında incelenmektedir ve bulunan embriyolar dondurma ya da taze transfer işlemlerinden önce kaliteleri ve gelişim aşamalarının incelenmesi için % 5-20 FCS' li D-PBS bulunan petrilere alınmaktadır (Edmondson ve ark 2012).

Fertilizasyon sonrasında oosit, tek hücreli embriyo yani zigot aşamasındadır. Daha sonra 2, 4, 8, 16 hücreli embriyo aşamasından morula aşamasına ulaşır. Morula aşaması embriyo içerisinde şekillenen blastosel adı verilen boşluğun ortaya çıkmasına kadar devam eder ve bu aşamadan sonra embriyo blastosist olarak adlandırılır. Morula aşamasında bulunan embriyoya ait hücrelerin şekli küresel formdan poligonal forma dönüşür. Bu dönüşüm kompaktlaşma olarak adlandırılır.

Embriyoların değerlendirilmesi sırasında; 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 mümkün olmaktadır (Gordon 2004, Sağırkaya 2009).

Embriyoların değerlendirilmesi; Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğu'nca öngörülen (IETS) embriyonun gelişim dönemine ve kalitesine göre yapılmaktadır. Embriyoların gelişme dönemi; Unfertilized Oocytes (UFO; Fertilize Olmamış Oosit) veya tek hücreli embriyodan ekspanded hatched blastosist aşamasına kadar yapılmaktadır (Şekil 1.4.5.1) (Çizelge 1.4.5.1) (Amoah ve Gelaye 1991, Tekeli 2005, Robertson ve Nelson 2010, Kaymaz 2012).



Şekil 1.4.5.1. Embriyoların gelişim dönemleri (Robertson ve Nelson 2010).

Çizelge 1.4.5.1. Embriyonun gelişimi aşamalarında numaralandırma ve kısaltmalar (Gibbons ve Cueto 2011,Kaymaz 2012).

No	Gelişim Aşaması	Gün	Uluslar arası Kısaltma
1	Fertilize olmamış	0.gün	UFO
2	2-12 hücreli aşama	1-4.gün	
3	Erken morula	4.gün	M
4	Morula (Kompakt morula)	5.gün	CM
5	Erken blastosist	5.gün	EBl
6	Blastosist	6.gün	Bl
7	Ekspanded blastosist	7.gün	ExpBl
8	Hatched blastosist	8.gün	HedBl
9	Ekspanded hatched blastosist	9.gün	ExpHedBl

Embriyoların kalitesi, numaralandırılarak yapılmakta ve embriyoların morfolojik bütünlüğüne göre sınıflandırılmaktadır. Morfolojik sınıflandırma embriyonun yapısı, sitoplazmanın dansitesi, rengi ve dejenere bölge oranları 1'den 4'e kadar derecelendirilerek yapılmaktadır (Kaymaz 2012).

Grade 1: Çok iyi veya güzel

Embriyo küre şeklinde, gelişim dönemlerine göre uyumlu, blastomerler yuvarlak şekilli, uniform büyüklük, renk ve yoğunluktadır. Hücreler arasındaki düzensizlik çok düşük seviyede, yaşayan embriyonik hücre oranı % 85 ve üzerinde olmaktadır. Zona pelusida yuvarlak olmalı ve katlanmış bir görünümde olmamalıdır (Tekeli 2005, Kaymaz 2012).

Grade 2: İyi

Embriyoda ve blastomerlerin büyüklük, renk ve yoğunluğunda orta seviyede düzensizlikler olabilmektedir. Bu düzensizlikler; embriyo kütlesi dışında kalmış küçük ve az sayıda hücreler veya hafif düzeyde asimetrik şekildir. Embriyoda yaşayan hücre oranı % 50 olmaktadır (Tekeli 2005, Kaymaz 2012).

Grade 3: Sağlıksız

Embriyonik kütlenin şeklinde ya da blastomerlerin büyüklük, renk ve yoğunluğunda fazla miktarda düzensizlikler bulunmaktadır. Bunlar; çok sayıda embriyo kütlesi dışında kalmış hücreler, normalden küçük büyüklük, az miktarda dejenerasyon ve gelişimde bir güne kadar gecikme gibi anormalliklerdir. Embriyonik hücrelerin % 25'i yaşayan hücrelerden oluşmaktadır (Tekeli 2005, Kaymaz 2012).

Grade 4: Ölü veya dejenere

Önemli derecede dejenerasyon, veziküllü hücreler, embriyo hücrelerinin büyüklüklerinde önemli değişiklikler, kompaktlaşmanın gerçekleşememesi ve aynı zamanda embriyonun gelişiminde 2 güne kadar gecikme gibi bozukluklara sahip embriyolar Grade 4'e örnek olarak verilebilmektedir (Tekeli 2005, Sağırkaya 2009). Dejenere embriyolar, oositler ve bir hücreli embriyolar ölü olarak değerlendirilmektedir (Kaymaz 2012).

Gelişim aşamalarına ve morfolojik yapılarına göre sınıflandırılan embriyolar; taze olarak transfer edilebilmekte, dondurularak saklanabilmekte veya ileri biyoteknolojik uygulamalarda (cinsiyet tespiti, embriyonun bölünmesi vb) kullanılabilmektedir (Çizelge 1.4.5.2) (Kaymaz 2012). Embriyoların gelişim aşaması ve morfolojik yapısı transfer veya diğer işlemler için uygun değilse in vitro kültür (% 5 CO_2 ortamındaki inkubatörde 38,5^{o}C'de) yapılarak embriyoların yaşama kabiliyeti ve dejenerasyonu takip edilebilmektedir.

Çizelge 1.4.5.2. Embriyolarda morfolojik yapılarına göre uygulanacak işlemler (Kaymaz 2012).

Morfolojik Yapı	Sınıflandırma	Uygulanacak İşlem
1	Çok iyi	Embriyo transferi (ET) veya dondurma
1	İyi	ET veya dondurma
2	Orta	ET veya dondurma
3	Sağlıksız	Kültür sonrası ET veya dondurma
4	Ölü veya dejenere	Kullanılamaz

1.4.6. Embriyoların Dondurularak Saklanması (Kriyoprezervasyon)

Memeli embriyoların dondurulması şu anda rutin olarak uygulanan bir işlemdir fakat dondurma işleminin etkinliği, embriyonun in vitro veya in vivo üretilmesi, gelişim aşamaları, hayvan türleri gibi nedenlere bağlı olarak önemli farklılıklar gösterebilmektedir (Vajta ve Kuwayama 2006, Gajda ve Smorag 2009). İn vitro üretilen embriyoların in vivo üretilen embriyolara göre dondurma sonrası canlılıklarının daha düşük olduğu (Gajda ve Smorag 2009, Prentice ve Anzar 2011) ve in vitro üretilen embriyoların yüksek lipid konsantrasyonlarına bağlı olarak soğuğa ve dondurmaya karşı daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. Ekspanded ve

hatched blastosistlerin diğer embriyonik gelişim aşamalarına göre daha iyi yaşama oranlarına sahip olduğu belirtilmektedir (Gajda ve Smorag 2009).

İnek, koyun, keçi, at, domuz, tavşan, kedi ve insan embriyoları başarılı bir şekilde dondurulabilmektedir. Ancak embriyoların çözdürme sonrası canlılık oranları türler arsında değişiklikler göstermektedir. İnek embriyoları için bu oran yüksek iken, domuz embriyoları için düşüktür (Palasz ve Mapletoft 1996). Domuz embriyolarının soğuk hassasiyeti gelişimlerinin ileriki aşamalarında azalan intrasellüler lipid içeriğine bağlı olabilmektedir. Lipid içeriğinin dondurulan embriyoların sonraki canlılığını ve soğuk hassasiyetini etkilediği bildirilse de; soğutma ve çözdürme hızları, embriyoların gelişim aşaması ve büyüklüğü, hücrelerin geçirgenlik özelliği, embriyoların ve oositlerin dondurulabilirliğinde şiddetli etkiye sahip kriyoprotektanların ozmotik özelliği ve toksisitesi, gibi birçok faktör de embriyoların çözdürme sonrası canlılık oranlarını etkilemektedir (Palasz ve Mapletoft 1996).

Embriyonun kriyoprezervasyonu, reprodüksiyonun kontrolü için kullanılan yardımcı üreme tekniklerinin en önemli uygulama yöntemlerinden biridir (Uysal 2007). Embriyoların dondurularak saklanması sayesinde, taşıyıcı olarak kullanılan hayvanlarda senkronizasyona gerek duyulmadan yapılan transfer işlemi ile üstün genetik kaynaklardan daha düşük maliyetlerde faydalanılmakta ve hastalıklardan daha rahat bir şekilde korunulabilmektedir. Ayrıca, üstün niteliklere sahip hayvanlardan elde edilen embriyoların dondurularak farklı bölgelere kolayca transfer edilebilmeleri de mümkün olabilmekte ve kurulacak olan embriyo bankası ile nesli tükenmekte olan hayvan ırklarının korunması sağlanabilmektedir (Pereira ve Marques 2008, Gama ve Bressan 2011, Amiridis ve Cseh 2012, Verma ve ark 2012). Dondurulmuş sperma ile sadece babadan gelen genetik özelliklerden yararlanılırken, embriyo ile hem anne hem de babadan gelen genetik özelliklerden yararlanılmaktadır (Sağırkaya ve Bağış 2003, Saragusty ve Arav 2011, Verma ve ark 2012). Embriyoların dondurularak saklanmasında, embriyoyu o andaki haliyle korumak ve çözdürüldüğünde gelişimine kaldığı yerden devam etmesinin sağlanması amaçlanmaktadır (Kaymaz 2012). Embriyoların düşük ısılarda korunmasında hücre içi enzim aktivitesi, hücresel respirasyon, metabolizma, gelişim ve bölünme gibi olaylar durmaktadır. Böylece embriyonun uzun süre yaşama yeteneğine zarar

vermeden ve genetik bozukluklar oluşmadan korunması sağlanabilmektedir (Kaymaz 2012).

Embriyo dondurmatekniğinin aşamaları;

1. Kriyoprotektan maddelerin ilave edilmesi ,
2. Embriyonun soğuması ile buz oluşumunun uyarılması, sıvı azot içerisinde dondurulması ve depolanarak saklanması,
3. Embriyonun çözdürülmesi,
4. Kriyoprotektanların uzaklaştırılması, şeklinde sıralanmaktadır (Fahning ve Garcia 1992).

Kriyoprotektanlar

Dondurma ve çözdürme işlemleri sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddelere kriyoprotektan adı verilmektedir (Sağırkaya ve Bağış 2003, Pereira ve Marques 2008, Gibbons ve Cueto 2011). Kriyoprotektanlar, hücrenin dondurulması sırasında oluşan soğuk şoku zararları, intrasellüler kristal oluşumu ve çözdürme esnasında dekristalizasyona karşı embriyoların korunması amacıyla kullanılmaktadır (Arthur ve ark 1989, Palasz ve Mapletoft 1996, Noakes ve ark 2001, Bucak ve Tekin 2007). Embriyolar dondurulma işleminden önce kriyoprotektanlarla inkubasyona bırakılır, çünkü kısmen dehidrasyonu sağlanarak ya da içerdiği su oranı azaltılarak (intrasellüler bakımdan dengelenerek), ısının düşmesi sırasında meydana gelecek buz kristallerinin sitoplazmik yapılara zarar vermesinin engellenmesi amaçlanmaktadır (Dobrinsky 2002, Bucak ve Tekin 2007, Gibbons ve Cueto 2011, Kaymaz 2012). Kriyoprotektif solüsyonlar genellikle pH'sı 7,2-7,4 arasında olan buffer medyumlar (tampon medyum) ile hazırlanmaktadır. Çoğunlukla D-PBS kullanılmasına rağmen TCM-199 gibi embriyo kültür medyumu ya da sadece fizyolojik tuzlu solüsyonlar da başarıyla kullanılabilmektedir (Palasz ve Mapletoft 1996, Prentice ve Anzar 2011).

Kriyoprotektanlar; hücre membranından geçebilen, hücre içine nüfuz edebilen (permeating) intrasellüler kriyoprotektanlar ve hücre membranından geçemeyen, hücre içine nüfuz edemeyen (non-permeating) ekstrasellüler kriyoprotektanlar olarak iki ayrı grupta incelenmektedir (Kanagawa ve ark 1995, Bucak ve Tekin 2007, Pereira ve Marques 2008, Gibbons ve Cueto 2011).

İntrasellüler kriyoprotektanlar

Bu özellikteki kriyoprotektanlar düşük molekül ağırlığına sahip, hücreye penetre olarak hücrenin dehidrasyonunu sağlayan ve sitoplazmanın korunmasına yardımcı olan kimyasallardır. Bu özellikteki kriyoprotektanlar; gliserol (G), etilen glikol (EG), dimetilsülfoksit (DMSO), propilen glikol (PG), 1-2-propanediol, polietilen glikol (PEG) gibi kriyoprotektanlardır (Bucak ve Tekin 2007, Pereira ve Marques 2008, Kaymaz 2012). Donma işlemi gerçekleşmeden önce, kriyoprotektan maddeler ozmotik basınç farkı ile embriyo hücreleri içerisindeki sıvı ile yer değiştirir. Böylelikle hücre hacmindeki değişiklik azalmış olup, embriyo hücreleri içindeki buz kristalleri oluşumunun minimum düzeyde gerçekleşmesi sağlanmış olur (Noakes ve ark 2001, Sağırkaya ve Bağış 2003, Gibbons ve Cueto 2011, Verma ve ark 2012). Kriyoprotektan olarak DMSO ya da G ile de başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen, EG' nin en uygun kriyoprotektan olduğu bildirilmektedir. (Gordon 2004, Holtz 2005, Aminoor-Rahman ve ark 2008, Gibbons ve Cueto 2011). Etilen glikol, moleküler ağırlığının daha düşük olması ve bu yüzden yüksek permeabilite özelliği göstermesi nedeniyle intrasellüler yapıdaki tüm hücre membranını korumaktadır ve toksisitesi diğerlerine göre daha düşüktür (Bautista ve Kanagawa 1998, Massip 2001, Saragusty ve Arav 2011). Gliserol veya DMSO yüksek oranda tuz içerdiklerinden embriyotoksik etkilidir ve ozmotik basınçları da daha yüksektir (Kaymaz 2012).

Ektrasellüler kriyoprotektanlar

Bu özellikteki kriyoprotektanlar, yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Bu kimyasallara örnek olarak; makromoleküller [polivinilprolidon (PVP), dekstran, bovine serum albumin (BSA), mannitol, sorbitol, fikol] ve sakkaritler (laktoz, sukroz, glukoz, fruktoz, trehaloz, rafinoz) verilmektedir (Bucak ve Tekin 2007, Pereira ve Marques 2008, Kaymaz 2012). Şekerler, dondurma çözdürme sırasında hücreye penetre olmadan hücreler arası suyu çekerek hücre zarı ve sitoplazmasını korumaktadır (Arthur ve ark 1989, Kaymaz 2012). Bu tip kriyoprotektanlar, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip, yüzey artışı sağlayarak koruma sağlamakta ve çözdürme işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (Bucak ve Tekin 2007). Makromoleküller, hücrelerin dondurma ve çözdürme işlemleri sırasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız

olacak şekilde değiştirerek, sakkaritler ise oluşan buz kristallerini azaltmadaki etkilerini hücreleri dehidre ederek göstermektedir (Sağırkaya ve Bağış 2003).

Embriyoların dondurulması için kullanılan yöntemler; geleneksel yavaş dondurma (slow-freezing), hızlı dondurma (rapid-freezing) ve vitrifikasyon'dan oluşmaktadır (Fahning ve Garcia 1992, Uysal 2007, Amiridis ve Cseh 2012).

Geleneksel yavaş dondurma (Slow-freezing)

Slow freezing; standart, geleneksel veya dengeli (equilibrium) dondurma ya da yavaş veya kontrollü dondurma yöntemi olarak da isimlendirilmektedir (Kaymaz 2012). Geleneksel kriyoprezervasyonda embriyolar, daha düşük konsantrasyondaki kriyoprotektanlarla, programlanabilir bir dondurma cihazı yardımıyla yavaş dondurma prosedürü uygulanarak dondurulmaktadır (Uysal 2007).

Bu yöntemle dondurma işleminin aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. Embriyo; hücre içine nüfuz edebilen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanların değişik molar konsantrasyonundaki solüsyonuna, oda ısısında 10-30 dakika maruz bırakılır. Bunun amacı, kriyoprotektan ile embriyo arasındaki ozmotik dengeyi (ekilibrasyon) sağlamaktır.
2. Payet içinde bulunan embriyo, özel dondurma cihazına alınarak -5 / -7^{o}C'de buz kristali oluşumunun başlatılması (ice-seeding) sağlanır.
3. Buz kristali oluşumu tamamlandıktan sonra dondurucunun, ısısı dakikada ortalama 0,3-0,6^{o}C olacak şekilde -30 / -35^{o}C'ye kontrollü bir şekilde düşürülerek donma işlemi gerçekleştirilir.
4. Daha sonra embriyonun da içinde bulunduğu payet, muhafaza edilmek üzere -196^{o}C' deki sıvı azot içerisine alınır (Fahning ve Garcia 1992, Noakes ve ark 2001, Gibbons ve Cueto 2011, Saragusty ve Arav 2011).

Slow freezing yönteminde kryoprotektif ajanlar düşük oranlarda (~1,5 M = %10) kullanılmaktadır (Amoah ve Gelaye 1991, Fahning ve Garcia 1992, Bucak ve Tekin 2007). Önceleri kriyoprotektan ajan olarak DMSO ve gliserol (1,35-1,5 M) kullanılırken, daha sonraları daha düşük molekül ağırlıklı ve dondurma çözdürme sırasında hücrelerde osmotik basınç değişikliklerine neden olmayan etilen glikol kullanım alanı bulmuştur (Massip 2001, Aminoor-Rahman ve ark 2008, Saragusty ve

Arav 2011, Kaymaz 2012). Ancak bu yöntemde embriyolar, kryoprotektanların toksik etkisine uzun süre maruz kalmakta ve dondurma sırasında intrasellüler buz kristali oluşumundan dolayı embriyo zarar (zona pellusida' da kırılma, hücre membranlarında bozulma gibi) görmektedir (Uysal 2007).

