

TAVŞANLARDA EMBRIO TRANSFERİ

Çetin Kılıçoğlu*

Tevfik Tekeli**

Embryo Transfer in the Rabbit

Summary: *A technique for flushing the oviduct and succesful transfer of the rabbit ova to foster mothers were investigated. In 20 donor does the mean number of ovulation was 19 ± 1 .*

Nineteen point three percent of 187 embryos, which were recovered from superovulated 20 donors, were fertilized and appeared normal when examined after the recovery. 20 % of recipient does maintained pregnancy to term.

Özet: *Bu çalışmada tavşanlarda embrioların genital kanaldan toplanabilmesi için oviduct'u yıkama yöntemi ile bir transfer tekniği incelenmiştir.*

Süperovulasyonla 20 donör tavşandan alınan 187 adet embriyonun incelenmesinde de % 96,3 nüün fertil ve normal görünümlü oldukları saptanmıştır.

Operasyon sırasında donör tavşanların ovariumlarının incelenmesinde 19 ± 1 ovulasyon olduğu belirlenmiş ve recipient'lerden (alıcı) % 20 si gebeliği sona erdirmişlerdir.

Bu konudaki ilk çalışmayı oluşturan "Tavşanlarda Embrio Transferi" inden elde edilen sonuçlara göre Embrio Transfer tekniğinin işlerliğinin ortaya konması yanında evcil hayvanlarımızda uygulandığında özellikle memleketimiz ekonomisine katkısının büyük olacağı ve hayvan popülasyonumuzun genetikman düzelmesinde de atılım yapacağı inancındayız.

* Prof.Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum Bilgisi ve Jinekoloji Birimi. Ankara-Türkiye.

** Asistan. A.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum Bilgisi ve Jinekoloji Birimi. Ankara-Türkiye.

Giriş

Tavşanlarda embrio transferi ilk defa 1890'da Heape tarafından yapılmıştır. Walter Heape başarılı ilk transfer denemesini açıkladığı yazısında "Bir tür tavşan uterusunda diğer bir tür tavşanın fertilize ovumunun fetal gelişmesinin tüm aşamalarını geçirebilmesinin olasılığını belirtmek isterim" demektedir¹.

Embrio transfer tekniği farede (16,21), ratta (8,25), hamsterde (3), tavşanda (1,4,5,6,9,14,15,19,20) koyunda (11,13,17,23), domuzda (12,18) ve inekte (24) pek çok araştırmacı tarafından yapılmış ve memelilerdeki çeşitli gelişim dönemlerindeki bu döllenmiş ovumların toplanması ve transferi değişik yöntemler uygulanarak ortaya konmuştur.

Embrio transferi üç ana bölüm içerisinde incelenmektedir.

1. Embrioların donör (verici)lerden toplanması,
2. Embrioların in vitro korunması,
3. Embrioların recipient (alıcı)lere verilmesi.

Embrioların vericilerden toplanması işlemi gerçekleştirilirken de vericinin gebeliğinin durumuna, embrionun bulunabileceği bölgeler göz önünde tutularak değişik toplama yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar sırasıyla:

- a) Ovariumdaki ovumların toplanması,
- b) Oviducttaki embrioların toplanması,
- c) Uterustaki embrioların toplanması.

a) Operatif yolla alınan ovariumlar 37 C derecedeki, gözlük camı içindeki, vasata konur. Mikroskop altında keskin sivri uçlu bir bistüri ile kesilen olgun folliküllerin içeriği hafifçe sıkılarak vasata boşaltılır. Cumulus ile kaplı olan embriolar vasatta konakçıya transfer için inkubatorde saklanır (7).

