

Derleme

Sığır Embriyolarının Gelişim Evreleri ve Kalite Değerlendirilmesi

Uğur KARA^{1*}, Tayfur BEKYÜREK²

¹Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji ABD, Kayseri, Türkiye

Sorumlu yazar: 0 532 553 26 81, ugurvetkara@hotmail.com

Geliş Tarihi:19.03.2019 / Kabul Tarihi: 09.05.2019

Özet

Sığırlarda embriyo transferi uygulamaları günümüzde gittikçe yaygınlaşmaktadır. Sürülerdeki genetik olarak en değerli dişilerden in vivo ve in vitro yöntemlerle yılda yaklaşık 1250000 transfer edilebilir embriyo üretilmektedir. Ayrıca bu embriyolardan yılda yaklaşık 1000000 transfer gerçekleştirilmektedir. Avrupa Embriyo Transfer Topluluğunun verilerine göre dünyada embriyo üretiminde Kuzey Amerika birinci sıradadır. Embriyo transferi çalışmalarında embriyo kalitesi, embriyo morfolojisi, taşıyıcı kalitesi, uygulayıcının tecrübesi ve çevresel faktörler elde edilecek gebelik oranlarını etkilemektedir. Embriyoların gelişim evreleri ve kalitelerinin belirlenmesi bunların taze transferi, dondurulması, saklanması ve gelişim evrelerine göre gerekirse kültüre edilmesi başarılı gebelik oranları elde etmek için önemlidir. Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğu kriterlerine göre standart değerlendirme embriyonun gelişim dönemi ve morfolojik bütünlüğüne göre kalite değerlendirilmesi ile yapılmaktadır. Aynı topluluk tarafından gelişim evrelerinin ve kalitelerin değerlendirme kodları sayısal olarak belirlenmiştir (gelişim evreleri için 1-9, embriyo kalitesi için 1-4). Bu derlemenin amacı sığırlarda embriyo morfolojisi ve kalite değerlendirme kriterleri hakkında bilgi vermektir.

Anahtar kelimeler: Embriyo, kalite değerlendirmesi, sığır

Development Stages and Quality Evaluation of Bovine Embryos

Abstract

Embryo transfer applications are becoming widespread nowadays in cattle. About 1250000 transferable embryos are produced annually using in vivo and in vitro techniques

from genetically most valuable females in herds. In addition, approximately 1000000 transfers are carried out per year from these embryos. According to data from the European Embryo Transfer Society, North America ranks first in embryo production worldwide. In embryo transfer studies, embryo quality, embryo morphology, recipient quality, experience of the practitioner and environmental factors affect the obtained pregnancy rates. The determination of the morphology and the quality of embryos is important to achieve successful pregnancy rates in their fresh transfer, freezing, storage and cultivation according to their developmental stages. Standard evaluation according to International Embryo Transfer Society criteria is done by evaluating the developmental stage and morphological integrity of the embryo. Evaluation codes of development stages and quality were determined numerically by this association (for developmental stages 1-9, for embryo quality 1-4). The aim of this review is to give basic information about the morphology and quality evaluation criteria of cattle embryos.

Key words: Embryo, quality evaluation , cattle.

1.Giriş

Embriyo transferi verici dişinin genital kanalından elde edilen (in vivo) veya laboratuvar koşullarında üretilen (in vitro) embriyoların östrusları eş zamanlı olarak senkronize edilmiş başka taşıyıcı dişilere transfer edilmesi işlemidir (Kanagawa ve ark., 1995; Sağırkaya, 2009). Bu amaçla embriyo vericisi inekte süperovulasyon protokolü uygulanarak çok sayıda embriyo elde edilmeye çalışılır ve tohumlamadan sonraki 7. günde kornu uteriler yıkanarak embriyolar elde edilir. Daha sonra elde edilen embriyolar kalite açısından değerlendirilir. Transfer edilebilir embriyolar direkt olarak önceden hazırlanmış senkronize taşıyıcılara transfer edilir veya uygun bir yöntemle gelecekte kullanılmak üzere dondurulurlar (Sağırkaya, 2009) .

Sürülerdeki genetik olarak en değerli dişilerden in vivo ve in vitro yöntemlerle dünyada yılda yaklaşık 1250000 transfer edilebilir embriyo üretilmektedir. Bu embriyolardan da yılda yaklaşık 1000000 transfer işlemi gerçekleştirilmektedir. Avrupa Embriyo Transfer Topluluğunun (IETS) verilerine göre dünyada embriyo üretiminde Kuzey Amerika birinci sırada yer almaktadır (Perry, 2017).

Bir embriyonun transfer edilebilir olup olmadığını bilmenin en gerçekçi yolu, embriyo canlı ise onu uygun bir alıcıya transfer etmek ve yavru doğumuna bakmaktır. Elde edilen her embriyonun transfer edilmesinin pratik olmaması uygulayıcılar tarafından embriyonun

gebelik oluşturma olasılığının belirlenmesini önemli kılmaktadır (Barfield, 2015). Sığır embriyolarının değerlendirilmesi normal olarak 50-100x büyütme aralığında stereo mikroskop altında, küçük bir petri kabına embriyolar konarak yapılır. Embriyo ve zona pellusida'yı farklı açılardan görebilmek için, embriyonun petrinin dibinde “yuvarlatılması” gereklidir. Sığır embriyosunun genel çapı, 12 ile 15 µm arasında bir zona pellusida kalınlığı dahil olmak üzere, 150 ila 190 µm'dir. Embriyonun genel çapı, bir hücre aşamasından blastosist aşamasına kadar hemen hemen hiç değişmeden kalır. Embriyoların gelişim aşamalarının bilinmesi onların elde edildikleri donörlerin östrus siklus gününde (genellikle östrustan sonraki 7. gün) olması gereken gelişim aşamaları ile karşılaştırılması için önemlidir. Bir embriyonun transfer edilmeye veya dondurulmaya değer olup olmadığı ve embriyonun ihracat için uygun olup olmadığına dair karar, embriyoları değerlendiren kişinin uzmanlığına ve deneyimine bağlıdır (Bó ve Mapletoft, 2013). Bu derlemede sığırlarda embriyo morfolojileri ve kalite değerlendirmesi hakkında temel bilgiler verilmiştir.