Hızlı dondurma (Rapid-freezing)

Hızlı dondurma yöntemi; embriyonun yüksek donma hızlarının uygulanmasına maruz kalmasından önce hücrelerin kısmen dehidre edildiği dondurma yöntemi olarak tanımlanmaktadır (Sağırkaya ve Bağış 2003). Hızlı dondurma yönteminde kriyoprotektan olarak hücre içine nüfuz edebilen ve edemeyen kriyoprotektanlardan oluşan karışımlar (1,5 M gliserol+ 1,0 M sukroz solüsyonu vb) kullanılmaktadır (Fahning ve Garcia 1992, Sağırkaya ve Bağış 2003). Embriyolar, işlem sırasında dehidre olmaları sağlandıktan sonra sıvı azot buharında 5 dk tutulmaları sonrası sıvı azot içerisine alınmaktadır. Bu yöntem pratikte çok fazla kullanılmamaktadır (Kaymaz 2012).

Vitrifikasyon

Hücrelerin, doku ve organların düşük sıcaklıklarda, hücre içerisinde tamamen vitröz ya da camsı bir durumun oluşturulmasıyla dondurulması işlemi vitrifikasyon olarak adlandırılmaktadır (Palasz ve Mapletoft 1996, Bautista ve Kanagawa 1998, Sağırkaya ve Bağış 2003, Vajta ve Kuwayama 2006). Vitrifikasyon yöntemi; yüksek oranda kryoprotektanlarla (>%40 = ~6-8 M) konsantre edilmiş, dolayısıyla viskozitesi artırılmış vitrifikasyon solüsyonunda (kryoprotektan solüsyonu) buz kristalizasyonu oluşumunun önlenmesi için hızlı dondurma (soğutma) oranları uygulanarak embriyoların cam benzeri bir yapıda dondurulması işlemidir (Kanagawa ve ark 1995, Massip 2001, Uysal 2007, Aminoor-Rahman ve ark 2008, Gibbons ve Cueto 2011). Vitrifikasyon, 0,25 ml'lik payetlerin, yüksek donma hızında (2500^{o}C/dakika) sıvı azot içerisine direkt olarak daldırılmasıyla sağlanmaktadır. Ancak, bu tekniğe alternatif olarak geliştirilen "open pulled straw" (OPS) tekniği (açık ucundan yaklaşık olarak 1 µl kriyoprotektan solüsyonu ile embriyonun payete yüklenmesi) ile dondurma oranı -20.000^{o} C/dakika' leri geçmektedir (Vajta 2000, Noakes ve ark 2001, Amiridis ve Cseh 2012, Kaymaz 2012). Yeni çalışmalarda da daha uygun ve daha iyi sonuçların yüksek güvenlikli vitrifikasyon teknikleri (pipet tip, fiber flug, vitrifikasyon spatulası, Cryo-E, sealed

pulled straw, plastic blade, Vitri-Inga, Cryopette, Rapid-i) ile sağlanabildiği belirtilmektedir (Vajta ve Kuwayama 2006, Gajda ve Smorag 2009, Prentice ve Anzar 2011, Verma ve ark 2012). Bu teknikler, yüzey ve boru teknik olarak ayrılmaktadır. Yüzey tekniği; EM grid, minumum drop size, Cryotop, Cryloop, Hemi-Straw, solid surface, nylon mesh, Cryoleaf, direct cover vitrification, fiber plug, vitrification spatula, Cryo-E, plastic blade ve Vitri-Inga' dan oluşmaktadır. Boru tekniği ise; OPS, closed pulled straw, flexipet-denudin pipette, superfine OPS, CryoTip, pipette tip, high-security vitrification device, sealed pulled straw, Cryopette, Rapid-i, JY Straw tekniklerini kapsamaktadır. Yüzeysel metotlarda eğer embriyonun içinde olduğu damlacığın boyutu (~ 0,1 µl) kontrol edilebilirse, yüksek dondurma hızı sağlanabilmektedir. Çünkü bu sistem açık olduğu için, yüksek çözdürme oranları çözdürme solüsyonları ile direkt temas yoluyla sağlanabilmektedir. Boru metodları ise yüksek dondurma oranları sağlaması bakımından avantajlıdır. Böylece kullanımı kolay ve güvenlir olmaktadır. Vitrifikasyonda volümün azaltılması ve soğutma oranının artırılması kriyoprotektan konsantrasyonunda orta düzeyde bir azalmaya olanak sağlar. Böylece kriyoprotektanların toksik ve osmotik yan etkileri minimize edilir (Saragusty ve Arav 2011).

Vitrifikasyonun uzun zamandan beri geleneksel kriyoprezervasyon yöntemine alternatif olduğu bilinmektedir (Vajta ve Kuwayama 2006, Uysal 2007, Gajda ve Smorag 2009). Vitrifikasyon yönteminin; basit bir yöntem olması, düşük maliyetli olması, uygulamasının kısa bir zaman alması, herhangi bir özel ekipman gerektirmemesi, rutine çok kolay adapte edilmesi ve embriyonun donması sırasında buz kristallerinin oluşumunu baskılaması gibi bir çok avantajları bulunmaktadır. (Vajta 2000, Noakes ve ark 2001, Cognie ve ark 2003, Flores-Foxworth 2007, Gajda ve Smorag 2009, Saragusty ve Arav 2011, Verma ve ark 2012). Bunun yanında dondurma tekniğine bağlı olarak çözdürme sırasında stereo mikroskopa gerek duyulması, kriyoprotektanların uzaklaştırılması için farklı molaritelerde dilüsyon solüsyonuna ihtiyaç duyulması, kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonda (geleneksel yavaş dondurmada kullanılanların yaklaşık 2-3 katı) olması nedeniyle embriyotoksik etki göstermesi gibi dejavantajları da bulunmaktadır (Vajta 2000, Saragusty ve Arav 2011, Kaymaz 2012).

Buz kristallerinin oluşumunun donma aşamasındakine göre çözdürmede daha hızlı şekillendiği bildirilmektedir (Sağırkaya ve Bağış 2003). Sulu solüsyonlarının dondurma ve çözdürme işlemleri boyunca camsı bir faz şekillendirdiği etilen glikol, propilen glikol, polietilen glikol ve 2-3 bütanediol gibi kriyoprotektanlar aynı zamanda gliserolle karıştırıldığında hücrelere çok daha hızlı penetre olduğu için, bu kriyoprotektanların vitrifikasyonda kullanılan ideal kriyoprotektanlar olduğu bildirilmektedir (Gal ve ark 1993, Sağırkaya ve Bağış 2003, Çetin 2004). Embriyoların dondurulmasında geneleksel dondurma teknikleri kullanılırken çoğunlukla gliserol, etilen glikol, propanediol gibi tek kriyoprotektan madde kullanılırken; hızlı dondurma ya da vitrifikasyonda ise kriyoprotektanlar gliserol ve etilen glikol, gliserol ve propanediol şeklinde kombinasyonlar yapılarak kullanılmaktadır (Palasz ve Mapletoft 1996, Prentice ve Anzar 2011).

Kriyoprotektanların toksik etkilerinin en aza indirilebilmesi için ekilibrasyon zamanının kısaltılması, iki aşamalı ekilibrasyon ve toksisiteyi azaltmak için sukroz, trehaloz, formamid ve farinoz gibi maddelerin kullanılması önerilmektedir (Palasz ve Mapletoft 1996, Vajta 2000, Massip 2001). Vitrifikasyon yöntemiyle dondurmada vitrifikasyon solüsyonuna 0,4 M sukroz ilave edilerek yapılan bir çalışmada çözdürme sonrası transferde elde edilen sonuçların %27' den %56' ya çıktığı bildirilmektedir (Guignot ve ark 2006). Vitrifikasyon yönteminde, embriyolar farklı konsantrasyondaki vitrifikasyon solüsyonlarıyla (VS1,VS2,VS3) ekilibrasyona tabi tutulmaktadır. Ekilibrasyonun ilerleyen her bir aşamasındaki kriyoprotektan madde konsantrasyonu, diğerine göre daha yüksek olup bu nedenle, embriyo üzerinde oluşabilecek toksik etkilere karşı ekilibrasyon süreleri de konsatrasyon arttıkça azalmaktadır (Kaymaz 2012). Embriyoların VS1 ve VS2 solusyonları içerisinde kalma süresi 3 dakika iken VS3 solusyonunda kalma süresi 30 saniyedir. Keçi embriyolarının vitrifikasyonu sırasında kullanılan solusyonlar içerisinde bulunan kriyoprotektan maddeler; VS1'de % 20 EG, VS2'de % 10 G + % 20 EG, VS3'te % 25 G + % 25 EG olarak bildirilmektedir (Pereira ve Marques 2008, Gibbons ve Cueto 2011, Kaymaz 2012).

İn vivo olarak üretilen embriyoların vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözdürüldükten sonraki transfer işlemlerinde gebelik oranlarının ineklerde %60-70, koyunlarda %65-75 ve keçilerde %60-70 olduğu; in vitro olarak üretilenlerde ise

ineklerde %40-50, koyunlarda %25-35 ve keçilerde %30-40 olduğu belirtilmektedir (Youngs 2011).

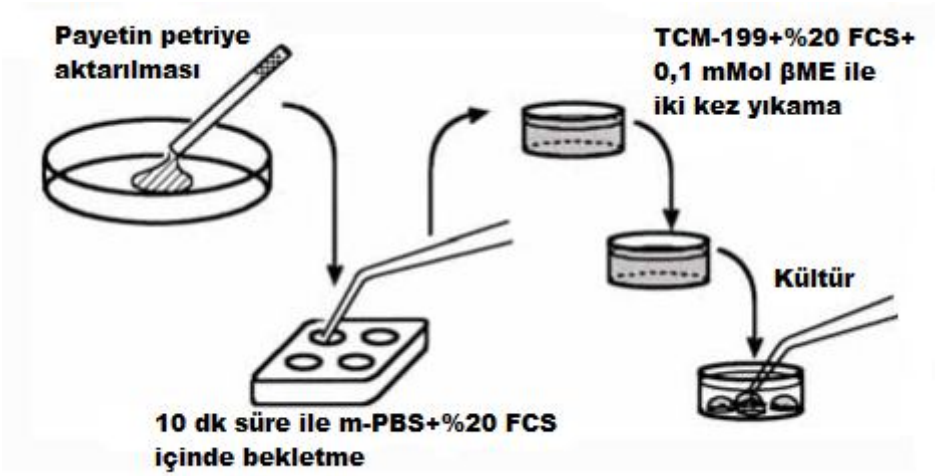
Vitrifikasyon uygulamaları için embriyonun en uygun gelişme döneminin blastosist aşaması olduğu bildirilmektedir (Fahning ve Garcia 1992, Massip 2001, Holtz 2005, Gama ve Bressan 2011, Morato ve ark 2011). In vitro üretilmiş embriyoların da dondurma sonrası yaşama oranlarının embriyonun gününden çok embriyonun gelişim aşaması ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir. Slow freezing, rapid freezing ya da vitrifikasyon yöntemi ile dondurmada, embriyoların yaşama oranlarında blastosistlerin morula aşamasındaki embriyolara göre daha iyi olduğu ifade edilmektedir (Palasz ve Mapletoft 1996, Al Yacoub ve ark 2010). İn vitro ortamda üretilip çözdürülen keçi embriyolarında blastosistlerin yaşama oranı %61, in vivo ortamdaki blastosistler içinse embriyo yaşama oranları %64-70 olarak bildirilmektedir (Gibbons ve Cueto 2011). Yapılan bir çalışmada geleneksel yöntem ile dondurulup çözdürülen blastosist aşamasındaki embriyolarla elde edilen gebelik oranının %50, embriyo yaşama oranının %42 olduğu, vitrifikasyon ile ise bu oranların %93 ve %64 olduğu belirtilmektedir (El-Gayar ve Holtz 2001). İn vivo üretilen koyun embriyolarında slow freezing, vitrifikasyon ve OPS vitrifikasyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada gebelik ve embriyo yaşama oranlarının sırasıyla; slow freezing' de %68,4; %44,7, vitrifikasyonda %50,0; %33,3 ve OPS' de %54,5; %36 olduğu, aralarında önemli bir fark olmadığı ifade edilmektedir (Bettencourt ve ark 2009).

One-step kriyoprotektan solüsyonuyla vitrifiye edilerek dondurulan ve çözdürülen embriyolarda gebelik oranları ineklerde %40-55 koyunlarda %52 olarak bildirilmektedir (Palasz ve Mapletoft 1996). One-step, two-step ve OPS metotlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, dondurma sonrası çözdürülen keçi embriyolarının transferi sonrasında elde edilen kuzulama oranlarında two-step ve OPS straw methodlarının daha başarılı olduğu ifade edilmektedir (Hong ve ark 2007).

1.4.7. Embriyoların Çözdürülmesi

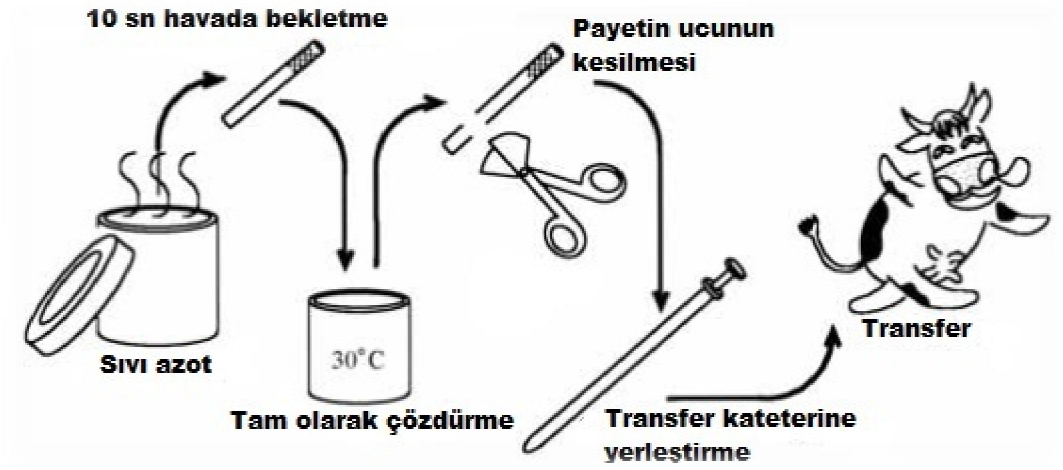
Embriyoların çözdürülmesi işlemi (thawing), embriyoyu taşıyan payetlerin sıvı azot tankından çıkartıldıktan sonra 10 saniye süreyle havada tutulup, 20-30 saniye süreyle de 30^{o}C'deki suyun içerisine atılması ile gerçekleştirilmektedir (Rall

1992, Kanagawa ve ark 1995, Massip 2001, Kobayashi 2007, Gibbons ve Cueto 2011). Çözdürme işlemi sadece havada yapılırsa çözdürme sonrası embriyonun yaşam kalitesi azalmakta, sadece suda yapılırsa ise zona pelusida hasarı ile karşılaşılmaktadır (Fahning ve Garcia 1992, Kaymaz 2012). Kriyoprotektan maddelerin zararlı etkilerini önlemek için bu maddelerin hızlı bir şekilde embriyodan uzaklaştırılması gerekmektedir (Sağırkaya ve Bağış 2003). Çözdürme işlemi sırasında hücre membranın zarar görmemesi için; hücre membranını stabilize ederek kriyoprotektan maddenin hücre dışına çıkması sırasında hücreye zarar vermesini engelleyen BSA, Beta-merkaptoetanol (βME), Linoleik asit albümin (LAA) gibi membran koruyucuların çözdürme solusyonunda bulunması gerekmektedir (Kaymaz 2012). Kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılması için sukroz, trehaloz veya galaktoz gibi hücre içine nüfuz edemeyen şekerler kullanılmaktadır. Bu maddeler ortamda iken kriyoprotektif madde, yoğunluk farkı ile hücre dışına çıkmaktadır. Bu işlem tek veya üç kademeli olarak yapılmaktadır (Massip 2001, Sağırkaya ve Bağış 2003). Payetteki embriyo dondurma solüsyonu içerisinde bulunan 1 molar konsantrasyonundaki sukroz, dondurma işlemleri sırasında embriyo ile temas halinde değildir, ancak çözdürme işlemi sırasında embriyo ile temasta olması embriyo için toksisite riski oluşturmaktadır. Sukrozun ortamdan uzaklaştırılması için payet çözdürüldükten sonra embriyo sırayla 0,5 ve 0,25 M'lık sukroz çözeltilerinde dilüe edilmektedir (Rall 1992, Kanagawa ve ark 1995, Gibbons ve Cueto 2011, Kaymaz 2012). Çözdürme işleminden sonra embriyolar kültür medyumuna alınıp inkübasyona bırakılmaktadır (Şekil 1.4.7.1) (Kobayashi 2007).



Şekil 1.4.7.1. Kriyoprotektanların dilüsyonu ve embriyo kültür metotu (Kobayashi 2007).

Embriyolar, one step metot ya da direkt transfer metotları ile dondurulmuşsa çözdürülürken farklı dilüsyonlardaki solüsyonlara gerek olmamakta ve çözdürme işleminden hemen sonra transfer edilebilmektedir. Embriyo gliserol kullanılarak dondurulmuşsa transferden önce kriyoprotektan maddenin uzaklaştırılması gerekmektedir. Dondurmada gliserol ile sukroz birlikte kullanılmışsa dilüe edilmesine gerek kalmamaktadır. Dondurma işlemi için etilen glikol kullanılmış ise etilen glikol uterusta dilüe olabildiği için herhangi bir dilüsyon işlemine gerek kalmadan embriyo direkt transfer edilebilmektedir (Şekil 1.4.7.2) (Saragusty ve Arav 2011, Youngs 2011, Kaymaz 2012).



Şekil 1.4.7.2. Transfer için embriyonun çözdürülmesi (Kobayashi 2007).

Küçük ruminantlar için embriyoların anaerobik şartlarda in vitro kültürlerinde başarı ile kullanılan; TCM 199, B2, Potasyum Simplex Optimize Medyumu (KSOM), Sydney IVF Blastosist Medyumu gibi farklı birçok embriyo kültür medyumu olmasına rağmen en yaygın kullanılan medyumun Synthetic Oviduct Fluid (SOF; Sentetik Ovidukt Sıvısı) olduğu bildirilmektedir (Paramio 2010, de Souza-Fabjan ve ark 2014). Öncelikli olarak koyun embriyolarında kullanılan SOF medyumu, daha sonra inek, domuz ve keçi gibi türlere adapte edilerek kullanılmıştır. Değişken embriyo gereksinimlerine daha adapte olan ardışık medyumlar da (G1.2/G2.2, CR 1 aa) küçük ruminantlar için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Medyumlar kültür için uygun şekle getirildikten sonra (1 µl/embriyo) embriyonun sınırlanmasının sağlanması için mineral yağ ile kaplanmaktadır. Küçük ruminantlar da dahil bir çok ırkta büyük yavru sendromu ile ilişkilendirilmesine rağmen

genellikle çeşitli protein kaynakları (BSA, FCS, büyüme faktörü) embriyo gelişim medyumuna ilave edilmektedir (de Souza-Fabjan ve ark 2014).