Öldürülmeleri istenmeyen büyük ve değerli hayvanlarda laparotomi yapılarak ovariumlar bulunur, büyük folliküllere ponksiyon yapılır, içerik pipetle çekilir ve vasat içeren bir gözlük camına konur. Bu yöntemle donörler pek çok defa kullanılabilirler (7).

b) Oviducttaki embrioların toplanmasında donörün operasyona alındığı günkü gebeliğin başlangıcında olması halinde (1. gün) embriolar cumulus içinde ve ampulladadırlar (7). Bu pozisyonda olan bu

tip embrioların alınabilmesi için ya oviduct, içinde vasat bulunan bir gözlük camına konur ve ampulla bir makasla kesilir, bu işlem cumulus içindeki embrionun vasata dökülmesine neden olur, eğer olmazsa oviduct üzerine hafifçe basınç yapılır ya da oviduct ortadan kesilir ovarium tarafında kalan yarım parça uterus tarafından ovarium tarafına doğru, bir enjektör yardımıyla yıkanır (7).

1. gün öğleden sonra, 2. ve 3. günlerde ise embriolar cumulustan ayrılmışlardır. Embriolar oviducta ovarium ucundan verilen vasatın uterus tarafından alınmasıyla toplanabilirler. 4. cü gün embrioların pek çoğu utero-tubal bileşimin olduğu yerdedirler. Bu dönemde embrioların alınabilmesi için uterustan da bir kısmın kesilerek çıkartılmasında yarar vardır.

Rat, fare gibi ufak ve pahalı olmayan hayvanlardan canlı iken embrioların toplanması pratik değildir, bunun yanında tavşan, koyun gibi daha büyük hayvanlarda embriolar deneme hayvanları canlı iken toplanabilmektedir. Bunun için hayvan anestezi edilir, uterusun bir bölümü ve oviduct ensizyon çizgisi dışına alınır. Operatörlerden bir tanesi enjektöre takılmış iğne ile utero-tubal bileşimin yakınından oviducta girer ve enjektördeki vasatı vermeğe hazırlanır. Diğer operatör ise oviductun fimbria ovaricasından içeriye hafifçe eğilmiş cam boruyu sokar ve ucunu ufak bir petriye yönlendirir. Bu işlem tamamlanınca enjektörü kontrol eden operatör yavaş yavaş vasatı oviduct içerisine verir. Embrio toplama işi sonuçlanınca da ensizyon çizgisi dikilir ve donör tekrar kullanılmak üzere bakıma alınır. Bu yöntem Avis ve Swain (2), Chang (5), Hunter, Adams ve Rowson (13) ve daha birçok araştırmacı tarafından basit değişikliklerle kullanılmıştır.

c) Uterustaki embrioların toplanmasında; karın boşluğu dışına alınan uterus oviduct tarafından enjektöre takılmış iğnenin yardımıyla verilen vasatın uterustan toplanmasıyla yıkanır. Yıkanmadan sonra vasat gözlük camında toplanır ve bir stereo-mikroskop yardımıyla embriolar bulunur, bir mikro pipetle alınıp yeni bir vasat ve petri içersine aktarılıp transferin yapılacağı zamana kadar 37 C derecede inkubatörde tutulurlar.

Adams (1) embrio transferinde 1. Donör (verici) embrionun viabilitesi ve gelişimi, 2. Recipient (alıcı, konakçı) gebeliği sonuna kadar başarıyla götürebilmesi 3. Diğer faktörler; Embrionun toplanması, korunduğu ve transferin yapıldığı vasat, transfer işlemi, transfer edilen embrioların miktarı, genital kanaldaki transferin yapılacağı yer,

embrionun gelişmesinin ve konakçının luteal dönemlerinin sinkronizasyonu gibi faktörlerin önemli rol oynayabileceğini vurgulamıştır.

Döllenmiş tavşan ovularının transferinde de Chang (6) % 54 Adams (1) % 43.7 oranında normal bir gelişme ve gebelik elde etmişlerdir.

Adams (1) çeşitli hormonlar uygulamak suretiyle süperovulasyon şekillendirilen tavşanlardan elde edilen ovuların % 97.2'sinin normal görünümlü ve fertil olduklarını gözlemiştir.

Bütün bu çalışmalar göz önünde tutularak döllenmiş ovumun manipülasyonu, sensitivitesi, saklanması ve transferi gibi hususların incelenmesi ve bu sistemin memleketimiz hayvancılık ekonomisine büyük katkısı göz önünde tutularak bu çalışma yapılmıştır.