1.1 Embriyoların Gelişim Evreleri

Uygulayıcıların çoğu, Uluslararası Embriyo Transferi Topluluğu (IETS) tarafından belirlenen standartları kullanarak in vivo olarak üretilen (IVD) embriyoları derecelendirmede iyi sonuçlar alırken, in vitro olarak üretilen (IVP) embriyolarının IVD embriyolarından farklı morfolojilere sahip olduğunu bildirilmişlerdir (Barfield, 2015). IVP embriyolarının transferinden sonraki gebelik oranları (Hasler, 2000) ve dondurma koşullarında canlılık oranları IVD embriyolarından düşüktür (Pollard ve Leibo, 1993). Açıkçası bu iki tip embriyoda mitokondriyal fonksiyon, metabolizma gelişim hızları ve gen ekspresyonu yönünden farklılıklar vardır (Barfield, 2015).

Yeni ovule olmuş dişi gamet için en doğru tanımlama oosittir (Sağırkaya, 2009; Seidel ve Seidel, 2019). Suni tohumlama sonrası fertilizasyonun şekillenmesiyle oluşan zigot gelişiminin ilk beş gününde hızla bölünerek yumurta kanalından (oviduct) uterusu doğru siliyer hareketleri, oviduct'un kontraksiyonları ve östrojen gibi hormonların etkisiyle göç etmeye başlar ve göç sırasında bölünmeler devam eder. Embriyo 2 hücre, 4 hücre gibi bölünme aşamalarına ulaşır ve 16 hücreden itibaren embriyo morula olarak adlandırılır. Fertilizasyondan sonraki 5. günde embriyo hücrelerinin şekli küreselden poligonal forma dönüşerek embriyo kompakt bir yapı almaya başlar ve kompaktlaşma embriyonun kalitesini belirleme de önemli bir morfolojik gelişim evresi olarak değerlendirilir. Embriyodaki kompaktlaşma aşaması sığırlarda 5-6. günlerde blastomerler arasında sıkı bağlantıların

kurulmasıyla başlar. Sığırlarda kompaktlaşma hücre sayısına bağlı olmasa da genellikle 32 hücreli aşamada meydana gelmektedir. Bu aşamadaki embriyolara kompakt morula adı verilmektedir. İneklerde östrüstan sonraki 6. günde kompaktlaşmanın görülmemesi gelişmede gecikme olduğunun göstergesidir. Blastosist aşamasına geçişte blastosöl formasyonunun şekillenmesi gelişimin normal devam ettiğinin, östrüstan sonraki 7. ve 8. günlerde gözlenmemesi ise gelişmede bir gecikme olduğunun önemli bir göstergesi olarak değerlendirilir (Curtis, 1991; Sağırkaya, 2019; Seidel ve Seidel, 2019). IETS kriterlerine göre standart değerlendirme embriyonun gelişim dönemine ve kalitesine göre yapılmaktadır. Gelişme dönemi sınıflandırması 1'den (Fertilize Olmamış Oosit-UFO veya bir hücreli embriyo) 9'a (Expanded Hatching Blastosist) kadar yapılmaktadır.

Morula (Aşama kodu 3): Bu aşama genel olarak hücre bilyesi (ball of cell) olarak adlandırılır (Kanagawa, 1995). En az 16 hücre yığını ve blastomerleri birbirinden ayırmak zordur. Embriyonun hücresel kitlesi perivitellin alanının çoğunu kaplar (Bó ve Mapletoft, 2013; Kanagawa, 1995).

Hücreler arasında sıkı bağların gelişmesiyle blastomerler büzüşür ve perivitellin boşlukta artış meydana gelir. Bu aşamadaki embriyoya kompakt morula adı verilir. Morfolojik olarak bu aşamadaki embriyolarda hücreler iç içe girmiş ve birbirlerinden ayırt edilemezler.

Kompakt Morula (Aşama Kodu 4): Bireysel blastomerler birleşmiş ve kompakt bir kütle oluşturmuştur. Embriyonun hücresel kitlesi perivitellin alanının % 60-70' ini kaplar (Bó ve Mapletoft, 2013). Hücreler arası bağlantıların oluşması sonucunda embriyo iç ve dış hücre katmanlarını şekillendirir. Bu olay blastosöl formasyonu için ön koşuldur ve sığırlarda fertilizasyondan sonra 6-7. günlerde görülür. Dış hücre katında sodyumun hücre içine aktif transportuyla iyon içeriği şekillenmeye başlar ve bu da osmotik basınç değişikliğine neden olarak sıvı birikimine yol açar. Sonunda dış hücre kümesinin altında blastosist kavitesi şekillenir. Erken blastosist aşamasında iki farklı blastomer bulunur. Bunlardan biri blastosölü çevreleyen farklılaşmış trofoblast hücreleri diğeri ise henüz farklılaşmamış olan iç hücre kütesidir (ICM-İnner Cell Mass).

Erken Blastosist (Aşama Kodu 5): Bu aşamada embriyonun blastosöl boşluğu şekillenmiş ve genel olarak bir işaretçi halkası görüntüsü verir. Embriyo kütlesi perivitellin alanının % 80' ini kaplar. Bu aşamada iç hücre kütesini trofoblastlardan ayırt etmek zor dur ve bu nedenle embriyonun kalitesi tartışılabilir (Bó ve Mapletoft, 2013).

Blastosöl formasyonu embriyonun bir tarafında şekillenerek embriyonun erken blastosist aşamasına geçmesini sağlar. Bu aşamada blastosöl hacmi embriyonun total hacminin % 50'sinden daha azdır. Blastosist kavitesi gelişmeye devam ederken ICM/blastosist kavite oranı değişir. Kavite embriyonun % 50'sinden daha fazlasını kapladığında embriyo blastosist adını alır.