İn vitro ortamda üretilen koyun embriyolarında blastosistlerin transferinden sonra yavrulama oranının, kültürde yalnızca SOF kullanılan medyum ile %44; SOF+FCS kullanılan medyum ile %80 oranında olduğu belirtilmektedir (Cognie 1999).

İn vitro olarak üretilen blastosist verimi ve vitrifikasyondan sonraki kaliteleri üzerine kültür sistemlerinin etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada; bir grupta SOF diğer grupta ise TCM 199-granuloza hücreleri (TCM199-GCM) kullanılmış, in vivo ortamda üretilen blastosistler ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Bu çalışmada; vitrifikasyon sonrası 72. saatte yaşama oranlarının in vivo üretilen blastosistlerde, in vitro üretilen blastosistlere göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir (Dobrinsky 2002).

Sunulan tez çalışmasında, üreme sezonu içinde bulunan Saanen ırkı keçilerde, süperovulasyon sonrası elde edilen embriyoların kalite değerlendirmesi, sonrasında kaliteli embriyoların vitrifikasyon yöntemiyle dondurularak çözdürülmelerini takiben viyabilitelerinin (canlılıklarının) değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Sunulan doktora tez çalışması, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun 20.04.2011 tarih ve 2011/45 sayılı onayı ile yapılmıştır.

2.1. Materyal

Projenin hayvan materyalini; sağlıklı ve fertil, 2-3 yaş aralığında ve farklı ağırlıktaki (ortalama 40-65 kg) 15 Saaanen ırkı keçi ve 2 adet teke oluşturdu. Keçilerin bakım ve beslenmesi Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği' nde gerçekleştirildi. Çiftlik $36^0 52'$ N $32^0 29'$ E koordinatlarında bulunmaktaydı. Çalışmada materyal olarak; aynı hayvanlara aşım sezonu içerisinde uygulanan senkronizasyon ve süperovulasyon sonrası keçilerden elde edilen 101 adet embriyo kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Klinik Muayene

Tüm keçilerin eşkalleri (yaş, vücut ağırlığı, cinsiyet vb.) kaydedildikten sonra genel fiziksel ve klinik muayeneleri yapıldı.

2.2.2. Senkronizasyon Protokolü

Senkronizasyon ve süperovulasyon prokotokolü için keçiler her birinde üç keçi olacak şekilde beş gruba ayrıldı. Senkronizasyon ve süperovulasyon protokolü her keçiye sezon içinde olacak şekilde iki sezon uygulandı. Birinci sezonda 15 hayvana bir kez, ikinci sezonda ise aynı hayvanların 13'üne bir kez süperovulasyon ve uterus yıkama işlemi uygulandı.

Senkronizasyon protokolü için aşım sezonu içinde östrus siklusunun hangi döneminde olduğuna bakılmaksızın; her keçiye 40x30 mm ebadındaki beyaz renkli silindirik poliüretan progesteron (20 mg Flugeston asetat; Chronogest CR, İntervet, Fransa) içeren süngerler özel adaptörü vasıtasıyla intravaginal olarak uygulandı. Süngerler 11 gün süre ile vaginada tutuldu. Süngerlerin vaginadan uzaklaştırılmasını takiben 24. saatte tüm keçiler klinik olarak östrus davranışları (meleyerek tekeye ilgi gösterme, birbirleri üzerine atlama, sık sık idrar yapma, kuyruk sallama, aşıma izin verme) yönünden gözlemlendi.

2.2.3. Süperovulasyon Protokolü

Süngerin intravaginal olarak uygulandığı gün sıfırıncı gün olarak kabul edildi ve keçilere senkronizasyon protokolünün 9. gününden başlanarak süperovulasyon amacıyla 3 gün süreyle azalan dozlarda (2,5; 1,5; 1ml) sabah/akşam olmak üzere toplam 200 mg FSH (400mg/20ml NIH-FSH-P1; Folltropın-V®, Bioniche, İrlanda) kas içi (IM) enjeksiyon şeklinde uygulandı. Follikül uyarıcı hormon uygulamasının başladığı aynı gün sabah 2,2 ml $PGF_2\alpha$ (263 µg/1ml Cloprosterol sodium; Estrumate, İntervet, Almanya) IM olarak uygulandı. Protokolün 11. günü intravaginal sünger vaginadan çıkartıldı ve 12. gün sabah 2 ml GnRH (0,0042 mg/1ml Buserelin acetate; Receptal®, Intervet, Almanya) IM olarak uygulandı. Gonadotropin salınım hormonunun uygulamasından 4 saat sonra keçilere sabah/akşam olmak üzere iki kez doğal aşım yaptırıldı (Ağaoğlu ve ark 2014). Keçiler embriyoların toplanması için ilk aşımı izleyen 7. günde uterus yıkaması yapılmak üzere operasyona alındı (Çizelge 2.2.3.1). Uterus yıkama işlemi klasik yöntem olan laparotomi yöntemi uygulanarak gerçekleştirildi.

Çizelge 2.2.3.1. Keçilere uygulanan süperovulasyon protokolü (Ağaoğlu ve ark 2014).

Gün	Yapılan işlem
0. gün	İntravaginal sünger uygulanması
9. gün	Sabah 2,2 ml $PGF_2\alpha$ (IM),
	Sabah / akşam 2,5 ml FSH (IM)
10. gün	Sabah / akşam 1,5 ml FSH (IM)
11. gün	İntravaginal süngerin uzaklaştırılması
	Sabah / akşam 1 ml FSH (IM)
12. gün	Sabah 2 ml GnRH (IM)
	GnRH'dan 4 saat sonra doğal aşım
19. gün	Uterusun yıkanması

2.2.4. Laparotomi Yöntemi ile Embriyoların Elde Edilmesi

Embriyoların elde edilmesinden önce tüm keçiler 12 saat süreyle aç bırakıldı. Laparotomi işlemi genel anestezi eşliğinde gerçekleştirildi. Keçilere genel anestezi öncesi sedasyon sağlamak amacıyla 0,22 mg/kg dozunda xylazine (23,3 mg/1ml ksilazin hidroklorür; Xylazinbio %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) ve genel anestezi

için 2 mg/kg dozunda ketamin HCl (100 mg/1ml ketamin hidroklorür; Ketasol %10, Richter Pharma, Avusturya) IM olarak uygulandı.

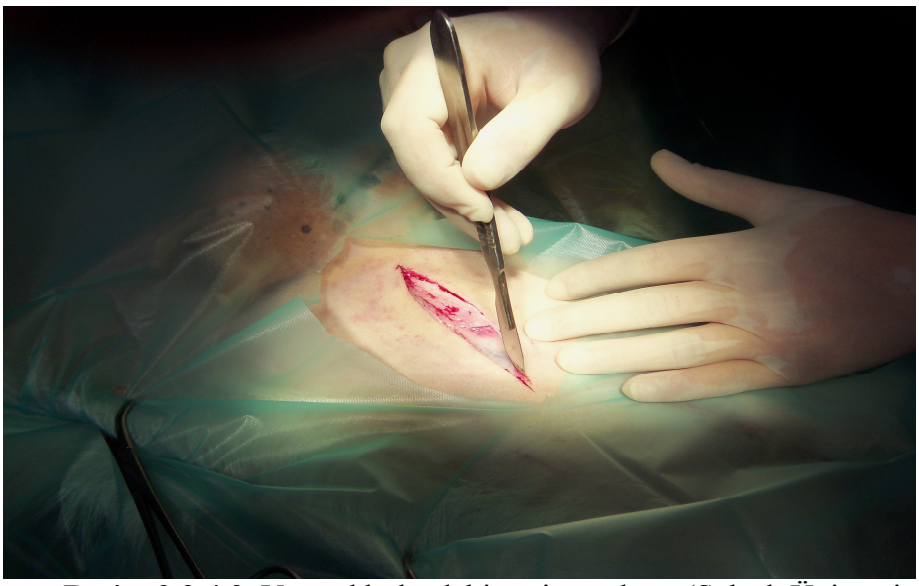
Keçiler sırt üstü pozisyonda 20-30 derecelik bir eğim ile başı aşağıda olacak şekilde yatırıldı (Resim 2.2.4.1). Daha sonra operasyon bölgesi olan memenin karın duvarıyla birleşim yerinden, göbek deliğine kadar olan kısımın dezenfeksiyonu yapıldı. Paramedian hattan ensizyon yapılmadan önce lokal infiltrasyon anestezi için, 5 ml lidokain (20 mg/ml lidokain HCl; Adokain, Sanovel, İstanbul) operasyon hattına uygulandı. Memelerin hemen önünden başlanarak ventral median hat boyunca 15-20 cm uzunluğunda ensizyon yapıldı (Resim 2.2.4.2). Karın boşluğuna girilip ovaryumlar ve uterus kornuları ensizyon hattının dışına alındı (Resim 2.2.4.3). Ovaryumlar üzerindeki CL ve folliküller sayılarak kaydedildi. Yıkama işlemi için iki yollu silikon foley kateteri (8-10 ch, 5-15 ml; Foley kateteri, Bıçakcılar, İstanbul) kullanıldı. Foley kateteri uterusun korpus bölgesindeki damarsız bir bölgeden küt olarak açılan noktadan lümene doğru yönlendirildikten sonra uterus kornularına sırasıyla yerleştirildi (Resim 2.2.4.4). Utero-tubuler birleşim bölgesine ise intravenöz kanül (18 G, IV kanül; Bıçakçılar, İstanbul) uygulandı (Resim 2.2.4.4). Önceden yerleştirilen foley kateterinin balonu bir enjektör yardımıyla 10-15 cc hava ile şişirildi ve daha sonra kateterin stilesi çıkartıldı. Kornunun uç kısmına yerleştirilen intavenöz kanül yardımıyla 2 kez yıkıma şeklinde 40 ml (20+20) yıkama medyumu [% 1 fötal calf serum (500ml; C8056, FCS, Sigma, USA) ilave edilmiş TCM 199 (500ml; M 7528, Sigma, USA)] yavaş bir şekilde lümene verildi (Resim 2.2.4.5). Kornu uteri boyunca verilen yıkama vasatı 50 ml'lik steril konik tüplere (50 ml 30x115mm; polipropleп steril santrifüj tüpleri, Falkon®, USA) bufirkasyo bölgesine yerleştirilmiş olan foley kateteri yardımıyla geri alındı (Resim 2.2.4.5). Bu şekilde her iki kornu ayrı ayrı yıkanarak, tüplerin hangi kornuya ait olduğu not edildi.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra uterus ve kornular normal konumlarında olacak şekilde karın boşluğuna reddedildi. Postoperatif yapışmaları engellemek için 500 ml heparinli (25.000 IU/5 ml heparin sodyum; Nevaparin®, Mustafa Nevzat, İstanbul) izotonik sodyum klorür solüsyonu (0,9 gr/100 ml NaCl; Polifleks®, Polifarma, Tekirdağ) karın boşluğuna verildi ve daha sonra periton (no: 0 krome katgüt), kaslar, deri altı bağ dokusu (no: 1 krome katgüt) ve deri (no:1 ipek) prosedürüne uygun olarak kapatıldı (Resim 2.2.4.6).

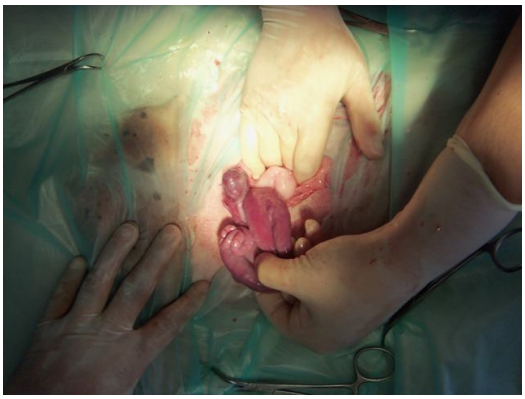
Alınan yıkantılar embriyoların çökmesi için yaklaşık olarak 30-45 dk 37^0C' lik su banyosunda bekletildi. Daha sonra yıkantılar steril petri kaplarına (100 x 20 mm; doku kültür petrisi, BD Falcon™, USA) aktarıldıktan sonra bir Stereo-mikroskop (Olympus SXZ 16, Japan) yardımıyla incelenerek embriyolar arandı. Bulunan embriyolar %1 FCS ve %1 antibiyotik (Penicilin 10000 IU/ml) ilave edilen D-PBS solüsyonuna aktarıldı.



Resim 2.2.4.1. Laparatomi için hazırlanan keçi (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).



Resim 2.2.4.2. Ventral bölgedeki ensizyon hattı (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).



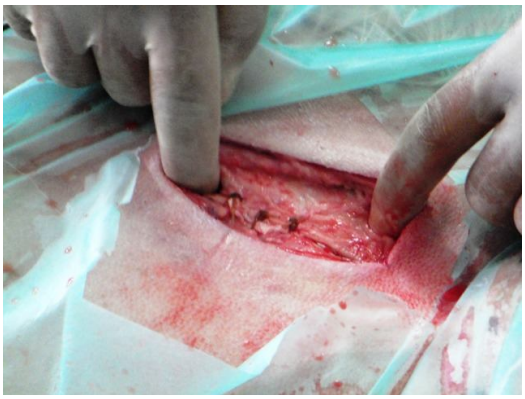

Resim 2.2.4.3. Ovaryum ve uterus kornularının ensizyon hattı dışına alınması (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).




Resim 2.2.4.4. Uterusa kateter ve kanülün yerleştirilmesi (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).




Resim 2.2.4.5. Uterusun yıkanması (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).




Resim 2.2.4.6. Operasyon bölgesinin kapatılması (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).

2.2.5. Embriyoların Değerlendirilmesi

Embriyolar D-PBS içine alınıp Invert-mikroskopta (Olympus IX-71, Japan) incelendikten sonra gelişim aşamalarına ve morfolojik yapılarına göre sınıflandırıldı. Embriyoların değerlendirilmesi ve sınıflandırılması; Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğu (IETS) tarafından belirlenen kriterlere göre embriyonun gelişim dönemine ve kalitesine göre yapıldı.

Elde edilen embriyolar gelişim dönemlerine göre; fertilize olmamış oosit, kompakt morula, erken blastosist, blastosist ve ekspanded blastosist olarak değerlendirildi ve kayıt edildi. Embriyolar kalitelerine (morfolojik yapılarına) göre ise; Grade 1 (çok iyi), Grade 2 (iyi), Grade 3 (sağlıksız) ve Grade 4 (ölü veya dejenere) olarak değerlendirilip not edildi. Bu aşamadan sonra kompakt morula, erken blastosist, blastosist ve ekspanded blastosist olarak değerlendirilen ve kaliteleri Grade 1 ve 2 olan embriyolar vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmak üzere belirlendi.

2.2.6. Embriyoların Dondurulması

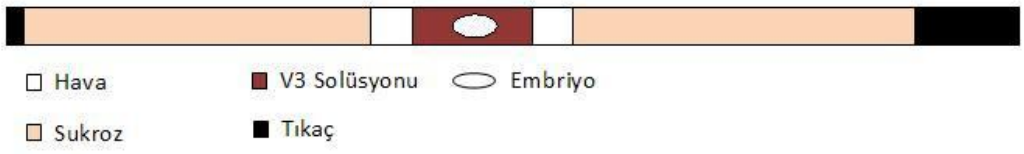
Elde edilen Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki embriyolar vitrifikasyon yöntemi ile donduruldu. Vitrifikasyon işlemi sırasında ekilibrasyon solüsyonu (VS1 ve VS2) ve vitrifikasyon solüsyonu (VS3) kullanıldı.

- VS1; %20 Etilen Glikol (E 9129; Sigma, USA),
- VS2; %20 Etilen Glikol + %10 Gliserol (G 7757; Sigma, USA)
- VS3; %25 Etilen Glikol + %25 Gliserol

Embriyolar içinde bulundukları PBS içerisinden her bir VS için farklı pipet yardımıyla alınarak sırasıyla VS1 ve VS2 solüsyonu içerisinde 5' er dk süreyle bekletildi. Daha sonra embriyolar VS3' de birkaç kez pipete edildikten sonra 30 sn süreyle bekletildi (Çizelge 2.2.6.1). Daha sonra embriyo, vitrifikasyon vasatı (VS3) ile birlikte önceden sukroz solüsyonu ve hava çekilerek hazırlanmış payetlere (0,25 ml, 133 mm straw; REF: 19040/0010, Minitub, Almanya) alınıp, ardından payetlere tekrar hava ve sukroz solüsyonu çekildikten sonra payetler etiketlenmiş payet tıkacı ile kapatıldı (Şekil 2.2.6.1). Embriyoların içinde bulunduğu payetler 10 sn kadar sıvı azot buharında bekletilip 45^0'lik açı ile sıvı azotun içerisine daldırıldı. Tüm embriyoların dondurma işlemleri tamamlandıktan sonra embriyolar azot tankına (Alta genetik, MVE XC 47/11-10) aktarıldı. Böylece vitrifikasyon yöntemiyle embriyoların dondurma işlemi tamamlandı ve embriyolar çözdürme işlemine kadar en az bir en çok iki yıl süreyle sıvı azot tankında bekletildi.

Çizelge 2.2.6.1. Embriyoların vitrifikasyonunda kullanılan kriyoprotektan solüsyonlar ve embriyoların bekletilme süreleri.

Solüsyon	Bileşimi	Embriyoların Bekletilme Süreleri
VS1 (ekilibrasyon solüsyonu)	%20 EG	5 dakika
VS2 (ekilibrasyon solüsyonu)	%20 EG + %10 G	5 dakika
VS3 (vitrifikasyon solüsyonu)	%25 EG + %25 G	30 saniye

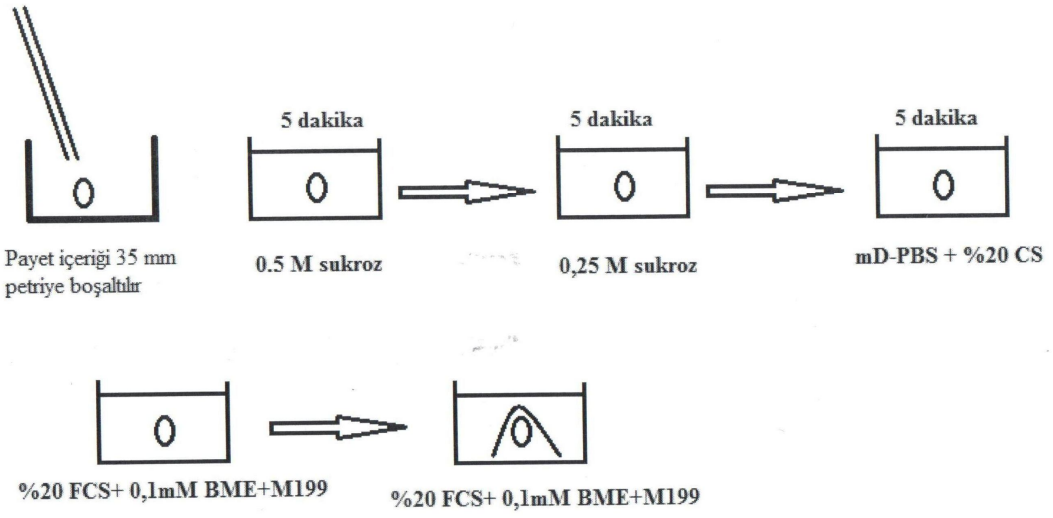


Şekil 2.2.6.1. Vitrifikasyon işlemi için embriyonun payete alınması.