Materyal ve Metod

Bu çalışmamızda 3.5-5.0 kgr. ağırlığındaki 24 erişkin Yeni Zelanda, 14 Chinchilla toplam 38 tavşan kullanıldı. Bunlardan Yeni Zelanda tavşanlar (20) donor (verici), chinchillalar (10) recipient (alıcı, konakçı) olarak değerlendirilmiştir. Dört Yeni Zelanda, fertil erkek donorların tohumlanmasında, vasectomize edilmiş dört chinchilla erkek tavşan da dişi chinchilla'ların pseudo-gebeliklerinin oluşturulmasında kullanıldılar.

Donor dişilerde ovulasyonun oluşturulması için, 21 gün süreyle ayrı kafeslerde tutulmuş dişi tavşanlara 150 I.U. Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG Folligon, Intervet) intra musküler olarak enjekte edildi, 66-72 saat sonra da iki fertil erkek tavşanla çiftleştirilen bu tavşanlara 50-75 I.U. Human Chorionic Gonadotropin (HCG, Gestyl Organon) intravenöz olarak verildi (1,9,10,19,20).

Recipient'in (alıcı, konakçının) seksüel siklusunun donor tavşanla aynı periyotta olmasını sağlamak için alıcı tavşana transferden iki gün önce 20-25 I.U. Human Chorionic Gonadotrophin (HCG, Gestyl Organon) intravenöz enjekte edildi ve vasectomize tavşanlarla çiftleştirildiler (9,10,19,20).

Donor tavşanlara enjeksiyondan 35-40 saat sonra median hat-tan yapılan laparotomi sonu döllenmiş embriolar oviducttan toplandı (7). Nembutal sodiumun intra-venöz verilmesinden sonra linea albadan yapılan ensizyondan uterus, oviduct ve fimbria ovarica abdominal boşluk dışına alındılar. Operatörlerden bir tanesi içinde 5 cc Dulbecco (22) vasatı bulunan bir enjektöre ucu kütleştirilmiş bir iğne

takarak uterusu, utero-tubal bileşimin yakınından sokarak vasatı vermek üzere hazırlanırken, diğer operatörde hafifçe açılışturacak biçimde eğilmiş ince cam borunun bir ucunu fimbria ovarica'dan içeri oviducta sokup baş ve işaret parmağı ile yerinde tutarken diğer ucunu da bir petriye doğru yönlendirdi (7). (Resim I, II)

Enjektörü tutan operatör bu işlem tamamlanınca yavaş yavaş vasatı uterusu verirken diğer operatörde oviductun kıvrımlarını düzelterek vasatın petriye gelmesini sağladı. Aynı işlem diğer cornu uteriye de uygulanıp vasatın verilmesi tamamlandıktan sonra abdominal boşluk dışındaki genital kanal normal situsuna konurken ovariumun üzerindeki ovulasyon yerleri sayıldı. Donor tavşanın dikişinin tamamlanmasından sonra inkubatörde beklemekte olan petrideki döllenmiş embriolar stereo-mikroskop altında sayıldı.

Bu arada operasyona hazırlanan alıcı tavşana intra venöz nembutal sodium verilerek anestezi sağlandı. Median hattın yapılan enziyondan abdominal boşluk dışına alınan oviducta fimbria ovarica yönünden, enjektöre 0,05 ml vasat içinde çekilmiş, döllenmiş ovumlar pastör pipeti yardımıyla verildiler. Her bir oviducta en az üç en çok sekiz embrio transfer edildi (9).

Donor tavşanlar tekrar kullanılmak üzere bakıma alınırken, alıcı tavşanlarda post operatif dönem ve gebeliğini daha uygun şartlarda geçirmesi için aydınlık ve temiz kafeslere konuldular.