Blastosist (Aşama Kodu 6): Dış trofoblast tabakasının farklılaşması belirgin ve daha da koyulaşmıştır. Daha kompakt hale gelen iç hücre kümesi belirgindir. Blastosöl oldukça belirginleşmiştir ve embriyo perivitellin alanın çoğunu kaplar. Gelişimin bu aşamasında trofoblast ve inner cell mass'lar arasında görsel farklılaşma mümkündür (Bó ve Mapletoft, 2013).

Blastosist kavitesinin içerisindeki osmotik basınç arttığında embriyo da genişlemeye devam ederek dış çapı artar. Bu sırada embriyoyu saran dış zar zona pellusida gerilir ve incelik. Embriyo bu aşamada expanded (genişlemiş) blastosist adını alır. İç hücre kümesi kompakt bir hal almıştır ve hücre sayısı in vivo ve in vitro üretilen embriyolarda farklılık gösterir.

Expanded Blastosist (Aşama Kodu 7): Embriyonun çapı dikkat çekici bir şekilde artmış ve bununla uyumlu olarak zona pellusidanın orijinal kalınlığı yaklaşık olarak üçte birine kadar incelmıştır (Bó ve Mapletoft, 2013).

Fertilizasyondan sonraki 9-11. günlerde zona pellusida da yırtılma şekillenir ve embriyo buradan dışarı çıkar. Bu olaya hatching ve embriyoya da hatching embriyo denir. Bu olay zona da basınç artışı, embriyoda kompaktlaşma, ekspansiyon ve trofoblast hücrelerinde ki enzimatik aktivite ile oluşur. Embriyo zonadan tamamen kurtulduğunda hatched embriyo adını alır. Hatched embriyo in vivo koşullarda uterusu temas etmeye ve uterusu yerleşmeye hazırdır.

Hatched Blastosist (Aşama Kodu 8): Gelişimin bu aşamasındaki embriyolar zona pellusida'dan dışarı çıkma sürecinde ya da tamamen zona pellusida'dan dışarı çıkmış olabilirler. Zona bütünlüğü bozulmamış olanların iyi ayırt edilebilen küresel bir blastoseli mevcuttur veya blastosöl kollabe olmuş olabilir. Hatched blastosistler tekrar genişleyip mühür halkası şeklindeki görünimleri ortaya çıkmadıkça identifikasyonları zor olabilir. Embriyonik gelişim aşamalarında numaralandırma ve uluslararası kısaltmalar aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Embriyonik gelişim aşamalarında numaralandırma ve uluslararası kısaltmalar.

No	Gelişim Aşaması	Uluslararası Kısaltma
1	Fertilize Olmamış	UFO
2	2-12 Hücreli Aşama	
3	Erken Morula	M
4	Morula (Kompakt Morula)	CM
5	Erken Blastosist	EBL
6	Blastosist	Bl
7	Ekspanded Blastosist	ExpBl
8	Hatched Blastosist	HedBl
9	Ekspanded Hatched Blastosist	ExpHedBl

Donörlerin östrus günlerine göre embriyonik gelişim aşamaları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Donörlerin östrus günlerine göre embriyonik gelişim aşamaları (Seidel ve Seidel, 2019).

Gelişim aşaması	Östrusun başlamasından sonraki günler
1-hücre	0-2
2-hücre	1-3
4-hücre	2-3
8-hücre	3-5*
16-hücre	4-5*
Erken morula	5-6
Kompakt morula	5-7
Erken blastosist	7-8
Blastosist	7-9
Expanded blastosist	8-10
Hatching blastosist	9-11

* Embriyolar genellikle 8 ila 16 hücreli safhada oviductan uterusu doğru hareket eder.

1.2. Embriyoların Kalite Değerlendirilmesi

Embriyo kalitesinin kodları sayısaldir ve embriyonun morfolojik bütünlüğüne göre yapılır (Bó ve Mapletoft, 2013). Çoğu uygulayıcı ya da embriyolog iyi kalitede bir embriyoyu

kolaylıkla belirleyebilir iken ikinci ya da üçüncü kalite embriyoları ayırt etmek zor olabilir. Ayrıca birçok uzman IVP embriyoların daha değişken morfolojilere sahip olduğunu ve bu nedenle derecelendirmenin daha zor olduğunu bildirmektedir (Wright ve Ellington, 1995). Bu farklılıklar perivitellin boşluğun büyüklüğü, zayıf kompaktlaşma, hücresel artıklar, bozulmuş hücreler, vakuoller, hücre şekli, opaklık ve lipid yoğunluğu olarak sıralanabilir (Barfield, 2015). Bazı çalışmalar, perivitellin boşluğunun büyüklüğü konusunda IVP ve IVD embriyolar arasında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bu genellikle embriyoların morula aşamasında kompaktlaşmanın ne kadar iyi olduğu ile ilişkilidir (Wright ve Ellington, 1995). Yapılan bir çalışmada, *in vivo* olarak üretilen zigotlar ve mezbaha materyalinden *in vitro* üretilen iki hücreli embriyolar aynı şekilde kültüre edilmiş ve IVF embriyolarda morula aşamasında perivitellin boşluğun daha az olduğu gözlenmiş (Van Soom ve de Kruif, 1992). Birçok uygulayıcı ve embriyolog, IVP embriyoları ile ilişkili hücresel artıkların miktarının fazla olduğunu bildirmiştir. Bu durum, IVP ve IVD embriyolarının detaylı değerlendirmeleri ile doğrulanmıştır (Barfield, 2015). Yapılan bir çalışmada araştırmacılar hücresel atıkların embriyoların perivitellin bölgesinde, blastosöl boşluğunda ve ICM çevresinde bulunduğunu belirlemişlerdir (Rizos ve ark., 2002). Bu durum özellikle IVP embriyolarının değerlendirilmesini zorlaştırır, özellikle blastosist aşamasında zona pellusida ve genişleyen embriyo arasında sıkışan hücresel atık miktarının değerlendirilmesi zor olabilir.

