Biotechnology of Reproduction in Farm Animals

Zafer SABIT DVM, MSc.
Assistant Professor at
Department of Reproduction , AI and Andrology,
Faculty of Veterinary Medicine
Near East University, Nicosia

Introduction

Assisted Reproductive Technologies (ART) /

Yardımcı üreme teknolojileri(teknikleri)

- Reproduktif biyoteknolojisi:
  - *in vivo* ve *in vitro* embriyo ve ovum (oocyte) uretimiyle birlikte
  - onlarin dondurularak saklanmasi, embriyo transferi (ET) ve
  - ileri biyoteknolojik yöntemlerle (*in vivo* veya *in vitro)* amaclanan yavruların (offspring) elde edilmesidir. Suni Tohumlama`da bu alana aittir.

Introduction

- ART son 30-35 yıl içerisinde cok büyük hızla gelişen multidisipliner bir alandır. Veteriner biyoteknolojisinde şu an belirli donatımlı merkezlerinde a;ağıdaki yöntemler kullanılmaktadır:

  - **Suni Tohumlama/Artificial Insemination;**
  - **Senkronizasyon/Superovulasyon ve Embriyo Transferi;**
  - **In Vitro Embriyo Produksiyonu – IVP (IVM, IVF, IVC);**
  - **Sperm cinsiyet ayırımı (X ve Y sperm separasyonu) / Semen Sorting;**
  - **Embriyo cinsiyet belirlenmesi / Embryo Sexing;**
  - **Klonlama / Cloning;**
  - **Embriyo Biseksiyonu (embriyo ikiye kesimi)/Embryo Splitting;**
  - **Transgenik Teknoloji;**

Introduction

- Neden reprodüksiyonda biyoteknoloji?

- Evcileştirmeden → Ciftlik yetiştiriciliği;
- Hayvan ve sürü sağlığı
- Genetik seleksiyonun hızını arttırmak
- Genetik seleksiyonun etkisini arttırmak
- Üretimi arttırmak
- İnsan üreme modelleri ve araştırmalar oluşturma /Infertilite tedavisi
- Irk/Soy tükenmeme uygulamaları/genetik ve gen muhendisliği, gen tedavisi
- Kök hücreler…

Introduction

- *ART Tarihcesi*:

- 1890 – İlk ET uygulaması, tavşan uzerine (Heape ve ark.)
- 1932 – Keci ET ve 1933 – Koyun ET (Warwick ve ark.)
- 1933 – Rat ET (Nicholas ve ark.)
- 1951 – Domuz ET (Kvansnickii ve ark.)
- 1951 – Sığır ET – Cerrahi metot (Willet ve ark.)
- 1959 - İlk in vitro fertilizasyon (tavşanda) / First Animal IVF
- 1964 – Cerrahi olmayan metodlar: By-pass (Sugi ve ark.) ve cervical yöntem (Mutter ve ark.)
- 1974 – Embriyo dondurma (DMSO), 1979 – Embryo freezing (Gliserol)
- 1974 – Kısrak ET (Oguri ve Tsutsumi)

Introduction

- 1978 – İlk tüp bebek/First in vitro baby (Edwards and Steptoe)
- 1981 –First live calves resulting from IVF (Bracket et al.)
- 1987 – Sığır embriyo vitrifikasyonu (Massip ve ark.)
- 1987 – Nükleer transfer (Prather ve ark.)
- 1992 – Human ICSI(İnsan Intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu)
- 1997 – Koyun klonlama/Dolly cloned (Somatic cell nuclear transfer into unfertilized oocyte)
- Commercial ET started in the early 1970s, in North America (focus cattle) and 1974 founded IETS (International Embryo Transfer Society)

Introduction

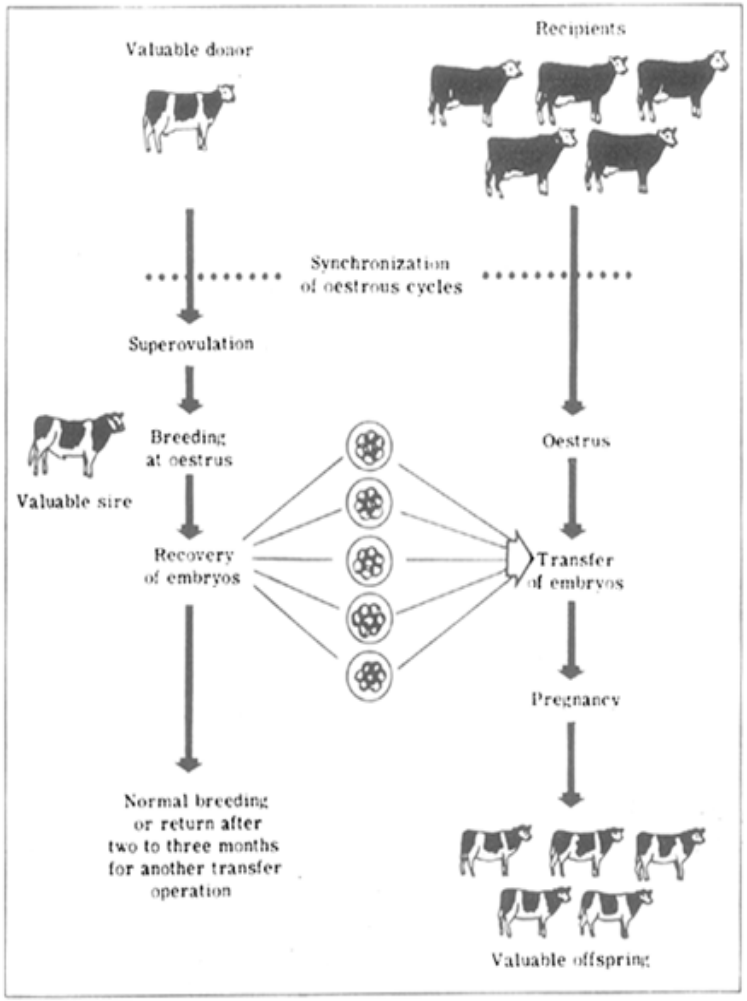
Türkiye’de ilk Embryo Transfer Prof.Dr. Çetin Kılıçoğlu tarafından (AÜ Veteriner Fakültesi) 1982 yılında yapılmış ve ikiz yavru elde edilmiştir.