Embrioların toplanmasında ovario-hysterectomi, uygulanan diğer bir yöntemi oluşturdu (4,5,6). Lig. suspensorium ovarii, Lig. Lata uteri, mesometriuma ve cervix uteri üzerine konan ligatürlerin arasında kalan bölüm tamamen çıkartılarak içinde vasat bulunan bir petri içine konuldu, ve bu petri içinde açılan genital kanalın bu bölümünün içindeki embriolar daha sonra stereo-mikroskop ve pastör pipeti yardımıyla toplanarak içinde taze vasat bulunan diğer bir petriye aktarılarak transfere kadar 37 C derecede inkubatörde konuldular.

Bulgular

Çalışmamızda 20 donordan toplam olarak 187 embrio alınmıştır.

Embrionun normalde oviductu geçebilmesi için 3-4 gün gerekmektedir (14), bu nedenle sırasıyla 25-30 saat, 50-70 saat ve 80-90 saat olmak üzere üç ayrı zaman diliminde toplanan embrioların bölünmenin değişik aşamalarında oldukları gözlenmiştir. Tek ve çift

blastomerli safhadan morula ve blastocyst dönemine kadar çeşitli aşamalarda embriolar elde edilmiştir (Resim III, IV, V, VI, VII).

Oviduct ve kısmen uterusun vasatla yıkanması ve total ovario-hysterectomie yöntemleri ile yapılan embrio toplama işlemlerinde; oviduct ve kısmen uterusun yıkanması daha başarılı ve donörün tekrar kullanılmasını sağlamak açısından da daha ekonomik bulunmuştur. Total ovario-hysterectomie de vasat kanla karıştığından embrioları bulmak zaman zaman olanaksızlaşmış ve bu arada donörde elden çıkarılmıştır.

Donör tavşanların ovariumlarında ortalama 19 ± 1 ovulasyon yeri sayılmış, bununla beraber bu sayıya eşit oranda embrio toplanamıştır.

Çeşitli hormonlar kullanarak oluşturulan süperovulasyon sonu elde edilen embrioların % 96.3'ünün döllenmiş ve görünümünün normal olduğu saptanmıştır.

Materyal ve metod bölümünde de belirtildiği gibi iki blastomerli hücrelerin oviducta verilmeleri sonu % 20 oranında gebelik elde edilmiştir.

Sonuç ve Tartışma

Ovario-hysterectomie sonu çıkartılan genital kanalın, içinde vasat bulunan bir petride açılma işlemi, vasatın kanla karışması pıhtıların oluşması ve donör tavşanların bir daha kullanılma olasılığı bulunmaması nedeniyle tavşandan daha küçük laboratuvar hayvanlarında geçerli olduğu sonucu çıkarılmıştır. Bunun yanında embriolar gebeliğin (7. ci gününe kadar) hangi evresinde olursa olsun oviduct ve uterusun yıkanmasıyla kolaylıkla toplanabilmiş ve donör tavşanlar 3 ay sonra tekrar kullanılabilir hale gelmişlerdir.

Chang (4) ovario-hysterectomie uygulaması sonucu topladığı embrioların oranını % 75-100 olarak belirtirken, çalışmamızda kanlı ortamda embrioların zor bulunması nedeniyle bu oran % 52 olarak belirlenmiş bununla beraber oviduct ve kısmen uterusun yıkanmasıyla % 75 oranında embrio toplanmıştır.

Donörler erkek tavşanlarla çiftleştirilmelerinden sonra 1., 2., 3., ve 4. cü günler operasyona alınmışlar ve değişik aşamalarda embriolar elde edilmiştir. İncelenen bu embrioların % 96.3 ünün normal görümlü ve döllenmiş oldukları saptanmıştır. Adams (1) çalışmasında bu oranın % 97.2 olduğunu vurgulamaktadır.

Chang (6) transfer sonu alıcıların % 54 ünün, Adams % 43.7 sinin gebe kaldığını belirtmektedirler. Çalışmamızda kullanılan materyalin az olması ve Kürsümüzde bu konuda yapılacak çalışmalardan ilki olması ve Adams'ın (1) transferin başarısına etki yapan faktörler olarak belirlediği, donör'a ve konakçıya, embriyonun toplama işlemine, vasata, genital kanaldaki transfer yerine, embriyonun gelişmesine ve konakçının luteal dönemlerinin sinkronizasyonuna bağlı nedenlerle bu oran % 20 olarak bulunmuştur.