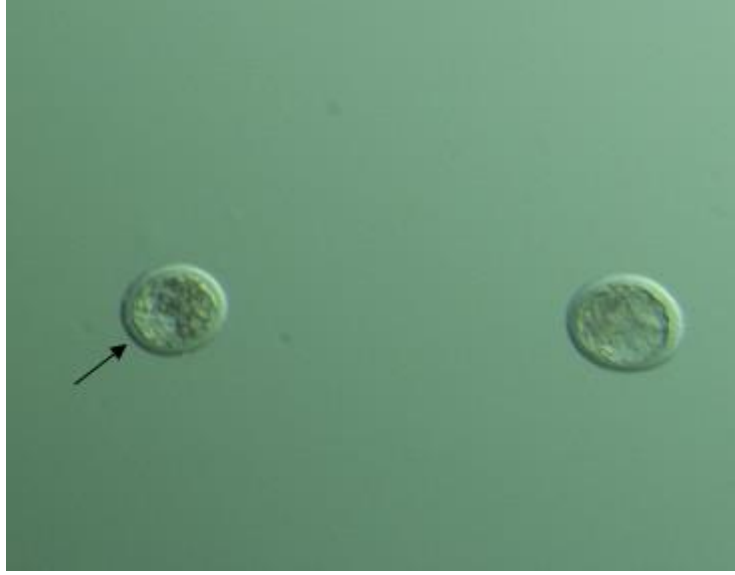
Embriyodaki canlı hücre miktarını etkin bir şekilde değerlendirebilmek, embriyoya uygun kalite derecesini vermek için önemlidir (Barfield, 2015). Bazı embriyo hücrelerinde kabarcık veya vakuol gibi görülen yapılar onlara granuler görünüm verebilir. Bu durum hem IVP hem de IVD embriyolarda meydana gelir, ancak görülme insidansı IVP embriyolarda daha yüksektir (Crosier ve ark., 2000; Shamsuddin ve ark., 1992). IVP embriyolarda blastomerlerin sitoplazması içinde IVD türevlerinden daha fazla vakuolizasyon görülür. Vakuolizasyonun bilinen bir sebebi yoktur, fakat genellikle düşük embriyo kalitesi ile ilişkilidir (Barfield, 2015). IVP ve IVD embriyolarının ultrastrüktürel analizi lipid miktarı ile ilgili farklılıkları da ortaya çıkarılmıştır (Crosier ve ark., 2000). Yapılan bir çalışmada superovüle edilmiş ineklerden elde edilen morulalar mezbahadan alınan ovaryumlardan üretilen morulalarla karşılaştırıldı. IVF embriyoları IVP embriyolarından daha fazla hacimde lipid yoğunluğuna sahipti. Kültüre edilme süresince % 10 serumda kültüre edilen IVF embriyolar ilk 72 saatlik kültür sırasında sınırlı serumlu, serumuz kültüre edilenler ve *in vivo* olarak üretilen embriyolardan daha yüksek bir lipid yoğunluğuna sahipti. Bir başka çalışmada IVF embriyolarında IVP embriyolarına göre daha yüksek lipid damlacıkları görülmüştür. Bu

sonuçlar embriyoların zayıf kryotoleransı ile ilişkilendirilmiştir (Pollard ve Leibo, 1994; Rizos ve ark., 2002). Daha yüksek lipid içeriği embriyoların daha koyu görünmesine ve hücrelerin daha opak olmasına neden olabilir. Vakuollerde olduğu gibi embriyolar granüler görünebilir (Barfield, 2015). Yapılan bir çalışmada IVD embriyolarının aksine IVP embriyolarının daha fazla kare şeklinde şişmiş blastomerlere ve blastosistte düzensiz ve opak hücrelere sahip olduğunu bildirilmiştir (Smith, 2009). IVP embriyolarda belirtilen özelliklerin çoğu kalitelerinin düşük olduğunu ve gerçekten de bu embriyolar transfer edildiğinde düşük gebelik oranları elde edilebileceğini göstermektedir (Hasler, 2000). IVD ve IVP embriyolardan elde edilen gebelik oranları arasındaki fark in vitro kültür ortamlarımız geliştirildikçe azalıyor, ancak oviduct veya uterusu kıyasla hala suboptimal bir ortamla çalışılmaktadır. İn vitro embriyo üretim sürecinde, embriyolar medyum içindeki kaynakların tükenmekte olduğu statik bir ortamda bulunur, ayrıca atık ürünler embriyo çevresinde yoğunlaştırılabilir. Bu ortam embriyo metabolizmasını değiştirebilir ve embriyonun gelişimini etkileyebilir (Barfield, 2015).

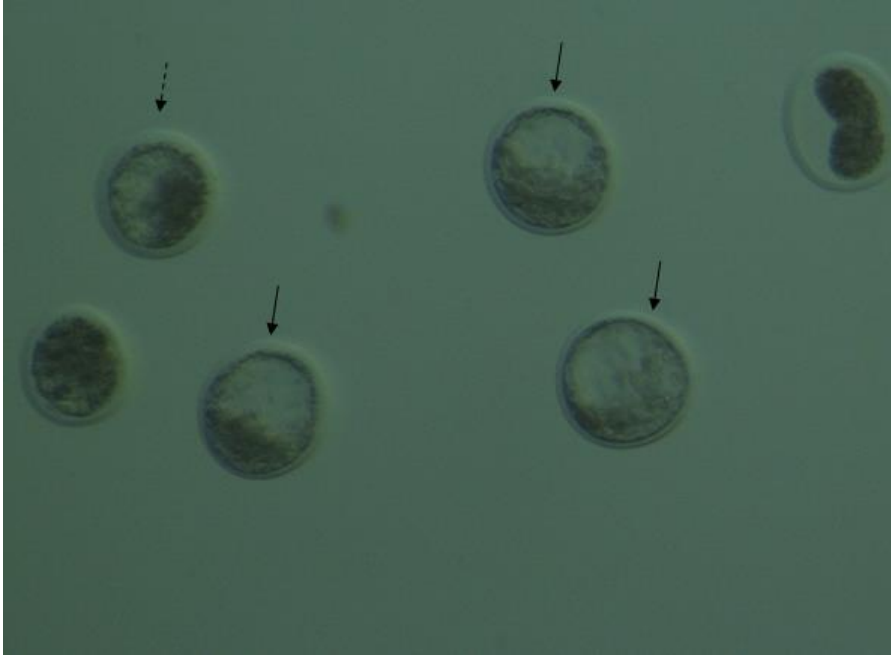
Embriyolar, şekil, renk / sitoplazma yoğunluğu, hücre sayısı ve kompaktlığı, perivitellin boşluğun alanı, ekstrüde edilmiş veya dejenere hücre sayısı, sitoplazmik veziküllerin sıklığı, boyutu ve yařa göre gelişme aşaması gibi bir dizi fiziksel özelliğe uygunlukları bakımından derecelendirilir (Wright ve Ellington, 1995). Embriyoların gelişimi östrüstan sonraki toplama günü ile uyumlu olmalıdır. Embriyoların canlılık süreleri yaklaşık 20°C oda ısısında 8 saattir. Ancak 3-4 saat içerisinde dondurma ya da transfer işlemleri gerçekleştirilmelidir (Bó ve Mapletoft, 2013; Smith, 2009). Embriyoların başarılı bir şekilde değerlendirilmesinde üç unsur vardır: eğitim, deneyim ve uygun ekipman (Seidel ve Seidel, 2019). Morfolojik yapıya göre kalite kodları 1 ile 4 arasında derecelendirilir (Bó ve Mapletoft, 2013).