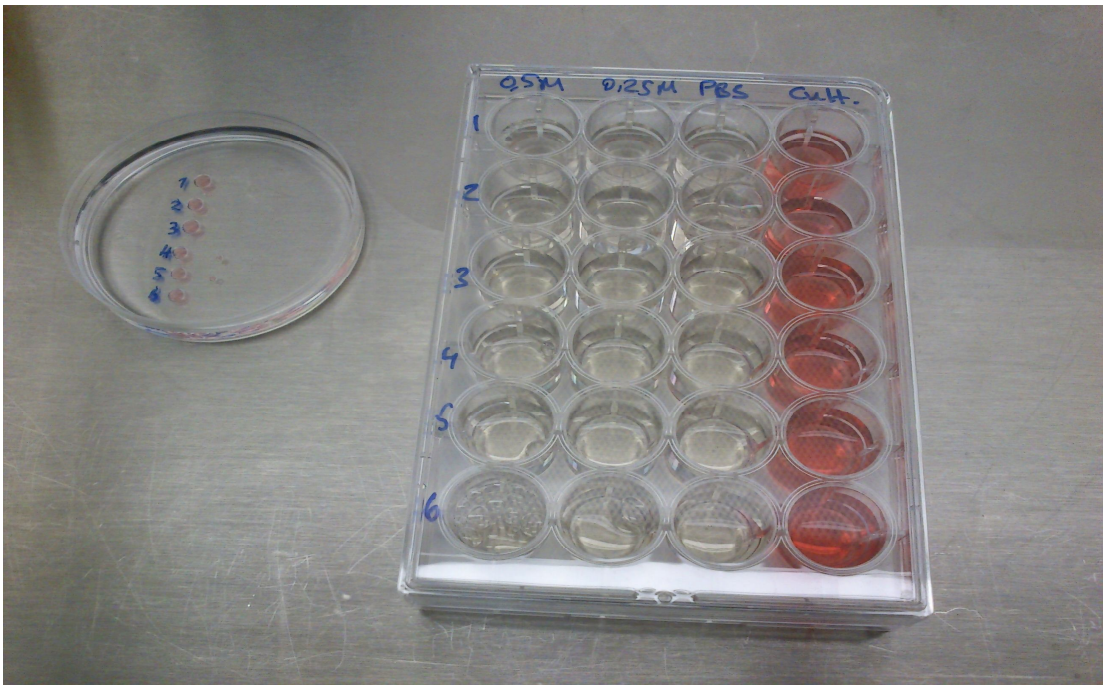
2.2.7. Embriyoların Çözdürülmesi

Embriyoların çözdürülmesi işleminde; embriyoların içinde bulunduğu payetler önce 10 sn havada, ardından 20 sn süreyle 30^oC'lik su banyosunda bekletilerek çözdürüldü. Daha sonra payetler alkollü pamukla silinip kurulandı. Payetler hızlı bir şekilde 2-3 kez sallandıktan sonra kapak kısmından kesilerek

önceden 37-38,5^{o}C'ye ısıtılmış olan boş steril petri kaplarına aktarıldı. Stereo mikroskop yardımıyla bulunan embriyolar önce mD-PBS + %20 FCS+ antibiyotik + 0,5 M'lik sukroz solüsyonunda, sonra mD-PBS + %20 FCS+ antibiyotik + 0,25 M'lik sukroz solüsyonunda 5'er dk bekletildi. Ardından mD-PBS + %20 FCS+ antibiyotik içeren solüsyon içinde 5 dk bekletilerek yıkandı (Şekil 2.2.7.1) (Resim 2.2.7.1). Bu işlemlerden sonra embriyolar, mineral yağ ile kaplanan droplar halinde hazırlanmış kültür medyumuna (%20 FCS+ 0.1mM βME+ M-199+ antibiyotik) alındı (Resim 2.2.7.1) ve 38,5^{0} C %5 CO_2' li inkubatörde (SANYO MCO-18AC) kültüre bırakıldı. Daha sonra 24, 48 ve 72. saatlerde embriyoların canlılıkları ve gelişimleri kontrol edildi. Embriyoların viyabilitelerinin değerlendirilmesinde kriter olarak; embriyonun çözdürüldüğü andan sonraki 24, 48 ve 72. saatlerde kültürdeki embriyoların gelişim göstermeleri esas alındı. Morula aşamasındaki bir embriyonun blastosist aşamasına, blastosist aşamasındaki bir embriyonun genişlemiş blastosist aşamasına, genişlemiş blastosist aşamasındaki embriyonun ise hatching blastosist ya da hatched blastosist aşamasına ulaşması embriyonun canlı olduğunun göstergesi olarak kabul edildi. Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan embriyoların çözdürülmesi aşamasında kullanılan tüm solüsyonların içerikleri Çizelge 2.2.7.1-5'de verildi.



Şekil 2.2.7.1. Embriyoların devitrifikasyon işlemi.



Resim 2.2.7.1. Devitrifikasyon solüsyonları ve kültür medyumu (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı, 2013).

Çizelge 2.2.7.1. mD-PBS solüsyonu.

mD-PBS					
	Kimyasallar	**1000 ml**	**500 ml**		
PBS-A	NaCl	8,0 g	4,0 g	**D-PBS**	**mD-PBS**
	KCl	0,2 g	0,1 g		
	Na_2HPO_4	1,15 g	0,575 g		
	KH_2PO_4	0,2 g	0,1 g		
PBS-B	$CaCl_2/CaCl_2 2H_2O$	0,1/ 0,1395g	0,05/ 0,069 g		
	$Mg\ Cl_2\ 6H_2O$	0,1g	0,05 g		
	Glikoz	1,0 g	0,5 g		
	Sodyum Piruvat	0,036 g	0,018 g		

Çizelge 2.2.7.2. Buffer solüsyonu.

	10 ml	**50 ml**
mD-PBS	8 ml	40 ml
FCS	2 ml	10 ml
Antibiyotik	10 µl	50 µl

Çizelge 2.2.7.3. Beta-Merkaptoetanol Solüsyonu.

	10 ml
M-199	10 ml
βME	7 µl

Çizelge 2.2.7.4. Kültür medyumu.

	10 ml	**50 ml**
M-199	7,9 ml	39,5 ml
βME	100 µl	500 µl
FCS	2 ml	10 ml
Antibiyotik	10 µl	50 µl

Çizelge 2.2.7.5. Sukroz solüsyonları.

Sukroz solüsyonu	**mD-PBS**	**Sukroz**
0,5 M	50 ml	8,5575 g
0,25 M	50 ml	4,2787 g

2.3. İstatistik Analizler

Bu çalışmada, çözdürülen embriyoların 24. , 48. ve 72. saatler arasındaki viyabilitelerinin karşılaştırılması; Grade 1 ve Grade 2 kalitede olan çözdürülmüş embriyoların 24. , 48. ve 72. saatler arasındaki yaşama oranlarının karşılaştırılması ve çözdürülen embriyoların gelişim dönemlerine göre morula ve blastosist aşamasındaki embriyoların 24. , 48. ve 72. saatler arasındaki yaşama oranlarının karşılaştırılması için Minitab 12.0 paket programında Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. İstatistiki test uygulanırken çözdürülen embriyolarda canlı olarak değerlendirilen embriyolar 2 rakamı ile, ölü embriyolar ise 1 rakamı ile ifade edildi.

3. BULGULAR

3.1. Östrus Senkronizasyon Bulguları

Onbir gün süreyle vaginada tutulan süngerlerin çıkartılmasını takiben 24. saatte tüm hayvanların östrus gösterdiği tespit edildi. Birinci ve ikinci sezonda da hayvanların östrus gösterme oranı %100 olarak belirlendi.

3.2. Süperovulasyon Bulguları

Birinci sezonda kullanılan 15 keçinin ovaryum cevaplarında 4 ve 4'ten çok CL bulunan keçi sayısı (süperovulasyona cevap veren keçi sayısı), 14 olarak belirlendi.

Süperovulasyon oranı; Toplam CL sayısı/Toplam Hayvan Sayısı X 100 formülü ile tespit edildi (Çizelge 3.2.1).

15 keçinin 4'ünde erken luteal regresyon (ELR) ile karşılaşıldı ve bu keçilerde uterus yıkaması yapılmadı.

ELR oranı; ELR gösteren hayvan sayısı/Toplam hayvan sayısı X 100 formülü ile bulundu (Çizelge 3.2.2).

İkinci sezonda kullanılan 13 keçinin 11'inin ovaryumlarında 4 ve 4'ten çok CL sayısı belirlendi ve aynı formül kullanılarak süperovulasyon gösterme oranı belirlendi (Çizelge 3.2.1). 13 keçinin 2'sinde ELR tespit edildi, ELR oranı da aynı formül ile belirlendi. Bu oran Çizelge 3.2.2' de gösterildi.

Çizelge 3.2.1. Birinci ve ikinci sezonda kullanılan hayvanların süperovulasyon oranları.

	Hayvan Sayısı (n)	**Süperovulasyona Cevap Veren Hayvan Sayısı**	**Toplam CL Sayısı**	**Süperovulasyon Oranı (%)**
1.Sezon	15	14	135	%93,3
2.Sezon	13	11	119	%84,6
Toplam	**28**	**25**	**254**	**%89,3**

Çizelge 3.2.2. Birinci ve ikinci sezonda kullanılan hayvanların erken luteal regresyon oranları.

	Hayvan Sayısı (n)	ELR Görülen Hayvan Sayısı	ELR Oranı (%)
1.Sezon	15	4	%26,6
2.Sezon	13	2	%15,4
Toplam	**28**	**6**	**%21,4**

3.3. Embriyoların Değerlendirilme Bulguları

Birinci sezonda laparotomi ile uterus yıkaması gerçekleştirilen 11 keçide toplam 135 adet CL olduğu belirlendi ve yıkamalar sonrası Stereo-mikroskopta incelenen yıkantılardan gelişim aşamalarına ve morfolojik yapılarına göre sınıflandırılan toplam 81 adet hücre toplandı. Bunlardan 22 adedi UFO, 11 adedi dejenere embriyo ve 48 adedi ise dondurulabilir embriyo olarak değerlendirildi. Kırksekiz adet embriyo vitrifikasyon yöntemi ile donduruldu.

İkinci sezonda elde edilen toplam CL sayısı 119, bulunan hücre sayısı da 89 olarak belirlendi. Bulunan hücrelerden 23 adedi UFO (Resim 3.3.1), 13 adedi dejenere embriyo (Resim 3.3.2), 53 adedi ise dondurulabilir embriyo olarak değerlendirildi. Bu sezonda çalışmaya alınan 53 adet embriyo vitrifikasyon yöntemi kullanılarak donduruldu.

Uterus yıkaması sonrasında elde edilen;

Recovery Rate; Toplam elde edilen (bulunan) hücre sayısı/Sayılan toplam CL sayısı X 100 formülü ile tespit edildi (Çizelge 3.3.1).

Embriyo Oranı; Bulunan dejenere embriyo sayısı + dejenere olmayan (dondurulabilir) embriyo sayısı/Toplam elde edilen (bulunan) hücre sayısı X 100 formülü ile belirlendi ve bu oranlar Çizelge 3.3.1' de gösterildi.

Çizelge 3.3.1. Birinci ve ikinci sezonda elde edilen toplam CL sayısı, bulunan hürce sayısı (UFO + dejenere embriyo + dondurulabilir embriyo), recovery rate ve elde edilen embriyo oranı.

	Toplam CL Sayısı	Bulunan Hücre Sayısı	Recovery Rate (%)	UFO Sayısı	Dejenere Embriyo Sayısı	Dondurulabilir Embriyo Sayısı	Elde Edilen Embriyo Oranı (%)
1.Sezon	135	81	%60	22	11	48	%72,83
2.Sezon	119	89	%75	23	13	53	%74,15
Toplam	**254**	**170**	**%67**	**45**	**24**	**101**	**%73,52**

Çizelge 3.3.1' de görüldüğü gibi birinci ve ikinci sezonda uterus yıkamaları sonrasında toplam 101 adet dondurulabilir embriyo elde edildi. Embriyoların gelişim aşamalarına göre; 39' unun kompakt morula (Resim 3.3.3), 19' unun erken blastosist, 32' sinin blastosist ve 11' inin ekspanded blastosist (Resim 3.3.4) olduğu belirlendi. Elde edilen dondurulabilir embriyoların gelişim aşamalarına göre oranları Çizelge 3.3.2' de verildi.

Çizelge 3.3.2. Elde edilen dondurulabilir embriyoların gelişim aşamalarına göre oranları.

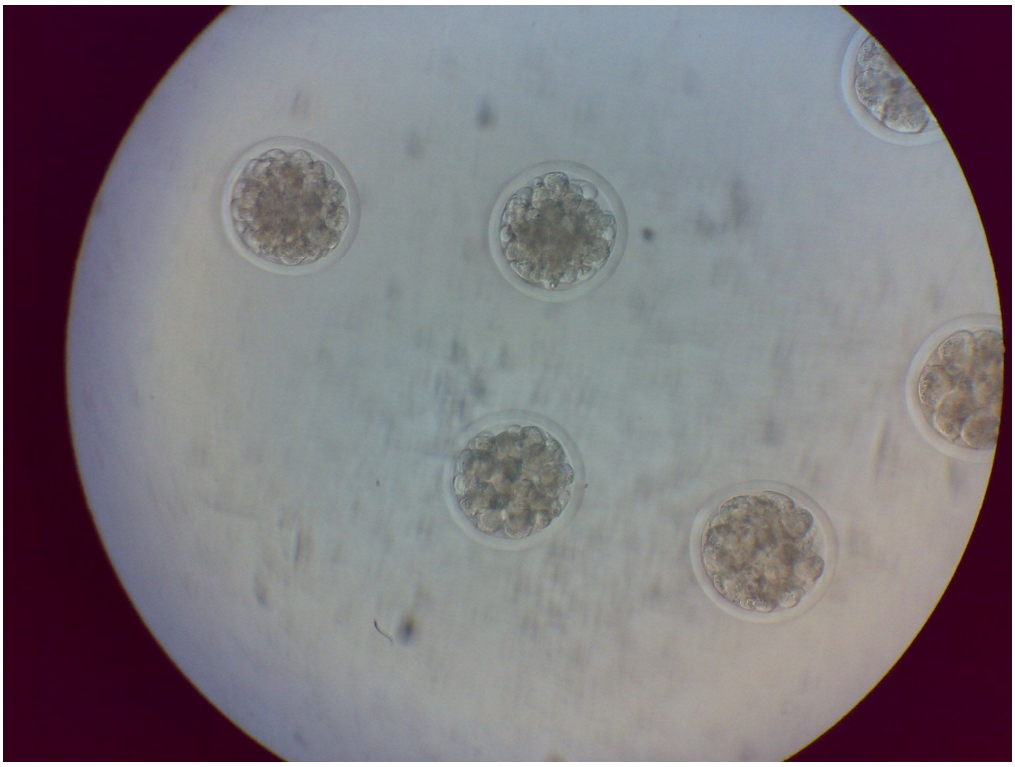
Embriyonun gelişim aşaması	Sayısı	Oranları
Kompakt morula	39	%38,6
Erken blastosist	19	%18,8
Blastosist	32	%31,7
Expanded Blastosist	11	%10,9



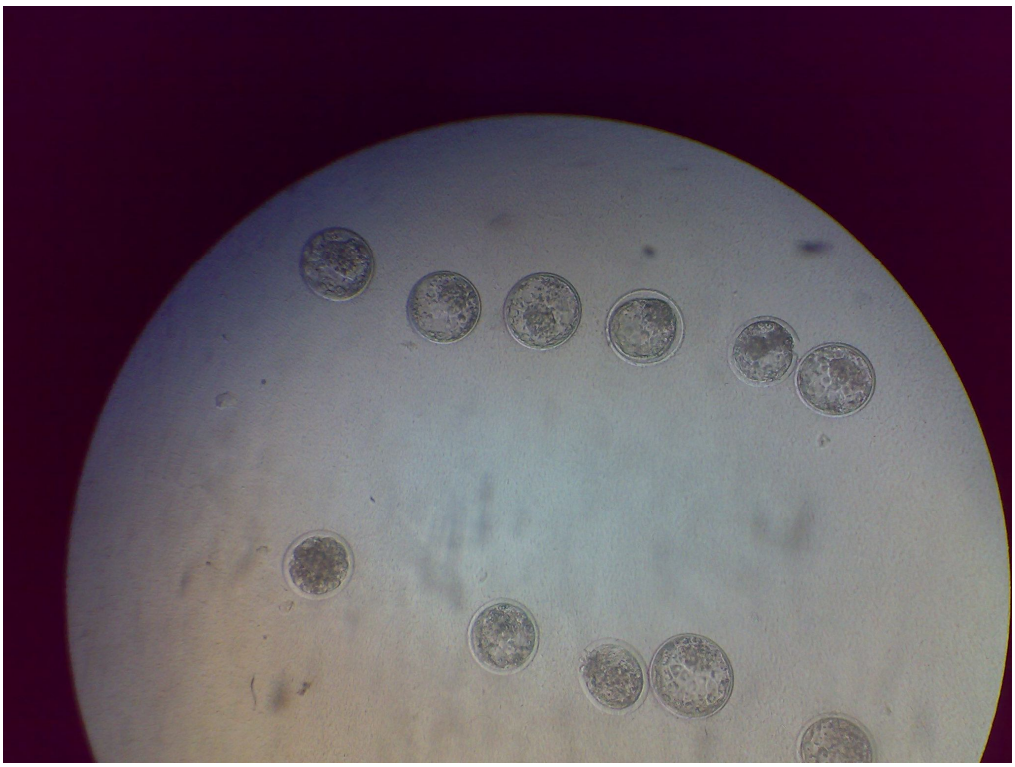
Resim 3.3.1. UFO görüntüsü (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı, 2011)



Resim 3.3.2. Dejenere embriyo görüntüsü (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı, 2011).