Teşekkür

Bu çalışmanın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen TÜRK-İNGİLİZ KÜLTÜR DERNEĞİNE ve İNGİLİZ KÜLTÜR ATEŞESİNE teşekkür etmeyi borç biliriz.

Literatür

- 1- **Adams, C.E.** (1956): *Egg transfer and fertility in the rabbit*. III Int. Congr. Anim. Reprod. Cambridge. Sec III, 5-6.
- 2- **Avis, F.R., Sawin, P.B.** (1951): *A surgical technique for the reciprocal transplantation of fertilized egg*. J. Heredity. 42, 259-260.
- 3- **Blaha, G.C.** (1964): *Effect of age of the donor and recipient on the development of transferred golden hamster ova*. Anat. Rec., 150, 413-416.
- 4- **Chang, M.C.** (1950): *Transplantation of rabbit blastocyst at late stage: Probability of normal development and viability at low temperature*. Science, III, 544-545.
- 5- **Chang, M.C.** (1952): *Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo*. J. Exp. Zool. 121, 35 1-381.
- 6- **Chang, M.C.** (1955): *Fertilization and normal development of follicular oocytes in the rabbit*. Science, 121, 867-869.
- 7- **Dickmann, Z.** (1971): *Egg Transfer*. In Daniel, J.C. Jr. Ed.: *Methods in Mammalian Embryology*: San Francisco., W.H. Freeman pp. 133-145.
- 8- **Dickmann, Z., DeFeo, V.J.** (1967): *The rat blastocyst during normal pregnancy and during delayed implantation, including an observation on the shedding of the zona pellucida*. J. Reprod. Fert. 13, 3-9.

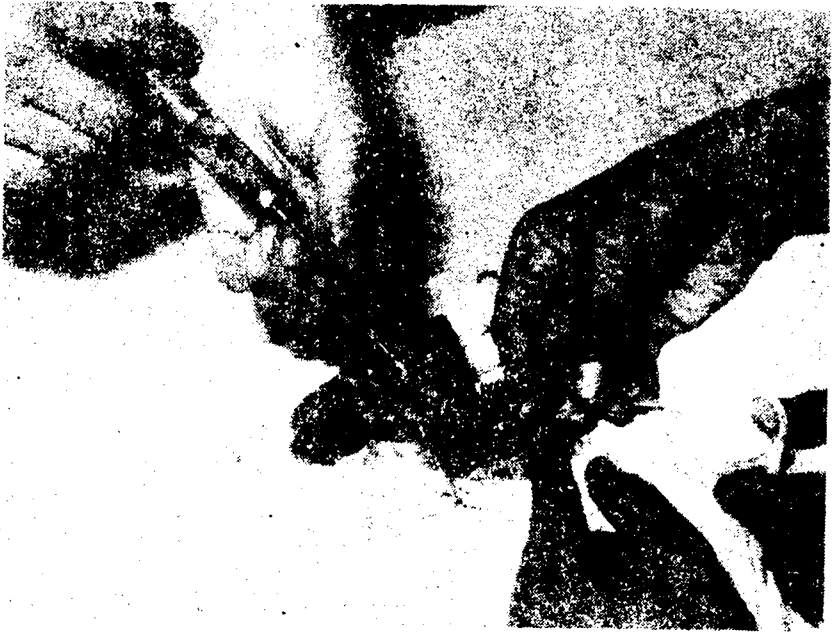
- 9- **Hafez, E.S.E.** (1961): *In vivo and an vitro studies on rabbit ova; Nonsurgical ova transfer as a target.* IV Int. Congr. Anim. Reprod. The Haque. Vol I, 383-386.
- 10- **Hafez, E.S.E.** (1961): *Procedures and problems of manipulation, selection, storage and transfer of mammalian ova.* Cornell Vet., 41, 299-333.
- 11- **Hancock, J.L., Hovell, G.J.R.** (1962): *Transfer of sheep ova.* J.Reprod. Fert. 2, 295-306.
- 12- **Hancock, J.L., Hovell, V.J.R.** (1962): *Egg transfer in the sow.* J.Reprod. Fert. 4, 195-201.
- 13- **Hunter, G.L., Adams, C.E., Rowson, L.E.A.** (1955): *Interbreed ovum transfer in sheep.* J. Agric. Sci 46, 143-149.
- 14- **Longley, W.J., Black, D.L.** (1968): *Comparisons of methods for locating ova in the oviduct of the rabbit.* J. Reprod Fert. 16, 69-72.
- 15- **Maurer, R.R., Onuma, H., Foote, R.H,** (1970): *Viability of cultured and transferred rabbit embryos.* J. Reprod. Fert. 21, 417-422.
- 16- **McLaren, A., Michie, D.** (1956): *Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers.* J. Exp. Biol. 33, 394-416.
- 17- **Moore, N.W., Rowson, L.E.A.** (1960): *Egg transfer in sheep: Factor affecting the survival and development of transferred. eggs:* J. Reprod. Fert. 1,332.
- 18- **Polge, C.** (1978): *Embryo transfer and embryo preservation.* Symp. zool. Soc. London. 43, 303-316.
- 19- **Staples, R.E.** (1971): *Development of 5 day rabbit blastocysts after culture at 37 C.*J.Reprod. Fert. 13, 369-372.
- 20- **Staples, R.E.** (1971): *Blastocyst transplantation in the rabbit,* In Daniel, J.C. Jr. Ed: *Methods in Mammalian Embryology.* San Francisco. W.H. Freeman. pp. 290-304.
- 21- **Tarkowski, A.K.** (1959): *Experiments on the transplantation of ova in mice.* Acta Theriol , 2, 251-267.
- 22- **Whittingham, D.G.** (1971): *Survival of mouse embryos after freezing and thawing.* Nature. 233, 125-126.