Kod 1: Mükemmel veya çok iyi. Embriyolar boyut, renk ve yoğunluk bakımından muntazam olan bireysel blastomerleri ile küresel ve simetrik bir kütleyle sahiptir. Bu embriyo beklenen gelişim evresi ile uyumludur. Hücreler arası düzensizlikler nispeten az ve hücrel materyalin en az % 85'i bozulmamış ve canlı hücre kütleli olmalıdır. Bu değerlendirmede kavite değil perivitellin boşlukta bulunan ve zona dışına çıkacak hücre kütlelerinin temsil ettiği embriyonik hücrelerin yüzdesi temel alınmalıdır. Zona pelusida pürüzsüzdür embriyonun pipet ya da petri kabına yapışmasına neden olabilecek iç bükey ya da yassı yüzeyleri bulunmamaktadır. Kod 1 embriyolar dondurma/özdürme prosedürlerine iyi dayanır, bu nedenle bazı uygulayıcılar Kod 1 embriyoları dondurulabilir embriyolar olarak

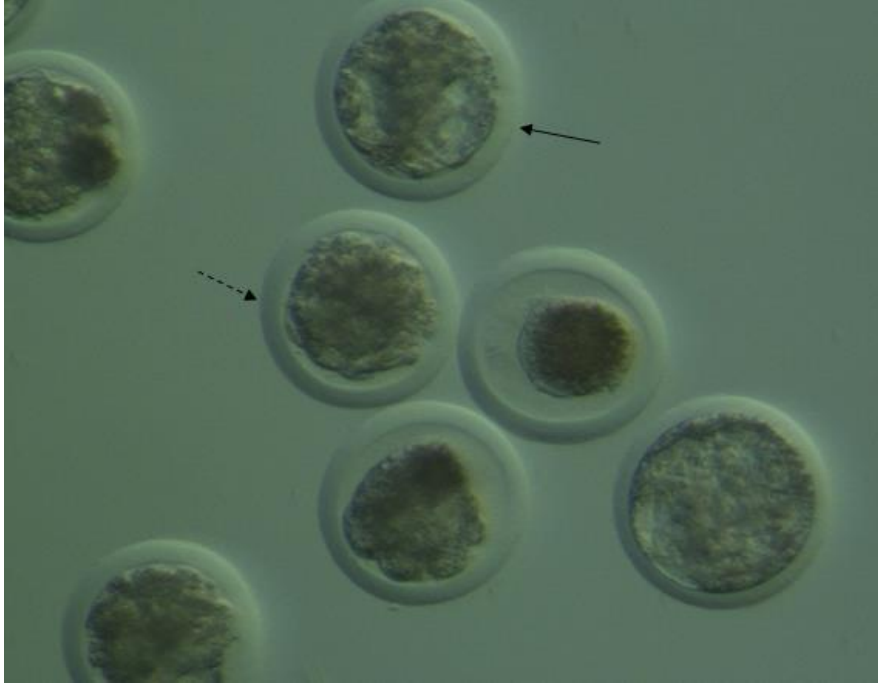
tanımlamaktadırlar. Birinci sınıf (Grade 1) embriyolar uluslar arası ticaret için önerilirler (Bó ve Mapletoft, 2013). Kod 1 çok iyi embriyolar farklı gelişim aşamalarına göre aşağıda Şekil 1, 2, 3’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Kod 1 (Çok iyi), erken blastosist (ok işareti) ve blastosist aşamasında iki adet embriyo (Kara ve Bekyürek, 2018).



Şekil 2. Kod 1 (Çok İyi), blastosist (çizgili ok) ve “expanded blastosist” aşamasındaki embriyolar (siyah oklar) (Kara ve Bekyürek, 2018).