Resim 3.3.3. Morula aşamasındaki embriyoların görüntüsü (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı, 2011).



Resim 3.3.4. Farklı Blastosist aşamasındaki embriyoların görüntüsü(Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji AnabilimDalı IVF Laboratuvarı, 2011).

Birinci ve ikinci sezonda elde edilen toplam 101 adet dondurulabilir embriyonun morfolojik yapılarına göre 56 adedinin Grade 1 kalitede, 45 adedinin de Grade 2 kalitede olduğu belirlendi. Elde edilen embriyoların morfolojik yapılarına göre kalite oranları Çizelge 3.3.3' de verildi.

Çizelge 3.3.3. Dondurulabilir embriyoların morfolojik yapılarına göre kalite oranları.

Embriyonun morfolojik yapısına göre kalitesi	Sayısı	Oranı
Grade 1	56	%55,4
Grade 2	45	%44,6

3.4. Çözdürülen Embriyoların Viyabiliteleri

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözdürülen 101 adet embriyonun in vitro ortamda 24. 48. ve 72. saatlerdeki viyabiliteleri karşılaştırıldığında; 24. saate viyabilite gösteren ve gelişimine devam eden 60 adet, 48. saate canlı olarak ulaşan 34 adet ve 72. saate canlı olarak ulaşan 26 adet embriyo olduğu tespit edildi (Resim 3.4.1 ve 3.4.2) (Çizelge 3.4.1). Çözdürülen embriyolardan in vitro ortamda 24. saatte 41 (% 40,6) adedinin, 48. saatte 67 (% 66,4) adedinin ve 72. saatte ise 75 (% 74,3) adedinin ölü olduğu tespit edildi (Çizelge 3.4.1). Embriyoların canlılık oranları 24, 48 ve 72. saatte sırasıyla % 59,4; % 33,6; % 25,7 olarak belirlendi (Grafik 3.4.1). 24. saatteki viyabilite oranlarının ($p<0,05$) (Çizelge 3.4.2), 48. ve 72. saatteki oranlara göre daha yüksek olduğu, embriyoların 48. ve 72. saatlerde dejenerasyona uğramaya başladığı belirlendi.

Çizelge 3.4.1. İn vitro kültürde 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlı ve ölü olan embriyoların sayıları ve oranları.

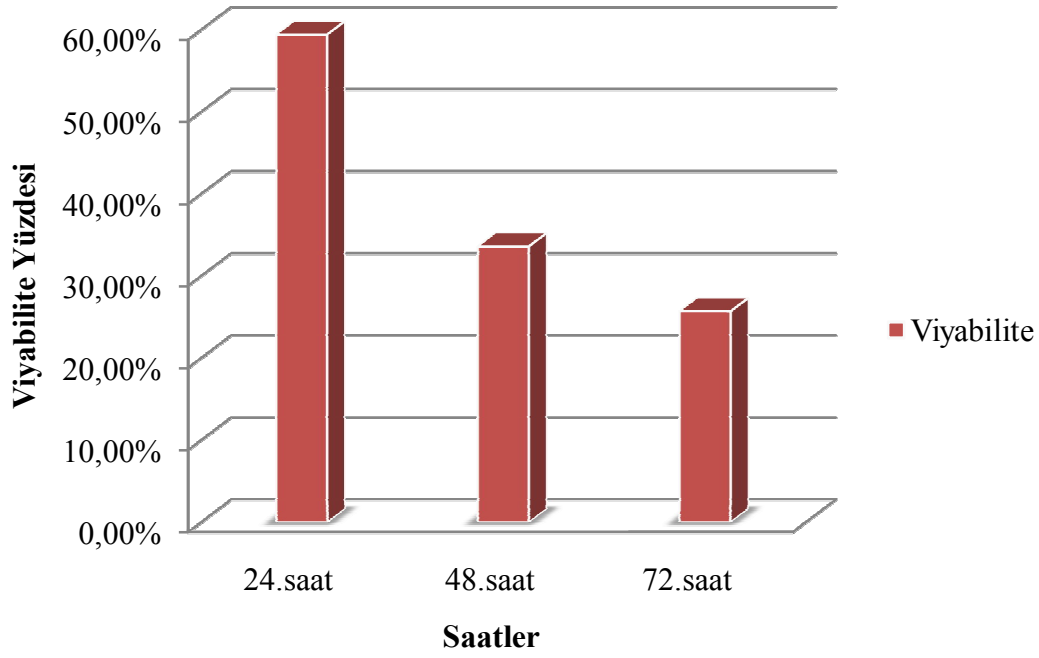
İn vitro kültür (saat)	Canlı olan embriyo sayısı (n) ve oranı (%)	Ölü olan embriyo sayısı (n) ve oranı (%)
24. saat	60 % 59,4	41 % 40,6
48. saat	34 % 33,6	67 % 66,4
72. saat	26 % 25,7	75 % 74,3

Çizelge 3.4.2. Çözdürülen embriyoların in vitro kültürde 24. 48. ve 72. saatteki viyabilite oranları.

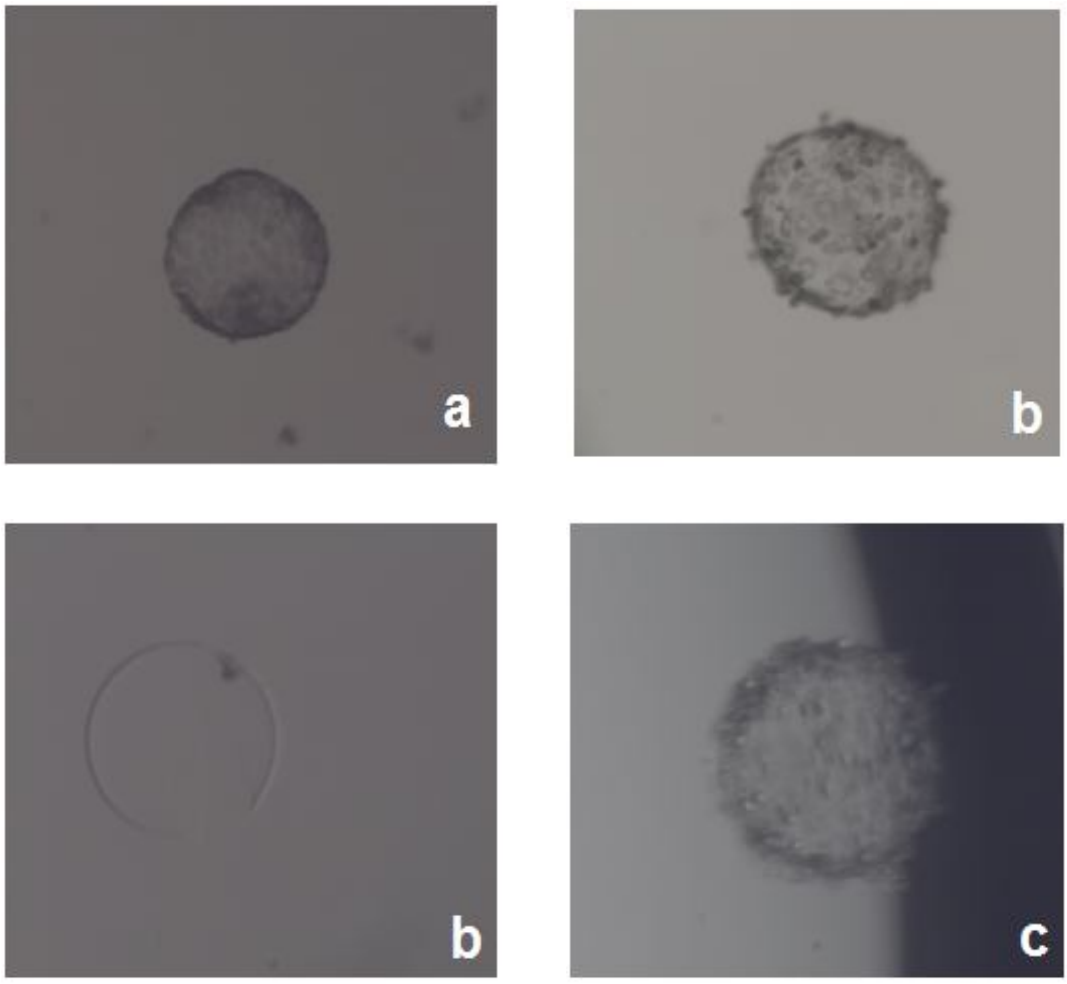
24. saat	48. saat	72. saat
2^{a}	1^{b}	1^{b}

a, b: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir. $p<0,05$

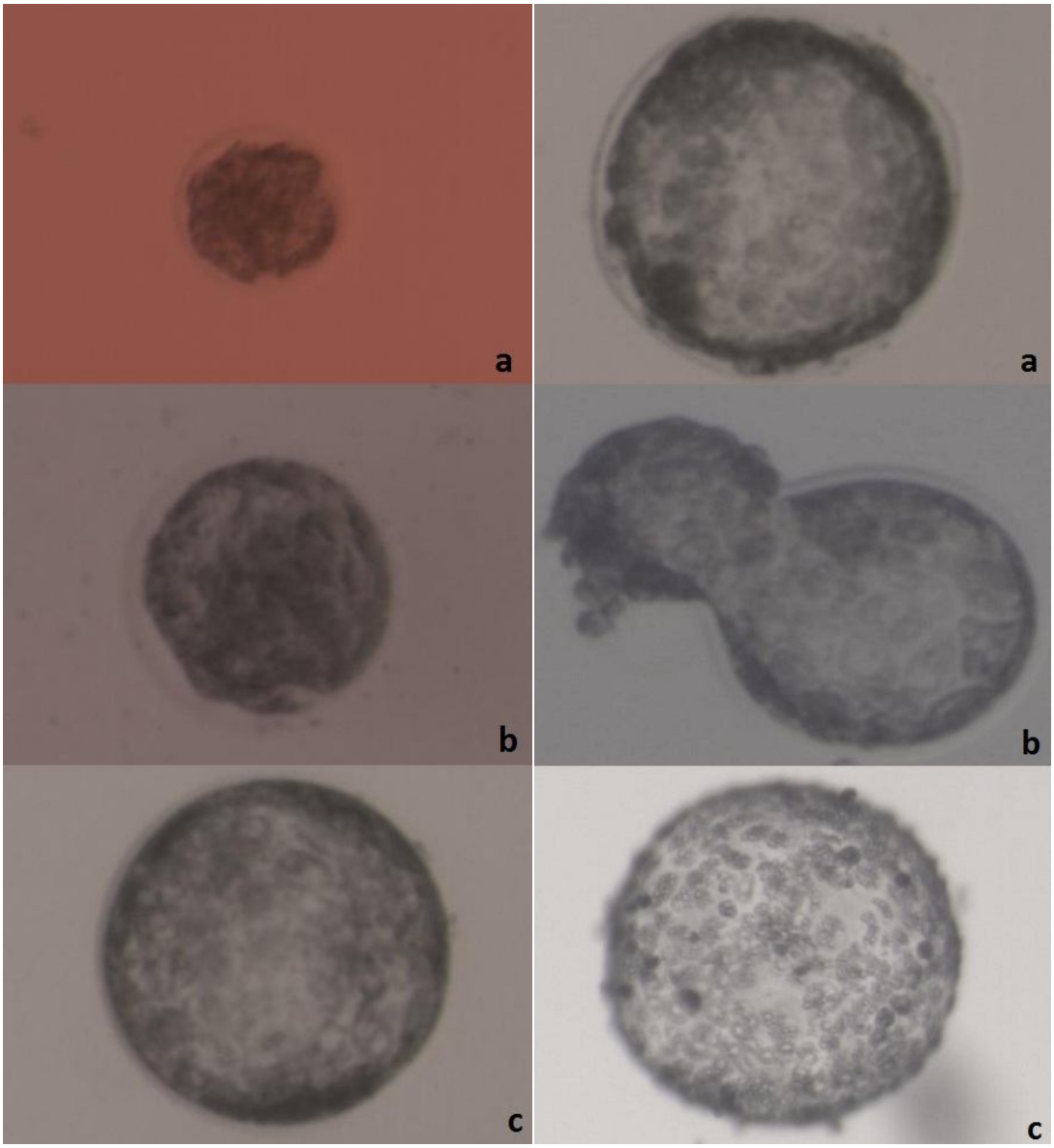
2: Canlı olan embriyo, 1: Ölü olan embriyo



Grafik 3.4.1. Çözdürülen embriyolarda viyabilite.



Resim 3.4.1. Çözdürülen bir embriyonun 24 (a), 48 (b) ve 72 (c). saatteki görüntüleri (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı, 2013).



Resim 3.4.2. Çözdürülen embriyoların 24 (a), 48 (b) ve 72 (c). saatteki görüntüler (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı, 2013).

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözdürülen 101 adet embriyonun gelişim aşamalarına göre kültür ortamında viyabiliteleri değerlendirildiğinde, 39 adet morula aşamasındaki embriyonun; in vitro kültürde 24. saatte 20 (% 51,3) adedinin canlı, 19 (% 48,7) adedinin ölü; 48.saatte 8 (% 20,5) adedinin canlı, 31 (% 79,5) adedinin ölü ve 72. saatte ise 6 (% 15,4) adedinin canlı, 33 (% 84,6) adedinin de ölü olduğu tespit edildi. Çözdürülen 62 adet blastosist aşamasındaki embriyonun; 24. saatte 40 (% 64,5) adedinin canlı, 22 (% 35,5) adedinin ölü; 48.saatte 26 (% 41,9) adedinin canlı, 36 (% 58,1) adedinin ölü ve 72. saatte ise 20 (% 32,3) adedinin canlı, 42 (% 67,7) adedinin de ölü olduğu tespit edildi (Çizelge 3.4.3).

Embriyolarda gelişim aşamalarına göre morula ve blastosist dönemindeki embriyoların 24. 48. ve 72. saatteki viyabilite oranları morula aşamasındaki embriyolar için sırasıyla % 51,3; 20,5; 15,4; blastosist aşamasındaki embriyolar içinse % 64,5; 41,9; 32,3; olarak belirlendi (Grafik 3.4.2). Buna göre blastosist aşamasındaki embriyoların morula aşamasındaki embriyolara göre in vitro kültürde 48. saatteki canlılık oranları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Çizelge 3.4.4).

Çizelge 3.4.3. İn vitro kültürde canlı ve ölü olan morula ve blastosist aşamasındaki embriyoların sayısı ve oranları.

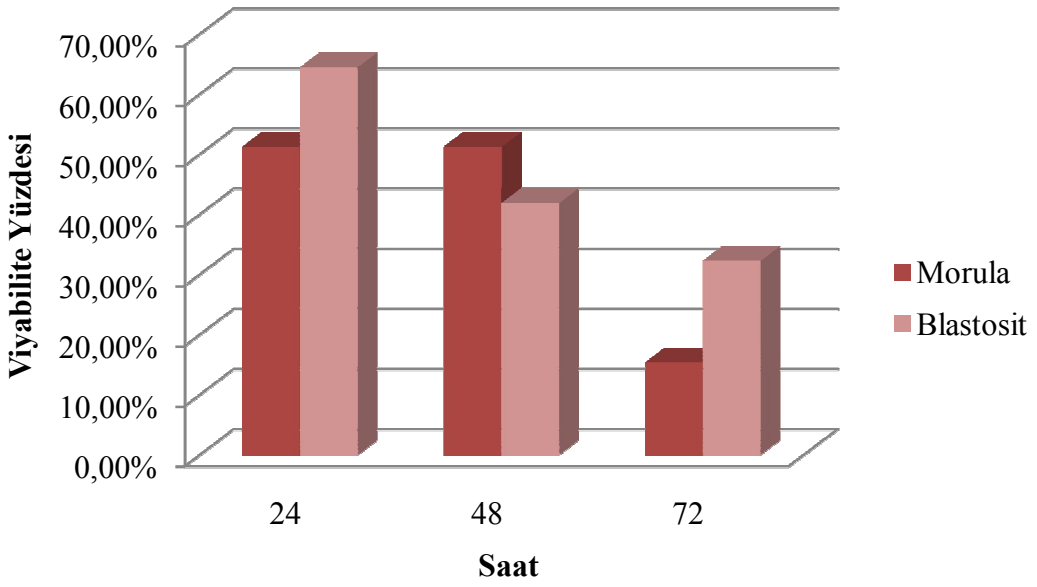
Embriyoların in vitro kültürdeki durumu ve gelişim aşaması		**İn vitro kültürde canlı ve ölü olan morula ve blastosist aşamasındaki embriyo sayısı ve oranları**		
Embriyonun durumu	**Gelişim aşaması**	**24. Saat**	**48. Saat**	**72. Saat**
Canlı	Morula	20 (% 51,3)	8 (% 20,5)	6 (% 15,4)
Ölü		19 (% 48,7)	31 (% 79,5)	33 (% 84,6)
Canlı	Blastosist	40 (% 64,5)	26 (% 41,9)	20 (% 32,3)
Ölü		22 (% 35,5)	36 (% 58,1)	42 (% 67,7)

Çizelge 3.4.4. Morula ve blastosist dönemindeki embriyoların in vitro ortamda 24. 48. ve 72. saatteki viyabilite oranları.

Embriyonun gelişim aşaması	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Morula	2^a	1^a	1^a
Blastosist	2^a	1^b	1^a
p	0,190	0,003	0,060

a,b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir. $p<0,05$

2: Canlı olan embriyo, 1: Ölü olan embriyo



Grafik 3.4.2. Morula ve blastosist aşamasındaki embriyoların viyabiliteleri.

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözdürülen 101 adet embriyonun morfolojik yapılarına göre kültür ortamında viyabiliteleri değerlendirildiğinde, 56 adet Grade 1 kalitedeki embriyonun; in vitro kültürde 24. saatte 44 (% 78,6) adedinin canlı, 12 (% 21,4) adedinin ölü; 48.saatte 26 (% 46,4) adedinin canlı, 30 (% 53,6) adedinin ölü ve 72. saatte ise 18 (% 32,1) adedinin canlı, 38 (% 67,9) adedinin de ölü olduğu tespit edildi. Çözdürülen 45 adet Grade 2 kalitedeki embriyonun; 24. saatte 16 (% 35,5) adedinin canlı, 29 (% 64,5) adedinin ölü; 48.saatte 8 (% 17,8) adedinin

canlı, 37 (% 82,2) adedinin ölü ve 72. saatte ise 8 (% 17,8) adedinin canlı, 37 (% 82,2) adedinin de ölü olduğu tespit edildi (Çizelge 3.4.5).