- 23- **Willadsen, S.M.** (1979): *Embryo transplantation in sheep, The management and diseases of sheep.* Commonwealth Agric. Bureaux, Edinbrough.
- 24- **Willet, E.L., Buckner, P.J., Larson, G.L.** (1953): *Three successful transplantation of fertilized bovine eggs.* J.Dairy Sci. 36, 520-523.
- 25- **Oshinaga, K.Adams, C.E.** (1966): *Endocrine aspects of egg implantation in the rat.* J. Reprod. Fert. 12, 583-586.

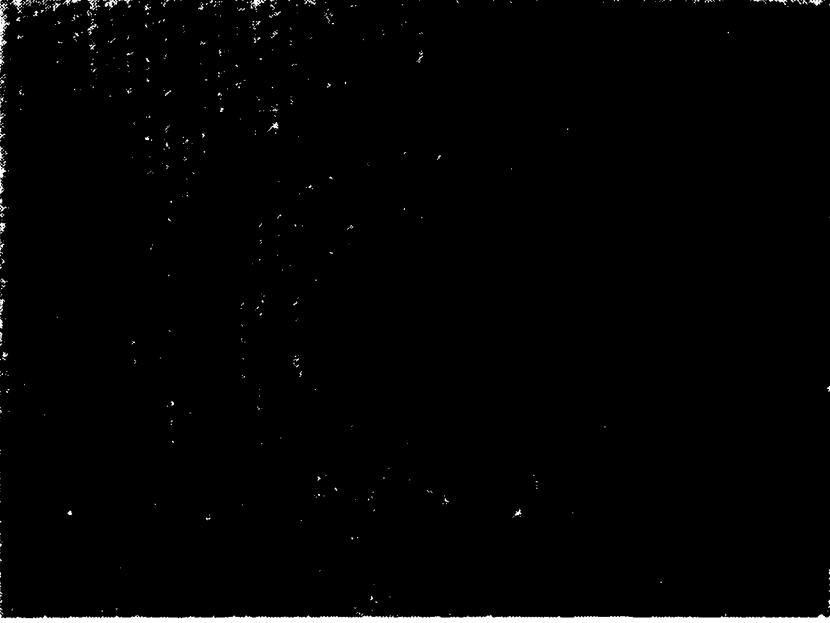
Yazı 1 Haziran 1981 günü alınmıştır.