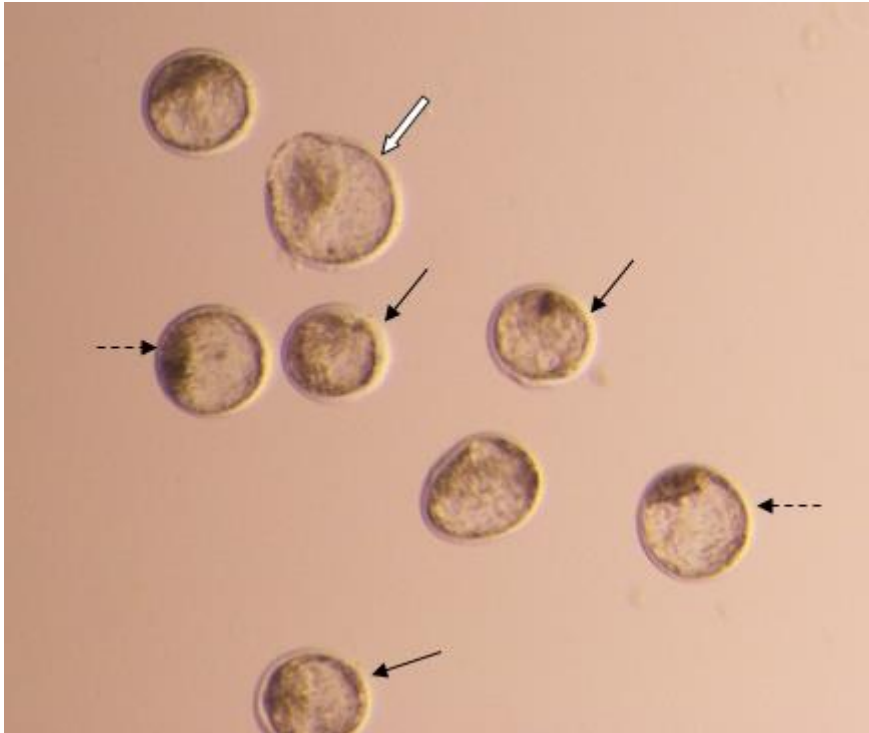


Şekil 3. Kod 1 (Çok İyi) Erken blastosist (siyah ok) ve kompakt morula (çizgili ok) aşamasında embriyolar (Kara ve Bekyürek, 2018).

Kod 2: İyi. Bu embriyolar embriyonik kütlelerin genel şekli ve görünümünde, bireysel hücrelerin yoğunluğu, rengi ve boyutlarında orta düzeyde düzensizliklere sahiptir. Embriyonik kütlelerin en az % 50'si bozulmamış ve canlı hücrelerden oluşmaktadır (Bó ve Mapletoft, 2013). Bu embriyoların dondurma/çözdürme prosedürlerine dayanıklılığı grade 1 embriyolardan daha düşüktür, fakat embriyolar uygun alıcılara taze olarak nakledilirse gebelik oranları yeterli düzeydedir. Bu yüzden bu embriyolar genellikle transfer edilebilir olarak adlandırılır buna karşılık dondurulabilir değildirler (Bó ve Mapletoft, 2013). Çok iyi ve iyi kalitede embriyolar farklı gelişim aşamalarına göre aşağıda Şekil 4 ve 5'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Kod 1(Çok iyi) Blastosist (beyaz ok) ve kompakt morula (çizgili ok), Kod 2 (İyi):Kompakt morula (siyah ok) aşamasında üç adet embriyo (Kara ve Bekyürek, 2018).

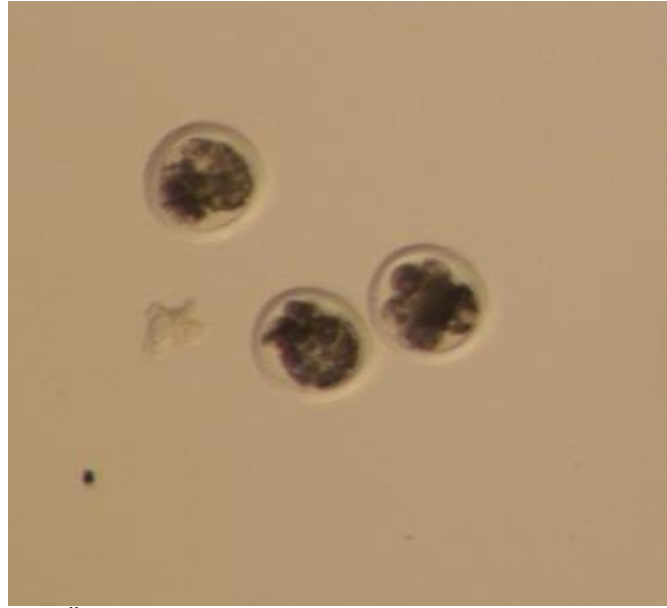


Şekil 5. Kod 1 (Çok İyi) Blastosist (siyah oklar), expanded blastosist (çizgili oklar) ve hatching blastosist (beyaz ok) aşamasında embriyolar (Kara ve Bekyürek, 2018).

Kod 3: Zayıf, sağlıklı. Bu embriyolar embriyonik kütlelerin genel şekli ve görünümünde, bireysel hücrelerin yoğunluğu, rengi ve boyutlarında önemli düzeyde düzensizliklere sahiptir. Embriyonik kütlelerin en az % 25'si bozulmamış ve canlı hücrelerden

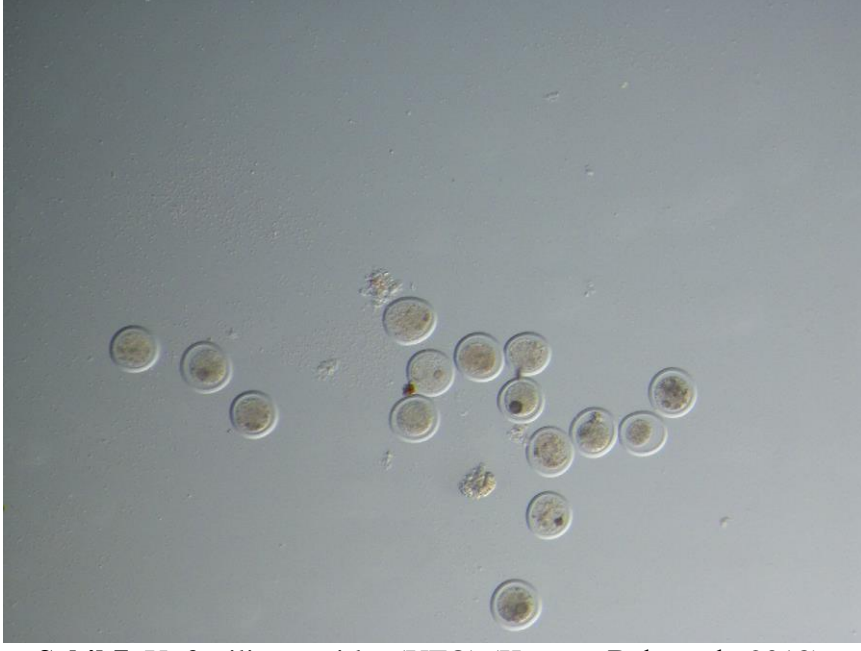
oluşmaktadır (Bó ve Mapletoft, 2013). Bu embriyolar dondurma/çözdürme prosedürlerinde sağlam kalamazlar, eğer uygun alıcılara taze transfer edilirse gebelik oranları kod 2 embriyolarınkinden daha düşüktür (Bó ve Mapletoft, 2013).