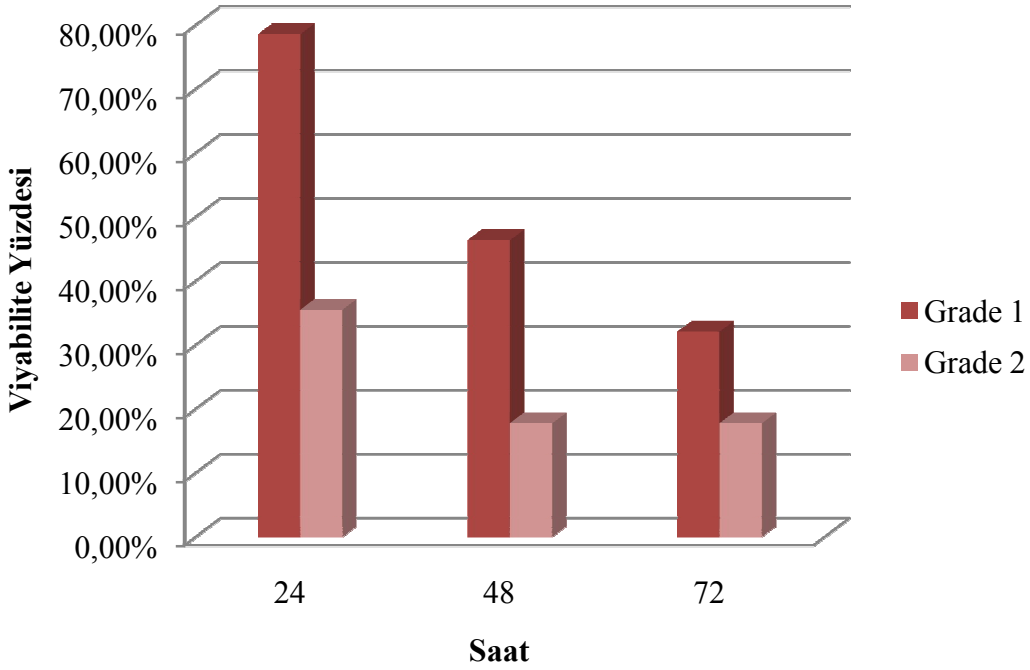
Embriyoların çözdürülmesi sonrası morfolojik yapılarına göre Grade 1 ve Grade 2 kalitede olan embriyolardan; Grade 1 kalitede olanların 24. 48. ve 72. saatteki viyabilite oranları sırasıyla % 78,6; 46,4; 32,1 olarak, Grade 2 kalitede olanların ise % 35,5; 17,8; 17,8 olduğu belirlendi (Grafik 3.4.3). Buna göre Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki embriyoların 24. ve 48. saatteki viyabiliteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,05$) olduğu tespit edildi (Çizelge 3.4.6).

Çizelge 3.4.5. İn vitro kültürde canlı ve ölü olan Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki embriyoların sayısı ve oranları.

Embriyoların in vitro kültürdeki durumu ve morfolojik yapısına göre kalitesi		**İn vitro kültürde canlı ve ölü olan Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki embriyoların sayısı ve oranları**		
Embriyonun durumu	**Morfolofik yapısına göre kalitesi**	**24. Saat**	**48. Saat**	**72. Saat**
Canlı	Grade 1	44 (% 78,6)	26 (% 46,4)	18 (% 32,1)
Ölü		12 (% 21,4)	30 (% 53,6)	38 (% 67,9)
Canlı	Grade 2	16 (% 35,5)	8 (%17,8)	8 (%17,8)
Ölü		29 (% 64,5)	37 (%82,2)	37 (% 82,2)

Çizelge 3.4.6. Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki embriyoların in vitro ortamda 24. 48. ve 72. saatteki viyabilite oranları.

Embriyonun kalitesi	**24. Saat**	**48. Saat**	**72. Saat**
Grade 1	2^a	1^a	1^a
Grade 2	1^b	1^b	1^a
p	0,001	0,003	0,103
a,b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir. $p<0,05$			
2: Canlı olanembriyo, 1: Ölü olan embriyo			



Grafik 3.4.3. Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki embriyoların viyabilite oranları.

4. TARTIŞMA

Keçilerde progestagen içeren intravaginal süngerlerin üreme mevsimine geçişte, üreme mevsiminde ve anöstrusta yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir. (Uçar ve Özyurtlu 2012). Bu amaçla kullanılan vaginal süngerlerden biri FGA diğeri ise MAP içeren vaginal süngerlerdir (Flores-Foxworth 2007, Abecia ve ark 2012). Motlomelo ve ark (2002) tarafından yapılan çalışmada FGA (%96,7) veya MAP (%93,1) ile elde edilen östrus senkronizasyon cevaplarında fark olmadığı belirtilirken, Doğan ve ark (2004)'nın yaptığı çalışmada da bu oranların FGA (% 100) ve MAP (% 100) kullanılarak elde edilen östrus cevapları için aynı olduğu ifade edilmektedir. FGA ve Norgestoment kulak implantı kullanılan başka bir çalışmada da, östrus gösterme oranları (% 100; 100) arasında fark olmadığı ifade edilmektedir (Kılboz ve Karaca 2010). CIDR, FGA ve MAP'ın karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ise benzer şekilde elde edilen östrus senkronizasyon oranları (% 100; 100; 100) ve yavrulama oranları (% 63; 63; 65) arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmektedir (Romano 2004). Keçilerde yapılan bir senkronizasyon çalışmasında; progesteron (40mg/Alverta, GMPH/16 gün/intravaginal sünger) , PMSG (sünger çıkartılmadan 2 gün önce 300 IU) ve çift doz $PGF_2\alpha$, uygulamalarının karşılaştırılmasında senkronizasyon oranlarının sırasıyla %100; 77,7; 70 olarak bulunduğu belirtilmektedir (Ahmed ve ark 1998).

Sadece FGA' nın kullanıldığı sunulan bu çalışmada; FGA içeren intravaginal süngerlerin çıkartılmasından sonraki 24. saatte tüm hayvanlarda (%100) östrus belirtileri gözlemlendi. Bu oran, keçilerde senkronizasyon amacıyla FGA ve MAP' ın karşılaştırıldığı Motlomelo ve ark (2002) ile Doğan ve ark (2004)' nın çalışmalarında FGA ile elde edilen östrus gösterme oranları (sırasıyla % 96,7; 100) ve Romano (2004) tarafından CIDR, FGA ve MAP' ın, ayrıca Kılboz ve Karaca (2010) tarafından da FGA ve Norgestomet kulak implantının karşılaştırıldığı çalışmalarda da FGA ile elde edilen oran (%100) ile benzerlik göstermektedir. Sunulan çalışmada elde edilen bu sonuca göre; keçilerde östrus senkronizasyonu uygulamalarında FGA içeren vaginal süngerlerin başarıyla kullanılabileceği kanısına varıldı.

Keçilerde süperovulasyon amacıyla gonadotropik hormonlardan yaralanılmaktadır (Flores-Foxworth 2007, Amiridis ve Cseh 2012). Bu hormonların

başlıcaları; FSH, eCG, hMG' dir (Aminoor Rahman ve ark 2008). FSH ve eCG ile elde edilen süperovulasyon cevaplarının karşılaştırıldığı bir çalışmada FSH (77,8±2,7) ile elde edilen ovaryum cevaplarının, eCG (14,3±2,2)' den önemli oranda daha iyi olduğu belirtilmektedir (Hu ve ark 2010). Bir gruba sadece FSH-P ve diğer gruba FSH + eCG uygulanarak yapılan bir başka süperovulasyon çalışmasında elde edilen CL sayısı (12,00±1.1; 9,67±2,1), embriyo sayısı (11,00±1,9; 1,33±0,6) ve transfer edilebilir embriyo sayısı (9,56±1,9; 0,22±0,2) bakımından FSH grubunun FSH + eCG grubuna göre daha üstün olduğu bildirilmektedir (Lehloenya 2013). FSH-P, FSH-O ve hMG ile yapılan bir diğer çalışmada ise, FSH-P ve FSH-O ile elde edilen ovaryumlardaki CL (10,12±0,06; 11,35±1,75) sayısının hMG (8,02±2,15)' ye göre daha iyi olduğu ifade edilmektedir (Iheukwumere 2008). FSH-O ile yapılan bir süperovulasyon çalışmasında süperovulasyon oranının %78,6 olduğu bildirilmektedir (Gonzalez-Bulnes ve ark 2003). Keçilerde yapılan başka bir çalışmada da FSH-P kullanılarak %87,5 oranında süperovulasyon cevabı elde edildiğ ifade edilmektedir (Greyling ve ark 2002).

Süperovulasyon amacıyla FSH-P kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada süperovulasyon oranı %89,3 olarak belirlendi (Çizelge 3.2.1). Elde edilen bu sonuç Greyling ve ark (2002) tarafından aynı hormon kullanılarak yapılan ve süperovulasyon oranı % 87,5 olarak bildirilen çalışma ile benzerlik gösterirken, Gonzalez-Bulnes ve ark (2003) tarafından FSH-O ile yapılan ve süperovulasyon orınının %78,6 olduğu çalışmaya göre yüksek bulundu. Bu çalışmada bulunan %89,3' lük oranın Gonzalez-Bulnes ve ark (2003)' nın % 78,6' lık süperovulasyon oranına göre biraz yüksek bulunması; kullanılan gonadotropin preparatından, uygulanan FSH' nın total doz ve süresinden, ilacın kullanılmaya başladığı zamandaki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Ayrıca yukarıdaki araştırmacılardan süperovulasyon amacıyla Hu ve ark (2010)' nın FSH ve eCG' yi; Lehloenya (2013)' nın sadece FSH-P ve FSH + eCG' yi, Iheukwumere (2008)' nin FSH-P; FSH-O ve hMG' yi, karşılaştırdığı çalışmalarda da FSH-P' nin ovaryum cevapları açısından etkin olduğu görülmektedir. Sunulan çalışmada elde edilen süperovulasyon oranı yapılan diğer çalışmarın sonuçları da göz önüne alındığında; keçilerde süperovulasyon için FSH-P' nin başarılı olduğu ve güvenilir bir şekilde kullanılabileceği kanısına varıldı.

Keçilerde embriyo transfer programlarında, corpus luteum'un erken regresyonu (ELR), embriyo transferi uygulamalarında başarıyı sınırlayan önemli bir faktör olduğu ve keçilerde ELR görülme oranının % 0-27 arasında değiştiği bildirilmektedir (Gordon 2004, Gibbons ve Cueto 2011, Paramio ve Izquierdo 2014). Erken luteal regresyonun oluşum nedenleri henüz açık değildir ancak sonuçta elde edilen embriyoların düşük kalitede olmasına ve embriyo elde etme oranlarında azalmaya neden olduğu belirtilmektedir (Cognie ve ark 2003). Keçilerde süperovulasyon amacıyla FSH, ELR' yi önlemek amacıyla da çiftleşmeden sonra FGA kullanılarak yapılan çalışmalarda; ELR oranını, FGA sonrası ELR oranını, transfer edilebilir embriyo oranını ve FGA sonrasındaki embriyo oranını sırasıyla Cervantes ve ark (2007) % 23,5; % 53,5; 1,16±1,3; 4,5±0,8; Espinosa-Marquez ve ark (2004) % 61,5; % 83,3; 0,1±0,1; 5,7±1,6 olarak elde ettiklerini bildirmektedirler. PMSG ile yapılan başka bir süperovulasyon çalışmasında; östrus başlangıcından 84 saat sonra keçilere uygulanan hCG ve GnRH ile ELR oranlarının kontrol grubunda %57,5; hCG grubunda %0 ve GnRH grubunda %37,5 olduğu belirtilmektedir (Saharrea ve ark 1998).

Sunulan çalışmada ise FSH kullanılmasına rağmen ELR oranı %21,4 olarak elde edildi (Çizelge 3.2.2) ve bu oranın keçilerde ELR için bildirilen (Gordon 2004, Gibbons ve Cueto 2011, Paramio ve Izquierdo 2014) kabul edilebilir (%0-27) sınırlar arasında olduğu görüldü. Çalışmada normal oranlar arasında olsa da ELR ile karşılaşılmasının nedenlerinin; çalışmanın başlangıcında süperovulasyon uygulama girişimlerinden önce; keçilerin o andaki ovaryum durumlarının değerlendirilmesinin yapılmamasına bağlı olabileceği ve gonadotropin uygulamaları sonrasında gelişen ve ovule olmayan büyük folliküllerden salgılanan östrojenik etkiden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada elde edilen ELR oranı (%21,4); Cervantes ve ark (2007)'nın yaptığı çalışmadaki sonuçlar (%23,5) ile paralellik gösterirken; Saharrea ve ark (1998)' nın yaptığı çalışmada elde ettiği orandan (%61,5) düşük olduğu görülmektedir. Erken luteal regresyon oranının Saharrea ve ark (1998)' nın çalışmasına göre düşük bulunmasının nedeninin, süperovulasyon amacıyla eCG hormonunun kullanmış olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir.

Keçilerde embriyoların elde edilme işlemi süperovulasyon uygulaması ile doğal aşım ya da suni tohumlama sonrası 6-8. günde uterus kornularının bir vasat

yardımıyla yıkanması aracılığı ile olmaktadır (Paramio 2010, Paramio ve Izquierdo 2014). Keçilerde uterus yıkaması laparotomik, laparoskopik ya da servikal yöntemlerden biri kullanılarak uygulanmaktadır (Paramio 2010, Guerra ve ark 2011, Edmondson ve ark 2012). Uygulanan bu yöntemler ile embriyoların kazanım oranlarının %50-80 arasında değişebileceği bildirilmektedir (Flores-Foxworth 2007). Keçilerde sezon içi yapılan bir süperovulasyon çalışmasında laparatomi ile embriyo elde etme oranının %57-69 olduğu belirtilmektedir (Lehloenya ve Greyling 2010b). Laparotomi kullanılarak Gonzalez-Bulnes ve ark (2003) tarafından yapılan süperovulasyon çalışması sonrasında bu oranın %71,9 olduğu; Heidra ve ark (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada da bu oranın %78,8 olduğu bildirilmektedir. Başka bir süperovulasyon ve embriyo transfer çalışmasında laparotomi ile uterus kornularının yıkanması ile elde edilen embriyo kazanım oranının %80-94 olarak ifade edilmektedir (Greyling ve ark 2002). Iheukwumere (2008) tarafından laparotomi yöntemi kullanılarak ovidukt yıkaması yapılan bir çalışmada ise oranların % 85,2-88,5 olduğu belirtilmektedir.

Sunulan bu çalışmada embriyolar, keçilere laparotomi yapılarak her bir kornunun ayrı ayrı yıkanmasıyla elde edildi ve recovery rate ilk sezonda %60 ve ikinci sezonda ise %75 olarak belirlendi (Çizelge 3.3.1). Elde edilen bu oranın Lehloenya ve Greyling (2010b)' in elde etmiş olduğu %57-69' luk embriyo elde etme oranıyla paralellik gösterdiği görüldü. Sunulan çalışmada embriyo elde etme oranının literatür bilgiler ışığında kabul edilebilir bir oranda olduğu belirlendi.

Menchaca ve ark (2007) tarafından FSH ile yapılan süperovulasyon çalışmasında Day 0 protokolü ile geleneksel protokol karşılaştırılmış ve elde edilen embriyo oranları sırasıyla sezon içi %83, %77; sezon dışı %80, %76 olarak bildirilmiştir. Lehloenya ve Greyling (2010b) tarafından CIDR ve FSH ile yapılan süperovulasyon çalışmasında ise, embriyo oranı %83,3 olarak bildirilmektedir. FSH'nın kas içi ve deri altı uygulaması ile yapılan çalışmada ise embriyo oranlarının %87,6; %98,4 olarak bulunduğu ifade edilmektedir (Lehloenya ve Greyling 2009). Sunulan çalışmada embriyo oranı %73,52 olarak bulundu (Çizelge 3.3.1). Elde edilen sonuçların yapılan çalışmalar ile paralellik gösterdiği belirlendi.

Embriyonun elde edilmesi için uygulanması gereken teknik, embriyoların elde edileceği güne bağlı olarak değişmektedir. Embriyoların elde edilmesi en erken

çiftleşmeden sonraki birinci gün, en geç çiftleşmeden sonraki 7-8. günlerde yapılmaktadır (Flores-Foxworth 2007). Keçilerde yapılan bir çalışmada; çiftleşmeden sonraki 6. günde yapılan uterus yıkaması sonrasında 8 verici hayvandan toplam 46 adet hücre toplandığı bunların 24' ünün morula (%52,2), 2' sinin blastosist (%4,3) ve 20' sinin (%43,5) UFO ve dejenere embriyo olduğu bildirilmektedir (Sapundzhiev 2008). Sunulan çalışmada; 22 verici hayvandan 170 adet hücre toplandı, bunlardan 39' u (%23) morula, 62' si (%36) blastosist ve 69' u (%40,6) UFO ve dejenere embriyo (Çizelge 3.3.1 ve 3.3.2) olarak değerlendirildi. Çalışmada dejenere embriyo ve UFO oranları Sapundzhiev (2008)' in çalışması ile paralellik gösterirken, morula ve blastosist oranlarındaki farklılıkların embriyoların toplanma gününün farklı (7. gün) olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Boer ve Indigenous ırkı keçilerde Greyling ve ark (2002) tarafından yapılan süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmasında Boer ırkından alınan kaliteli embriyo (Grade 1+ Grade 2) oranlarının % 97, Indigenous ırkında alınanların % 64 olduğu ifade edilmektedir. Iheukwumere (2008) ise FSH-P kullanarak % 42,9 Grade 1 ve % 14,3 Grade 2 embriyo; FSH-O kullanarak % 41,7 Grade 1 ve % 25 oranında Grade 2 embriyo elde ettiğini bildirmektedir. Sunulan çalışmada ise süperovulasyon uygulamaları için FSH-P kullanılarak %80,8 Grade 1 ve Grade 2 kalitede embriyo ve % 19,2 dejenere embriyo elde edildi. Sunulan çalışmada Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki embriyoların birlikte oranları göz önüne alındığında elde edilen % 80,8' lik oran Greyling ve ark (2002)' nın bildirdiği Boer ırkı keçilerdeki % 97' lik orandan biraz düşük; Indigenous ırkı keçilerdeki % 64' lük orandan ise biraz yüksek bulunmuştur.