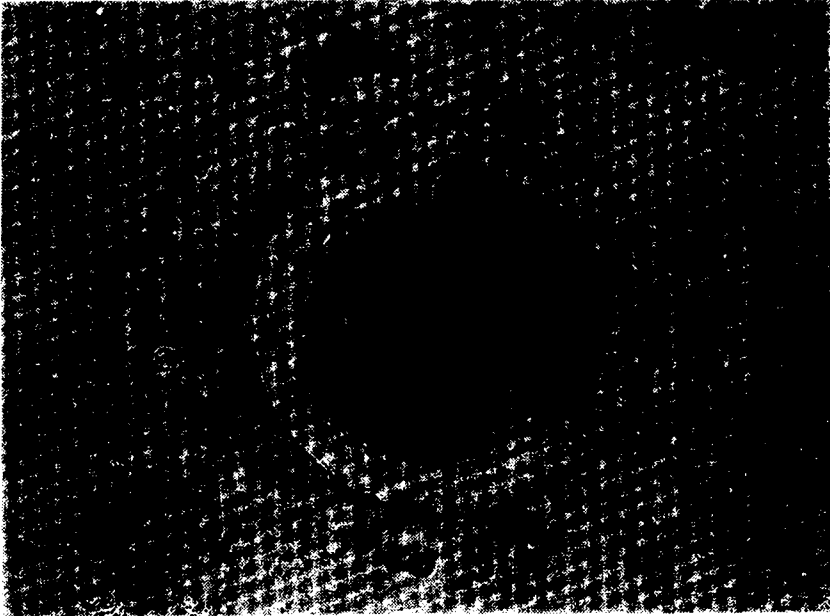
Resim 1: Eğri cam borunun fimbria ucundan oviducta sokulması. (A polyethylene tube is inserted into the infundibulum).



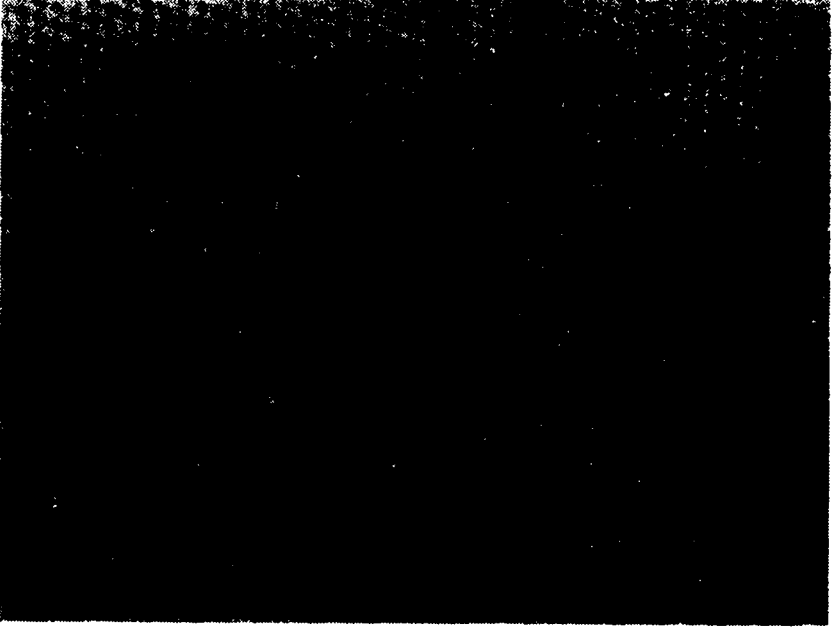
Resim 2: Embrioların ve utero-tubal birleşme yerinden enjektörle verilen yıkama sıvısının, fimbria ucundan girilen eğri bir cam boru yardımıyla petride toplanması. (The flushings containing eggs are collected in a watchglass).