Kod 4: Ölü veya dejenere. Çok sayıda bozulmuş blastomerler, dejenere hücreler, değişken büyüklükte hücreler ve veziküller gibi ciddi problemleri olan embriyolardır (Kanagawa ve ark., 1995). Bu hücreler oositler veya bir hücreli embriyolar olabilir canlı değildirler. Bunlar kullanılabilir değildir ve atılmalıdır (Bó ve Mapletoft, 2013). Ölü veya dejenere embriyolar farklı gelişim aşamalarına göre aşağıda Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Kod 4 (Ölü veya Dejenere) Embriyolar (Kara ve Bekyürek, 2018).

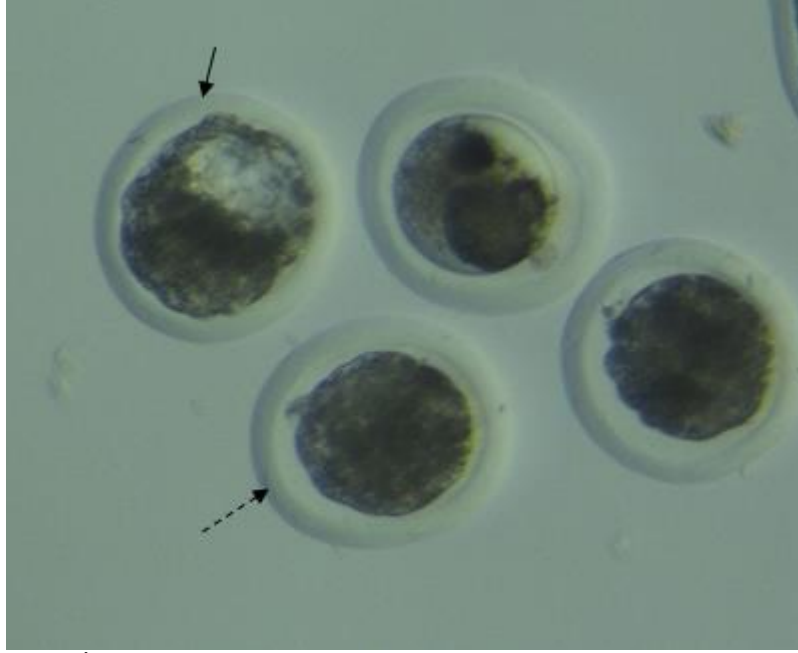
Unfertilize oositler ile farklı kalite ve gelişim aşamalarına göre embriyolar aşağıda Şekil 7, 8, 9’da gösterilmiştir.



Şekil 7. Unfertilize oositler (UFO) (Kara ve Bekyürek, 2018).



Şekil 8. Kod 1 (Çok İyi) Expanded blastosist (siyah oklar) ve blastosist (çift oklar). Kod 3 (Zayıf, Sağlıksız) kompakt morula (çizgili ok) ve unfertilize oosit (beyaz ok) (Kara ve Bekyürek, 2018).



Şekil 9. Kod 1 (Çok İyi) Erken blastosist (siyah ok) ve kompakt morula (çizgili ok) (Kara ve Bekyürek, 2018).

Embriyoların değerlendirilmesi embriyo transfer uygulamasının en kritik adımlarından biridir. Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğu (IETS) el kitabında embriyoların gelişim evrelerinin belirlenmesinde 1'den 9'a kadar olan noktalı sistemin, embriyo kalitesinin değerlendirilmesi ise 1 ila 4 arasında bir sistemin kullanılması gerektiği belirtilmektedir. IETS el kitabında embriyoların görsel değerlendirmesinin biyolojik bir sistemin subjektif bir değerlendirmesi olduğu belirtilmektedir. Bu yüzden gebelik oranları bazı zamanlar alıcı kalitesi, uygulayıcı kabiliyeti ve çevresel faktörlerden dolayı beklenenden düşük olabilir. Genellikle aksi karar alınmadığı sürece uluslararası ticarete kod 1 embriyolar kullanılmalıdır (Bó ve Mapletoft, 2013).

Süperovulasyon uygulaması yapılmış bir inekte östrus sonrası herhangi bir dönemde embriyoların gelişim aşamalarında önemli düzeyde farklılıkların olması muhtemeldir. Östrüstan sonraki 7. günde aynı yıkamada morula ve hatching blastosistler olabilir. Aynı zamanda mükemmel kalitede embriyolar, fertilize olmamış oositler ve dejenere embriyolar da görülebilir. Genellikle embriyo kalitesinde ve embriyoların gelişim aşamasındaki geniş varyasyonlar mevcut embriyoların normal olmadığı ve gebelik oranlarının hayal kırıklığı yaşatabileceğinin işaretleridir (Mapletoft ve Morrow, 1986). Kompakt moruladan blastosist'e kadar olan gelişim aşamasındaki mükemmel veya iyi kalitede embriyolarda en yüksek gebelik oranları elde edilir (Hasler ve ark., 1987).

Gelişim aşaması ve morfolojik yapılarına göre değerlendirilen embriyolar üç farklı şekilde kullanılabilir. Bunlar; taze olarak transfer, dondurularak saklama ve ileri biyoteknolojik uygulamalar (cinsiyet tayini, splitting v.b.) olarak sıralanabilir. Yapılan değerlendirme sonucu embriyolarda gelişim aşaması ve morfolojik yapı transfer veya diğer uygulamalar için uygun değilse in vitro kültür (% 5 CO₂ inkübatörde 38.5°C'de) yapılarak embriyonun yaşama kabiliyeti ve dejenerasyonu takip edilebilir.