Embriyoların dondurulmasında geleneksel dondurma tekniklerinde çoğunlukla gliserol, etilen glikol, propanediol gibi tek kriyoprotektan madde kullanılırken; hızlı dondurma ya da vitrifikasyonda ise kriyoprotektanlar gliserol ve etilen glikol, gliserol ve propanediol şeklinde kombinasyonlar yapılarak kullanılmaktadır (Palasz ve Mapletoft 1996, Prentice ve Anzar 2011). Rao ve ark (1988), keçi embriyolarında hızlı dondurma çözdürme sonrası gliserol ile %69 DMSO ile %79 oranında başarı elde ettiklerini bildirmektedirler. Keçi embriyolarının dondurulmasında gliserol, etilen glikol ve DMSO'nun 3 aşamalı artan konsantrasyonları kullanılan bir çalışmada; çözdürmeden sonra in vitro kültürde 48.

saatte yaşama oranları karşılaştırıldığında morula aşamasındaki embriyolar için etilen glikolün; DMSO ve gliserole göre daha yüksek, blastosist aşamasındaki embriyolar içinse gliserol' ün diğerlerine göre daha yüksek bulunduğu ifade edilmektedir (Fieni ve ark 1995). Ekspanded blastosist aşamasındaki keçi embriyoları üzerine farklı kriyoprotektanların kullanıldığı bir vitrifikasyon çalışmasında ise %16,5 EG + %16,5 DMSO ile dondurulup çözdürülen embriyoların 24. saatte kültür ortamında yaşama oranı % 90,2 (51/46); %20 EG + %20 DMSO kullanılarak elde edilen oran % 83,5 (73/61); %12,5 EG + %12,5 DMSO + %8 1,3 butanediol ile elde edilen oran ise % 64,7 (34/22) olarak belirtilmektedir (Huang ve ark 2006).

Morula ve blastosist aşamasında bulunan embriyoların kullanıldığı; sunulan araştırmada VS1' de %20 EG; VS2' de %20 EG + %10 G; VS3' de %25 EG + %25 G kullanılarak vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözdürülen 101 adet embriyonun 24. saate 60 (%59,4), 48. saate 34 (%33,6) ve 72. saate 26 (%25,7) adedinin canlı olduğu tespit edildi (Çizelge 3.4.1) ve 24. saatteki viyabilite oranlarının ($p<0,05$) da 48. ve 72. saatteki oranlara göre daha iyi olduğu, embriyoların 48. ve 72. saatlerde dejenerasyona uğramaya başladığı belirlendi (Çizelge 3.4.2). Elde edilen bu sonucun, Huang ve ark (2006)' nın elde etmiş olduğu 24. saatteki viyabilite oranlarına göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedeni; çalışmalarda kullanılan kriyoprotektanların aynı olmaması, dondurulan embriyoların farklı gelişim aşamasında olması, dondurma sırasında embriyoların ekilibrasyon ve vitrifikasyon solüsyonları içerisinde bekleme sürelerinin farklı olması ve embriyoların payetlenmesi sırasında payet içerisinde embriyonun içinde bulunduğu vitrifikasyon solüsyonu volümünün farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Vitrifikasyon uygulamaları için embriyonun en uygun gelişme döneminin blastosist aşaması olduğu bildirilmektedir (Holtz 2005, Gama ve Bressan 2011, Morato ve ark 2011). In vitro üretilmiş embriyoların da dondurma sonrası yaşama oranlarının embriyonun gününden çok embriyonun gelişim aşaması ile bağlantılı olduğu bildirilmektedir. Slow freezing, rapid freezing ya da vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan embriyoların yaşama oranlarında blastosistlerin morulalara göre daha iyi olduğu ifade edilmektedir (Palasz ve Mapletoft 1996). Etilen glikol ve gliserol ile vitrifiye edilen keçi embriyolarının kültür ortamında 48. saatte etilen glikol grubundaki morulalarda yaşama oranının % 23, blastosistlerde % 45; gliserol

grubunda ise % 0; % 35 olarak bulunduğu ifade edilmektedir (Gal ve ark 1993). Martemucci ve D'Alessandro (2013), etilen glikol ve gliserolün artan konsantrasyonlarının kullanıldığı üç aşamalı yöntem ile vitrifikasyon uygulanan ve çözdürülen in vivo üretilen keçi embriyolarında çözdürme sonrası blastosistlerin canlılık yüzdesi % 77,4 (24/31) iken morulalarda % 66,6 (10/15) olarak bulduklarını ve vitrifikasyon sonrası transferde gebelik oranın ise % 70 (7/10) olduğunu belirtmektedirler. Huang ve ark (2006), %16,5 EG + %16,5 DMSO kullanarak dondurdukları morulaların çözdürme sonrası kültürde 24. saatte %80 (16/20), blastosistlerde ise %88,8 (16/18) yaşama oranı tespit ettiklerini ifade etmektedirler. Morato ve ark (2011), tarafından yapılan çalışmada in vitro elde edilen blastosistlerin EG ve DMSO ile vitrifikasyonundan sonra çözdürmelerini takiben 3. saatte yaşama oranı % 44,4; 20. saate % 40,7 olarak bildirilmektedir. Gibbons ve ark (2011), EG ve gliserol ile vitrifikasyon ve çözdürme sonrası transfer edilebilir morula oranını %80, elde edilen gebelik oranını %0, blastosist oranını %100, gebelik oranını %63,6 olarak belirtmektedir. Yapılan bir çalışmada blastosistlerin taze transfer, slow-freezing ve vitrifikasyondan sonra transferdeki gebelik oranlarının sırasıyla %85,7; %50; %37,5 ve embriyo yaşama oranlarının sırasıyla %35,7; %25; %31,3 olarak bildirilmektedir (Lehloenya ve Greyling 2010a).

Sunulan araştırmada morula ve blastosist dönemindeki embriyoların 24. 48. ve 72. saatteki viyabilite oranları morulalar için sırasıyla %51,3; 20,5; 15,4; blastosistler için %64,5; 41,9; 32,3 olarak belirlendi (Çizelge 3.4.3). Buna göre blastosistlerin morulalara göre 48. saatteki canlılık oranları karşılaştırıldığında aralarında önemli fark olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Çizelge 3.4.4). Elde edilen sonuçlara göre vitrfikasyon yöntemiyle embriyoların dondurulup çözdürülmesinde blastosistlerin daha başarılı olduğu ve önceki çalışmalarla paralellik gösterdiği belirlendi. Çözdürme sonrası elde edilen canlı blastosistlerin transfer işlemi gerçekleştirilmemesine karşın; çalışmada in vitro kültür sonuçlarına göre çözdürme sonrası keçi embriyolarında blastosistler ile yapılacak transferlerle gebelik için başarılı sonuçlar alınabileceği düşünüldü.

Vitrifikasyon yöntemi ile dondurma sırasında inek, koyun ve keçi embriyoları için blastosist ve ekspanded blastosist aşamasındaki embriyoların morula aşamasındaki embriyolara göre daha başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir

(Huang ve ark 2006). Elde edilen sonuçlara göre; blastosist aşamasındaki embriyoların çözdürme sonrasındaki viyabilitelerinin morula aşamasındaki embriyoların viyabilite oranlarına göre daha yüksek çıkmasının nedenleri; embriyoların blastosel boşluğunun formasyonundan sonra hücre membranlarının osmotik ve toksik strese karşı daha dirençli olmaları şeklinde açıklanabilir. Blastosel formasyonu sırasında kriyoprotektanların aktif transport mekanizmalarının daha fazla olmasına bağlı olabilir. Diğer bir yandan embriyoların canlılık oranı üzerinde blastomer büyüklüğündeki farklılıkların da rol alabileceği; kompakt morula hücrelerinin blastosist hücrelerinden biraz daha büyük olması sebebiyle geçirgen kriyoprotektanların ayrılması sırasında osmotik strese karşı morulaların daha duyarlı hale gelmelerine neden olabileceği düşünülebilir.

Embriyoların kalitesi, embriyoların morfolojik bütünlüğüne göre sınıflandırılmaktadır. Morfolojik sınıflandırma embriyonun yapısı, sitoplazmanın dansitesi, rengi ve dejenere bölge oranları 1'den 4'e kadar derecelendirilerek yapılmaktadır (Kaymaz 2012). Grade1 (çok iyi) ve 2 (iyi) kalitedeki embriyolar embriyo transferi (ET) ya da dondurma yapılabileceği, Grade 3 (sağlıksız) kalitede olanların ise kültür sonrası ET ya da dondurma yapılabileceği bildirilmektedir (Tekeli 2005, Kaymaz 2012). Sunulan çalışmada ise morfolojik yapılarına göre Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki çözdürülen embriyoların; Grade 1 kalitede olanların 24. 48. ve 72. saatteki viyabilite oranları sırasıyla %78,6; 46,4; 32,1 olarak, Grade 2 kalitede olanlar ise %35,5; 17,8; 17,8 olarak belirlendi (Çizelge 3.4.5). Buna göre Grade 1 ve 2 kalitedeki embriyoların 24. ve 48. saatteki viyabiliteleri arasında istatistiksel açıdan önemli fark ($p<0,05$) olduğu tespit edildi (Çizelge 3.4.6).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Saanen ırkı keçilerin gen kaynağının saklanarak korunmasına katkı sağlamak amacıyla, üreme sezonunda bulunan Saanen ırkı keçilerde, süperovulasyon uygulamalası ardından, kornu uterilerin yıkanmasıyla elde edilen embriyoların kalite değerlendirmesi sonrası vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması ve sonrasında çözdürülmelerini takiben viyabilitelerinin değerlendirildiği bu tez çalışmasında;

- Saanen ırkı keçilerde; senkronizasyon amacıyla FGA'nın ve embriyoların in vivo üretiminde süperovulasyon amacıyla FSH'nın başarılı bir şekilde kullanılabileceği,

- Tercih edilen laparatomi operasyonu ile, embriyoların uterus kornularının tüm kornu boyunca sorunsuz bir şekilde yıkanarak başarılı bir şekilde elde edilebileceği,

- Çiftleşmeyi izleyen 7. günde yapılan uterus yıkaması ile daha yüksek oranda blastosist evresinde embriyo elde edilebileceği,

- İn vivo olarak elde edilen keçi embriyolarının; etilen glikol ve gliserolün artan konsantrasyonları kullanılarak dondurulması ve çözdürülmesi sonrasındaki ilk 24 saatin embriyonun viyabilitesi için önemli bir süre olduğu,

- İn vivo elde edilen ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan keçi embriyolarının, çözdürme ve in vitro kültürleri sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki viyabilite değerlendirmelerine göre, dondurma sırasında embriyonun o anki gelişim aşamasının ve kalitesinin önemli bir rol oynadığı belirlendi.

Sonuç olarak; Saanen ırkı keçilerde in vivo olarak elde edilen embriyoların dondurulması için vitrifikasyon yönteminin tercih edilmesi halinde, çözdürme sonrası viyabiliteleri esas alınarak, dondurulacak embriyonun gelişim aşamasına ve kalitesine göre seçilmesi ve seçilecek embriyo kalitesinin Grade 1 (çok iyi/iyi) ve gelişim aşamasının da blastosist olması gerektiği önerilmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Saanen Keçilerinde Embriyoların Vitrifikasyon Yöntemi İle Dondurulması

Ayşe Merve KÖSE

Doğum ve Jinekoloji (Vet) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2014

Sunulan tez çalışmasında üreme sezonu içinde bulunan Saanen keçilerinde süperovulasyon sonrası elde edilen ve vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözdürülen embriyoların viyabilitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın hayvan materyalini, sağlıklı ve fertil, 2-3 yaş aralığında 15 baş Saaanen ırkı keçi ve 2 teke oluşturdu. Hayvanlara FGA içeren süngerler intravaginal olarak 11 gün süreyle uygulandı. Sünger uygulamasının 9. gününden itibaren süperovulasyon amacıyla 3 gün süreyle azalan dozlarda (2,5;1,5;1ml) sabah/akşam olmak üzere toplam 200 mg FSH kas içi enjeksiyon şeklinde uygulandı. İlk FSH enjeksiyonu ile birilkte 2,2 ml $PGF_2\alpha$ IM olarak uygulandı. Onbirinci gün intravaginal süngerler çıkartıldı ve 12. gün sabah 2 ml GnRH IM olarak uygulandı. Gonadotropin salınım hormonunun uygulamasından 4 saat sonra keçilere günde iki kez doğal aşım yaptırıldı. Embriyoların toplanması için ilk aşımı izleyen 7. günde uterus yıkaması yapıldı. Uterus yıkama işlemi laparotomi yöntemi uygulanarak gerçekleştirildi. Elde edilen embriyolar mikroskop altında incelendikten sonra gelişim aşamalarına ve morfolojik yapılarına göre sınıflandırıldı. Elde edilen Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki embriyolar vitrifikasyon yöntemi ile dondurulduu. Vitrifikasyon işlemi sırasında ekilibrasyon solüsyonu olarak VS_1; %20 EG ve VS_2; %20 EG+ %10 G, vitrifikasyon solüsyonu olarak VS_3; %25 EG + %25 G kullanıldı. Embriyolar VS_1 ve VS_2' de 5 dk ve VS_3'de 30 sn bekletilip sıvı azotta dondurulduu. Embriyolar 0,5 M ve 0,25 M' lık sukroz solüsyonlarında ve ardından m-DPS solüsyonlarında 5' er dk bekletilerek çözdürüldü. Daha sonra kültür medyumuna alınan embriyolar viyabilitelerinin takibi için %5 CO_2 inkubatörüne alındı.

Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözdürülen 101 adet embriyonun in vitro ortamda 24. 48. ve 72. saatlerindeki viyabiliteleri sırasıyla %59,4; %33,6; %25,7 olarak belirlendi. 24. saatteki viyabilite oranlarının ($p<0,05$), 48. ve 72. saatteki oranlara göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Gelişim aşamalarına göre morula ve blastosist dönemindeki embriyoların 24. 48. ve 72. saatteki viyabilite oranları morula aşamasındaki embriyolar için sırasıyla %51,3; 20,5; 15,4; blastosist aşamasındaki embriyolar içinse %64,5; 41,9; 32,3; olarak belirlendi. Blastosist ve morula aşamasındaki embriyoların 48. saatteki canlılık oranları arasında önemli fark olduğu belirlendi ($p<0,05$). Grade 1 kalitede olan embriyoların 24. 48. ve 72. saatteki viyabiliteleri sırasıyla %78,6; 46,4; 32,1; Grade 2 kalitede olanların ise %35,5; 17,8; 17,8 olarak belirlendi. Grade 1 ve Grade 2 kalitedeki embriyoların 24. ve 48. saatteki viyabiliteleri arasında istatistiksel önem ($p<0,05$) olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; Saanen ırkı keçilerde in vivo olarak elde edilen embriyoların dondurulması için vitrifikasyon yönteminin tercih edilmesi halinde, çözdürme sonrası viyabiliteleri esas alınarak, dondurulacak embriyonun gelişim aşamasına ve kalitesine göre seçilmesi ve seçilecek embriyo kalitesinin Grade 1 (çok iyi/iyi) ve gelişim aşamasının da blastosist olması gerektiği önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Dondurma; Embriyo; Saanen keçisi; Vitrifikasyon.

7. SUMMARY

Freezing of embryos by vitrification method in Saanen Goats

In this thesis, viability of freeze-thawed embryos by vitrification following superovulation is aimed in Saanen goats in breeding season.

Material of the study was 2 to 3 years old healthy and fertile 15 Saanen goats and two male. Sponges containing FGA was applied to the animals via intravaginal for 11 days. Total of 200mg FSH injected with decreasing dosages twice in day during three days for superovulation was applied by IM starting 9^{th} day. With first FSH injection, 2,2 ml $PGF_2\alpha$ was applied by IM. Intravaginal sponges were removed on 11^{th} day and 2 ml GnRH was applied on 12^{th} day. Four hours after GnRH injection, natural mating was allowed twice a day. For optaining embryos, following first mating uterine flushing was done on 7^{th} day. Uterine washing process was performed by laparotomy. After microscope examined, obtained embryos was classified according to morphological structure and development stage. Grade 1 and 2 embryos were freezed by vitrification method. During vitrification process, as equilibration solution VS_1; 20% EG and VS_2; 20% EG+ 10% G, as vitrification solution VS_3; 25% EG + 25% G were used. Embryos waiting 5 min in VS_1 and VS_2 and 30 sec in VS_3 was freezed in liquid nitrogen. Embryos waiting in 0,5 M and 0,25 M sucrose and then in m-DPS solution 5 minutes was thawed. For the tracking of viability, embryos were taken in 5% CO2 incubator in culture medium.

Embryos (n=101) freze-thawed by vitrification of viabilities at 24^{th},48^{th} and 72^{nd} hours in invitro environment respectively was determined as 59,4%; 33,6%; 25,7%. It was detected that viability rates at 24^{th} hour were greater ($p<0,05$) then at 48^{th} and 72^{nd} hours. According to development stage, viability rates at 24^{th}, 48^{th} and 72^{nd} hours of embryos in morula and blastocyst period was respectively determined as 51,3%; 20,5%; 15,4% for embryos in morula period; also was determined as 64,5%; 41,9%; 32,3% for embryos in blastosist period. Viability rates at 48^{th} hours in embryos at blastocyst and morula stage was important ($p<0.05$).

Embryos viability rates at 24^{th}, 48^{th} and 72^{nd} hours of Grade 1 embryos were as 78,6%; 46,4%; 32,1%, and that of Grade 2 were 35,5%; 17,8%; 17,8% respectively. Viability in 24^{th} and 48^{th} hours of embryos at Grade 1 and Grade 2 was statistically significant ($p<0,05$).

In conclusion; in case of prefering vitrification method to freze in vivo produced embryos in Saanen goats; based on viability after thawing 1) embryos needs to be selected regarding developmental stages and quality and 2) embryo to be selected should be grade I in quality and blastocyst development.

Key words: Embryos; Freezing; Saanen goats; Vitrification.