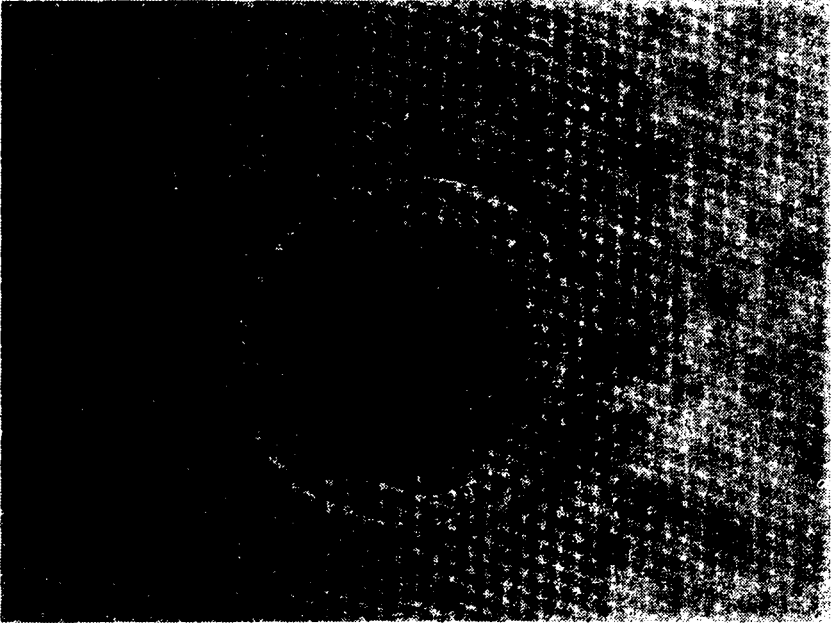
Resim 3: Dölllenmiş bir ovum. (A normal fertilized ovum).



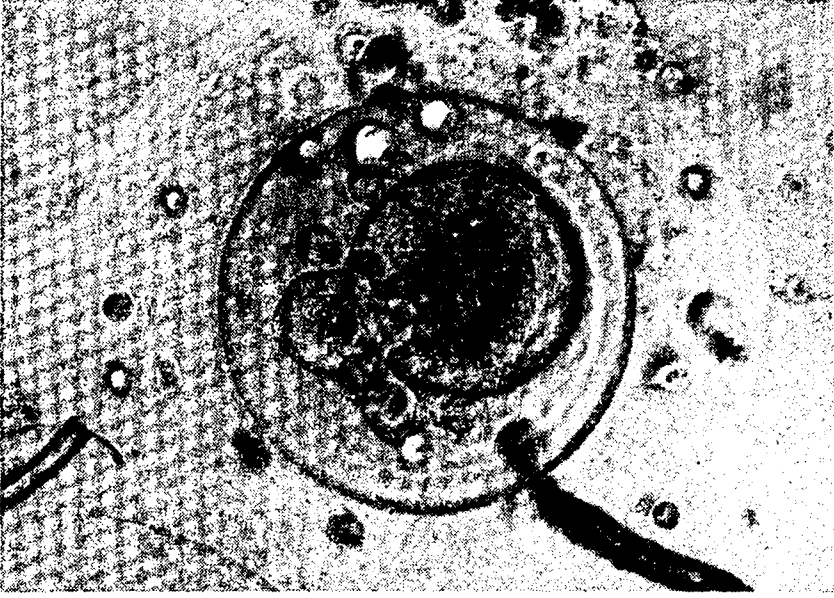
Resim 4: İki blastomerli embrio (çiftleştikten 24 saat sonra) (2- Celled embryo recovered 24 hours postcoitum).



Resim 5: Morula (Çiftleştikten 50 saat sonra). (A normal morula recovered 50 hours post-coitum).



Resim 6: Morula (Çiftleştikten 70 saat sonra). (A normal morula recovered 70 hours postcoitum).



Resim 7: Çiftleştikten 28 saat sonra alınan atipik yumurta (An atypical ovum recovered 28 hours postcoitum).