Birinci kalite embriyolar dondurma/çözdürme prosedürlerine iyi dayanır ve uluslararası ticaret için önerilir. İkinci ve üçüncü kaliteler uygun alıcılara taze transfer edilmelidir. Dolayısıyla bir embriyonun nakil ya da dondurulmasının uygun olup olmadığı konusundaki karar değerlendirmeyi yapan kişinin uzmanlığına ve tecrübesine dayanmaktadır (Bó ve Mapletoft, 2013).

Toplama ve değerlendirme sırasında en fazla dikkat edilmesi gereken konu embriyoların transferinden ve dondurulmasından önce herhangi bir hasar verilmemesidir. Bu nedenle uygulama yapılacak oda uluslararası standartlarda temiz, eğer bu mümkün değilse tozdan arındırılmış alan olmalıdır. Mikroorganizmaların kontaminasyonundan kaçınmak için kullanılan tüm malzemeler steril olmalıdır.

Embriyo temas edecek her türlü madde ve kimyasal kontaminasyondan uzak tutulmalıdır. Özellikle kullanılacak plastik şırıngaların pistonlarında lastik bulunmamasına özen gösterilmelidir.

Yıkama sıvısında toplanan embriyoların transfer edileceği steril solüsyonun ısısı 37°C olmalıdır. Ultraviyole ışınları embriyoları olumsuz etkiler, bu nedenle uygulamanın yapılacağı laboratuvar direk güneş ışığından arındırılmalıdır. Pencereleer bir film tabakası ile kaplanmalıdır.

Steril solüsyonlar petriye alındıktan sonra kapakları kapatılmıyorsa kolaylıkla uçabilirler ve konsantrasyonları değişebilir. Bu gibi değişiklikler de embriyoya zarar verebilir.

2. Sonuç

Embriyo transferi çalışmalarında en önemli aşamalardan birisi embriyoların kalite ve gelişim evrelerinin belirlenmesidir. Kaliteli embriyoların seçimi, dondurulabilir ya da transfer edilebilir embriyoların belirlenmesi, gelişme dönemlerine ve kalitelerine göre embriyoların inkübasyonda bekletilmesi vb. yapılacak uygulamalar doğrudan kalite değerlendirmesini yapan uzmana bağlıdır. Embriyoların üretim yöntemlerine göre kalite ve morfolojik gelişim farklılıkları göz önünde bulundurulmalıdır. Embriyo transferi çalışmalarında donörlerden

farklı gelişim evrelerinde olan embriyolar, boş zona ya da zonası zarar görmüş embriyolar, dejenere embriyolar ve oositler bir arada bulunabilmektedir. Farklı kalite ve gelişme evrelerindeki embriyoların belirlenmesi, değerlendirmeyi yapacak kişinin uzmanlık deneyimi çalışmalarının başarısını önemli ölçüde etkilemektedir. Embriyoların değerlendirilme kriterleri transfer edilecek, dondurulacak veya kullanılmayacak embriyoların belirlenmesi konusunda standart kararlar alınmasını sağlar.

Kaynaklar

Barfield, J. (2015). Evaluation of in vitro-produced bovine embryos. CETA/ACTE & AETA Joint Convention – Niagara Falls, Ontario. Session: IVP vs IVD Embryo Evaluation. https://www.aeta.org/docs/Evaluation_of_in_vitro_produced_bovine_embryos.pdf, pp. 1-8. Erişim Tarihi; 03 Nisan 2019.

Bó, G.A., Mapletoft, R.J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod*, 10(3): 344-348.

Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J.E., Farin, C.E. (2000). Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo and in vitro. *Biology of Reproduction*, 62: 1459-1465.

Curtis, J.L. (1991). Cattle embryo transfer procedure, 2nd ed., Academic Press, Inc., San Diego, California USA.

Hasler, J.F. (2000). In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction*, 15: 47-58.

Hasler, J.F., Mc Cauley, A.D., Lathrop, W.F., Foote, R.H. (1987). Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27: 139-168.

Kanagawa, H., Shimohira, I., Saitoh, N. (1995). Manual of bovine embryo transfer. Japan Live Technology Association.

Kara, U., Bekyürek, T. (2018). Östrus senkronizasyonu ve süperovulasyon öncesi gonadotropin uygulamasını takiben kısa süreli ekzojen progesteron verilen ve süperovulasyon uygulanan donörler ile klasik süperovulasyon metodu uygulanan donörlerin elde edilen embriyo sayısı ve kalitesi yönünden karşılaştırılması. Doktora Tezi, Erciyes Üniv Sağ Bil Ens, Kayseri, s.1-124.

Mapletoft, R.J. Ed. Morrow, D.A. (1986). Bovine embryo transfer. In: Current Therapy in Theriogenology. II. Philadelphia, PA: WB Saunders, pp. 54-63.

Perry, G. (2017). "Data Retrieval Committee reports; 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals". International Embryo Technology Society (IETS), https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2016_v2.pdf, 1-23, Erişim tarihi: 15 Mart 2019.

Pollard, J.W., Leibo, S.P. (1993). Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 287.

Pollard, J.W., Leibo, S.P. (1994). Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41: 101-106.

Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M.P., Lonergan, P. (2002). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 62: 320-327.

Sağırkaya, H. (2009). Sığırlarda embryo transfer uygulaması ve Türkiye açısından önemi. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg*, 28(2): 11-19.

Seidel, G.E., Seidel, S.M. Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal Evaluation of embryos. Chapter 7. <http://www.fao.org/DOCREP/004/T0117E/T0117E00.htm>, Erişim Tarihi: 15 Mart 2019.

Shamsuddin, M., Larsson, B., Gustafsson, H., Gustari, S., Bartolome, J., Rodriguez-Martinez, H. (1992). 12th International congress on animal reproduction, 3: 1333-1335.

Smith, A.K. (2009). Embryo transfer –opportunities for vets and scientists. *Cattle Pract*, 17: 16-25.

Van Soom, A., de Kruif, A. (1992). A comparative study of in vivo and in vitro derived bovine embryos. 12th International Congress on Animal Reproduction, 3: 1363-1365.

Wright, Jr. R.W., Ellington, J. (1995). Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology*, 44: 1167-1189.