8. KAYNAKLAR

1. Abebe G. Reproduction in sheep and goats. In: Yami A, Merkel RC, editors. Sheep and Goat Production Handbook for Ethiopia. 1st ed. Ethiopia: ESGPIP; 2008 .p.59-79.
2. Abebe G. Reproductive management in sheep and goats. ESGPIP, 2010;36:1-11.
3. Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. Anim Reprod Sci. 2012;130:173-79.
4. Ağaoğlu AR, Karakaş K, Kaymaz M. In vivo embryo production in some native goat breed in Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2014;38:1-7.
5. Ahmed MMM, Makawi SE, Jubara AS. Synchronization of oestrus in Nubian goats. Small Rumin Res. 1998;30:113-20.
6. Al Yacoub AN, Gauly M, Holtz W. Open pulled straw vitrification of goat embryos at various stages of development. Theriogelogy. 2010;73:1018-23.
7. Alaçam E. Hormonların klinik kullanımları. In: Alaçam E, editör. Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. 5.baskı. Ankara: Medisan;2005a. p. 41-54.
8. Alaçam E. Üremenin kontrolü. In: Alaçam E, editör. Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. 5.baskı. Ankara: Medisan;2005b. p. 71-80.
9. Aminoor Rahman AN, Bin Abdullah R, Wan Khadijah WE. A review of reproductive biotechnologies and their application in goat. Biotechnology. 2008;7(2):371-84.
10. Amiridis GS, Cseh S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. Anim Reprod Sci. 2012;130:152-61.
11. Amoah EA, Gelaye S. Embryo recovery, evaluation, storage and transfer in goats. Small Rumin Res. 1991;6:119-29.
12. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. Veterinary Reproduction and Obstetrics (Theriogenology), 6th ed, London, Bailliere Tindall, 1989, 603-16.
13. Atay O, Gökdal Ö, Konyalı A, Keskin M. Türkiye'de yetiştirilen keçi genotipleri. Uluslararası Bitkisel Üretim ve Hayvancılık Dergisi. 2011;1(3):103-109.
14. Baldassarre H, Karatzas CN. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. Anim Reprod Sci. 2004;82-83:255-66.
15. Bautista JAN, Kanagawa H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. Jpn J Vet Res. 1998;45(4):183-91.
16. Bettencourt EM, Bettencourt CM, Silva JC, Ferreira P, Matos CP, Romao RJ, Rocha A. Fertilitiy rates following the transfer of ovine embryos cryopreserved using three protocols. Small Rumin Res. 2009;82:112-16.
17. Bowen RA. Embryo transfer in domestic animals. In: Pineda MH, Dooley MP, editors. McDonald's veterinary endocrinology and reproduction. 5th ed. USA: Blackwell;2003. p. 547-71.
18. Brackel-Bodenhausen AV, Wuttket W, Holtz W. Effects of photoperiod and slow-release preparations of brornocryptine and melatonin on reproductive activity and prolactin secretion in female goats. J Anim Sci. 1994;72: 955-62.
19. Bucak MN, Tekin N. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2007;54:67-72.
20. Cervantes MJ, Juarez ML, Mejia VO, Berruecos VJM, Vera AH, Velencia J. Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. Anim Reprod Sci. 2007;97:47-54.
21. Ceyhan A, Karadağ O. Marmara hayvancılık araştırma enstitüsünde yetiştirilen saanen keçilerin bazı tanımlayıcı özellikleri. Tar Bil Der. 2009;15(2):196-203.
22. Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo JA, Guerin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim Reprod Sci. 1992;30:157-84.
23. Cognie Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology. 1999;51:105-16.
24. Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. Theriogenology. 2003;59:171-88.
25. Çetin Y. İmmatür sığır oositlerinin vitrifikasyon tekniği ile etilen glikol ve DMSO kullanarak payetlerde dondurulması. Ankara, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2004.

26. Çetin Y, Sağcan S, Güngör O, Özyurtlu N, Uslu BA. Effect of CIDR-G and melatonin implants and their combination on the efficacy of oestrus induction and fertility of kilis goats. Reprod Dom Anim. 2009;44:659-62.
27. De Souza-Fabjan JMG, Panneau B, Duffard N, Locatelli Y, de Figueiredo JR, de Figueiredo Freitas VJ, Mermillod P. In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. Theriogenology. 2014. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.02.001.
28. Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. Theriogenology. 2002;57:285-302.
29. Doğan I, Nur Z, Günay U, Soylu MK, Sönmez C. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in Saanen does during the transition period. S Afr J Anim Sci. 2004;34(1):18-22.
30. Edmondson MA, Roberts JF, Baird AN, Bychawski S, Pugh DG. Theriogenology of sheep and goats. In: Pugh DG, Baird AN, editors. Sheep and Goat Medicine. 2nd ed. Missouri: Elsevier Saunders; 2012. p.150-230.
31. El- Gayar M, Holtz W. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. J Anim Sci. 2001;79:2436-38.
32. Espinosa-Marquez MC, Valencia J, Zarco L, Escobar-Medina FJ, Colina-Flores F, Arechiga-Flores CF. Effect of fluorogestone acetate on embryo recovery and quality in eCG-superovulated goats with premature luteal regression. Theriogenology. 2004;62:624-630.
33. Fahning ML,Garcia MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic aniamls. Cryobiology. 1992;29:1-18
34. Fatet A, Pellicer-Rubio MT, Leboeuf B. Reproductive cycle of goats. Anim Reprod Sci. 2011;124:211-19.
35. Fieni F, Beckers JP, Buggin M, Bruyas JF, Perrin J, Daubie M, Tainturier D. Evaluation of cryopreservation techniques for goat embryos. Reprod Nutr Dev. 1995;35:367-73.
36. Flores-Foxworth G. Reproductive biotechnologies in the goat. In: Yongquist RS, Threlfall WR, editors. Current therapy in large animal theriogenelogy. 2nd ed. Saint Louis, W.B. Saunders;2007. p. 603-14.
37. Fonseca JF, Zambrini FN, Alvim GP, Peixoto MGCD, Verneque RS, Viana JHM. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. Small Rumin Res. 2013;111:96-99.
38. Gajda B, Smorag Z. Oocyte and embryo cryopreservation-state of art and recent developments in domestic animals. J Anim Feed Sci. 2009;18:371-87.
39. Gal FL, Baril G, Vallet JC, Leboeuf B. In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. Theriogenology. 1993;40:771-77.
40. Gama LT, Bressan MC. Biotechnology applications for the sustainable management of goat genetic resources. Small Rumin Res. 2011;98:133-46.
41. Gibbons A, Cueto M. Embryo transfer in sheep and goats. 2011; p. 1-33. [Erişim tarihi: 25.03.2014]Erişimyeri:http://www.cacprogram.org/fiber/files/pub_Eng_Embryo_Transfer_Guide.pdf.
42. Gibbons A, Cueto MI, Pereyra Bonnet F. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. Small Rumin Res. 2011;95:61-64.
43. Gomez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Tolendano-Diaz A, Lopez-Sebastian A. Reproductıve seasonalıty and ıts control ın spanısh sheep and goats. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 2012;15(1):47-70.
44. Gonzalez-Bulnes A, Carrizosa JA, Diaz-Delfa C, Garcia-Garcia RM, Urrutia B, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. Small Rumin Res. 2003;48:9-14.
45. Gordon I. Controlled reproduction in sheep and goats. 1st ed. New York, CABI, 1997; 416-34.
46. Gordon I. Reproductive technologies in farm animals. 1st ed. Cambridge, CABI, 2004; 82-107.
47. Greyling JPC, van der Nest M. Synchronization of oestrus in goats: dose effect of progestagen. Small Rumin Res. 2000;36:201-7.
48. Greyling JPC, van der Nest M, Schwalbach LMJ, Muller T. Superovulastion and embryı transfer in South African Boer and Indigenous feral goats. Small Rumin Res. 2002;43:45-51.
49. Guerra MMP, Silva SV, Batista AM, Coleto ZF, Silva ECB, Monteiro Jr PLJ, Carneiro GF. Goat reproductive biotechnology in Brazil. Small Rumin Res. 2011;98:157-63.

50. Guignot F, Bouttier A, Baril G, Salvetti P, Pignon P, Beckers JF, Touze JL, Cognie J, Traldi AS, Cognie Y, Mermillod P. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. Theriogenology. 2006;66:1004-11.
51. Heidari F, Gharagozloo F, Vojgani M, Farrokhi N, Vajhi AR, Masoudifard M, Mirtorabi M, Nayeri Fasaei B. The effect of a GnRH antagonist pre-treatment, in the superovulation of goats. Small Rumin Res. 2010;93:140-43.
52. Holtz W. Recent developments in assisted reproduction in goats. Small Rumin Res. 2005;60:95-110.
53. Hong QH, Tian SJ, Zhu SE, Feng JZ, Yan CL, Zhao XM, Liu GS, Zheng SM. Vitrification of Boer goat morulae and early blastocysts by straw and open-pulled straw method. Reprod Dom Anim. 2007;42:34-38.
54. Hu J, Boa J, Ma X, Li W, Lei A, Yang C, Goa Z, Wang H. FSH is superior to eCG for promoting ovarian response in chinese bamei gilts. Anim Reprod Sci. 2010;122:313-16.
55. Huang JC, Lin HH, Wu JS, Tang PH, Wang DG, Liu BT. Vitrification of caprine embryos in microdrops. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture:47-58,7-10 November 2006, Tainan (Taiwan, R.O.C).
56. Iheukwumere FC. The effects of different gonadotrophin treatments on the embryo generation and quality of embyos in west african dwarf goats. Journal of Agriculture and Social Research (JASR). 2008;8(1):57-61.
57. Ishwar AK, Memon MA. Embryo transfer in sheep and goats: a review. Small Rumin Res. 1996;19:35-43.
58. Kobayashi S. Manual for ovum pick-up and in vitro fertilization. Japan International Cooperation Agency. Japan, 2007.
59. Kalkan C, Horoz H. Pubertas ve seksüel sikluslar. In: Alaçam E, editör. Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. 5.baskı. Ankara: Medisan,; 2005. p.23-40.
60. Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. Manual of bovine embryo transfer. 1st ed, Japan, Japan Livestock Technology Association, 1995, 259-315.
61. Karaca F, Tasal I, Alan M. Preliminary report on induction of estrus with multiple eCG injections in Colored Mohair goats during the anestrus season. Anim Reprod Sci. 2009;114:306-10.
62. Kaymaz M. Yardımcı üreme teknikleri. In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A, editör. Çiftlik hayvanlarında doğum ve infertilite. 1.baskı. Malatya: Medipres;2012. p. 695-811.
63. Keskin M, Gökdal Ö, Atay O, Konyalı A. Türkiye'de yetiştirilen keçi ırkları. Tarım Türk Dergisi. 2012;7(35): 71-74.
64. Kılboz Eİ, Karaca F. Üreme mevsimi dışında genç keçilerde flugeston asetat vaginal sünger ve norgestomet kulak implantı uygulamalarıyla östrüslerin uyarılması. YYU Vet Fak Derg. 2010;21(1): 1-6.
65. Kraemer DC. Embryo collection and transfer in small ruminants. Theriogenology. 1989;31(1):141-48.
66. Lehloenya KC, Greyling JPC. Grobler S. Effect of seoson on the superovulatory response in boer goat does. Small Rumin Res. 2008;78:74-79.
67. Lehloenya KC, Greyling JPC. Effect of route of superovulatory gonadotrophin administration on the embryo recovery rate of boer goat does. Small Rumin Res. 2009;87:39-44.
68. Lehloenya KC, Greyling JPC. Embryo transfer using cryopreserved Boer goat blastocysts. S Afr J Anim Sci. 2010a;40:446-50.
69. Lehloenya KC, Greyling JPC. The ovarian response and embryo recovery rate in boer goat does following different superovulation protocols, during the breeding season. Small Rumin Res. 2010b;88:38-43.
70. Lehloenya KC. Preliminary results evaluating a simplified superovulation protocol in Boer goats. Small Rumin Res. 2013;113:171-74.
71. Martemucci G, D'Alessandro AG. Efficiency of FSH/LH treatments for in vivo production of embryos and their cryopreservation by different methods in goats. Small Rumin Res. 2013;114:264-71.
72. Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. Reprod Dom Anim. 2001;36:49-55.
73. Mellado M. Goat husbandry/Reproductive management. In: Roginski H, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences. 1st ed. Oxford: Elsevier;2002. p. 1253-58.
74. Mellado M. Goat: Reproductive management. In: Fuquay JW, Fox PF, Mc Sweeney PHL, editors. Encyclopedia of Dairy Sciences. 2nd ed. Oxford: Elsevier;2011. p. 834-40.

75. Menchaca A, Vilarino M, Crispo M, Pinczak A, Rubianes E. Day 0 Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. Theriogenology. 2007;68:1111-17.
76. Morato R, Romaguera R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Vitrification of in vitro produced goat blastocysts: effects of oocyte donor age and development stage. Cryobiology. 2011;63:240-44.
77. Motlomelo KC, Greyling JPC, Schwalbach LMJ. Synchronisation of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. Small Rumin Res. 2002;45:45-49.
78. Noakes ED, Parkinson TJ, England GCW, Arthur GH. Embryo transfer in large domestic animals. In: Noakes ED, Parkinson TJ, England GCW, Arthur GH, editors. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8th ed. Oxford: W.B. Saunders; 2001. p. 819-36.
79. Özer MÖ, Doğruer G. Aşım sezonunda şami keçilerinde progestagen içeren deri altı implant ve vaginal süngerlerin uzun ve kısa süreli uygulamalarının fertilite üzerine etkisi. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2011;17(1):47-52.
80. Özer MÖ. Keçilerde östrüs senkronizasyon yöntemleri. Hatay, Yüksek Lisans Semineri, 2007.
81. Özyurtlu N, Bademkıran S. Koyunlarda östrus senkronizasyonu ve östrusu uyarma yöntemleri. Dicle Üniv Vet Fak Derg. 2010;1(1):17-22.
82. Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes:recent advances. Biotechnology Advances. 1996;14(2):127-149.
83. Paramio MT. In vivo and in vitro embryo production in goats. Small Rumin Res. 2010;80:144-48.
84. Paramio M-T, Izquierdo D. Assisted reproduction technologies in goats. Small Anim Res. 2014;1-15.
85. Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. Cell tissue banking. 2008;9:267-77.
86. Perera GDRK, Pushpakumara PGA, de Silva LNA, Perera BMAO, Alexander B. Establishment of multiple ovulation and embryo transfer (MOET) technology for goats in Sri Lanka. FAO/IAEA International Symposium on Sustainable Improvement of Animal Production and Health; 2009 June 8-11, Vienna, Austria.
87. Pintado B, Gutierrez-Adan A, Llano BP. Superovulatory response of murciana goats to treatments based on PMSG/ANTI-PMSG or combined FSH/PMSG administration. Theriogenology. 1998;50:357-64.
88. Prentice JR, Anzar M. Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. Vet Med Int. 2011:1-11.
89. Rall WF. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. Anim Reprod Sci. 1992;28:137-45.
90. Rao VH, Sarmah BC, Agrawal KP, Ansari MR, Bhattacharya NK. Survival of goat embryos frozen and thawed rapidly. Anim Reprod Sci. 1988;16:261-64.
91. Robertson I, Nelson RE. Certification and identification of embryos. In: Stringfellow DA, Givens MD, editors. Manual of the international embryo transfer society. A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. 4th ed. USA: International Embryo Transfer Society; 2010. p. 86-105.
92. Romano JE. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. Small Rumin Res. 2004;55:15-19.
93. Sağırkaya H, Bağış H. Memeli embriyolarının kriyoprezarvasyonu. Uludağ Üniv J Fac Vet Med. 2003;22(1-2-3):127-135.
94. Sağırkaya H. Sığırlarda embriyo transfer uygulaması ve türkiye açısından önemi. Uludağ Üniv J Fac Vet Med 2009; 28(2):11-19
95. Saharrea A, Valencia J, Balcazar A, Mejia O, Cerbon CL, Caballero V, Zarco L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: Effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. Theriogenology. 1998;50:1039-52.
96. Sapundzhiev E. Conservation of ancient breed small ruminants as frozen embryos. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2008;11(4):251-55.
97. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reproduction. 2011;141:1-19.
98. Savaş T. Türkiye'de süt keçiciliğinde son yıllardaki gelişmeler. 2008; [Erişim tarihi: 18.02.214]. Erişim adresi: http://zootekni.comu.edu.tr/fayda/kecigelismeler.pdf.

99. Sousa FC, Melo CHS, Filho AT, Avelar SRG, Moura A, Martins JAM, Freitas VJ, Teixeira DIA. Ovarian follicular response to different hormonal stimulation treatments in caninde goats. Anim Reprod Sci. 2011;125:88-93.
100. Taşdemir U, Ağaoğlu AR, Kaymaz M, Karataş K. Ovarian response and embryo yield of Angora and Kilis goats given the day 0 protocol for superovulation in the non-breeding season. Trop Anim Health Prod. 2011.
101. Taşdemir U, Satılmış M, Karaşahin T, Kızıl SH, Kaymaz M, Imai K. The effect of single epidural plus intramusculer injection of FSH on superovulatory response in Anatolian Black cow. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2012;59:211-16.
102. Tekeli T. Embriyo nakli. In: Alaçam E, editör. Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. 5.baskı. Ankara: Medisan;2005. p. 81-97.
103. TÜDKİYEB; Türkiye Damızlık Koyun Keçi Yetiştiricileri Merkez Birliği. Türkiye'de keçi yetiştiriciliği.2012;[Erişimtarihi:18.02.2014].Erişimadresi:http://turkiyekoyunkeci.org/ dosya/350türkiye keçiciliği yol haritası.pdf.
104. TÜİK; Türkiye İstatistik Kurumu. 2012; [Erişim tarihi: 16.02.2014]. Erişim adresi: http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002.
105. Uçar M, Özyurtlu N. Üremenin denetlenmesi. In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A, editör. Çiftlik hayvanlarında doğum ve infertilite. 1.baskı. Malatya: Medipres; 2012.p. 549-65.
106. Uysal O. Sığır embriyolarının vitrifikasyonu. Vet Hekim Der Derg. 2007;78(4):45-50.
107. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim Reprod Sci. 2000;60-61:357-64.
108. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. Theriogenology. 2006;65:236-44.
109. Verma OP, Kumar R, Kumar A, Chard S. Assisted reproductive techniques in farm animal from artificial ınsemination to nanobiotechnology. Vet World. 2012;5(5):301-10.
110. Vivanco HW. Recent developments in reproductive techniques of sheep and goats. In: Timon VM, Hanrahan JP, editors. Small ruminant production in the developing countries. 1st ed. Rome: FAO; 1985. p.31-51.
111. Whitley NC, Jackson DJ. An update on estrus synchronization in goats: A minor species. J Anim Sci. 2004;82:270-276.
112. Youngs CR. Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep and goats. J Vis Exp. 2011;54:1-4.

10. ÖZGEÇMİŞ

Konya İli, Çumra İlçe'sinde 1985 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimini Merkez Atatürk İlkokulu (1991-1995 Çumra/Konya); İnkılap İlkokulu (1995-1996 Konya) ve Mehmet Akif Ersoy Lisesi (1996-1999 Konya)'nde tamamladı. Lise öğrenimini Muhittin Güzelkılınç Süper Lisesi (1999-2003, Konya)' nde tamamladı. 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı ve fakülteden 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde doktora öğrenimine başladı. T.C Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı - TÜBİTAK Kamu Araştırmaları Grubu (KAMAG) – TÜBİTAK MAM GMBE bünyesinde ortak yürütülen Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının *In Vitro* Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-1 (TÜRKHAYNGEN-1, *106G005*) projesinde Nisan 2009 - Ağustos 2011 tarihleri arasında bursiyer olarak çalıştı. Eylül 2011 tarihinde Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitü kadrosunda birimde görevli görev tipi ile Veteriner Fakültesi Klinik Bilimler Bölümü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir. Orta derecede İngilizce bilmektedir.