Embryo Transfer (ET)

➢ *Açıklama*

- Embriyo transferi, verici (donör) hayvanın genital kanalından toplanan (*in vivo*) veya laboratuar koşullarında elde edilen embriyoların (*in vitro*), taşıyıcı (resipient, alıcı) hayvanlara nakledilmesidir. (Kanagawa ve ark.)

Embryo Transfer



➢ *Açıklama*

- Genetik kapasitesi ve verim düzeyleri belirlenmiş olan elit inek ve elit boğalardan elde edilen embriyolarin taşıyıcı ineklere nakledilmesi.

Picture from http://www.fao.org/docrep/004/x6500e/x6500e03.htm

Embryo Transfer

- *Açiklama*
- =MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer)
- Genetik seleksiyon surecinde bu teknik superovulasyon vasıtasıyla yüksek genetik potansiyele sahip olan dişi hayvanların (ineklerin) verimlilik performansını daha fazla yavruya geçmesini sağlıyor. Suni Tohumlama bu süreçte daha fazla erkek hayvanların (boğaların) genetik özellikleri ile ilgilidir.
- Donör hayvanlarda birden fazla embriyo oluşturuluyor ve resipient hayvanlara transfer ediliyor.
- Embriyolar dondurularak saklanabilir.
- Embriyolarla ticaret yapılabilir ve farklı ülkelere nakledilebilr.

Embryo Transfer

- *Aşamalar*:

1. Embriyo üretimi ve toplanması/*Embryo production and collection*
   - *In vivo* embryo production
   - *In vitro* embryo production (integrated with IVF – IVF/ET) – oosit toplanması ve takiben dış ortamda oositlerin fertilizasyonu
   - Uterus`un yıkanması ve embriyoların elde edilmesi / *Embryo flusching*
2. Elde edilen embriyolarda işlemler – kültıvasyon, değerlendirme, sınıflandırma, dondurma / *Handling of recovered embryos*
3. Embriyo Transferi / *Transfer of embryos*

Embryo Transfer

1. ***İn vivo* embriyo uretimi ve toplanması** /*In vivo* embryo production and collection

Bu aşamada izlenecek prosedürler asağıda sıralanmıştır:

- Donör ve resipient hayvanların seçimi
- Donör ve resipient hayvanların senkronizasyonu
- Donör`larin superovulasyonu
- Donör`larin tohumlanması
- Donör hayvanların bakım ve beslenmesi
- Embriyonun gelişimi
- Uterusun yıkanması (Uterine flushing)
- Embriyoların toplanması ve değerlendirilmesi
- Embriyo transferi / Dondurularak saklanması

In vivo embryo transfer

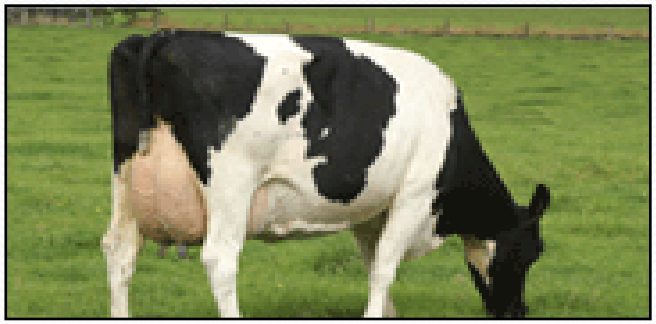
- Donör ve Resipient hayvanların seçimi

Donör seçimi:

- Kalıtsal hastalık taşımayan ve konjenital bozukluğu olmayan
- Sağlıklı ve yüksek verimli hayvanlar, pazar payı yüksek
- Reprodüktif geçmişinde herhangi bir bozukluğu bulunmayan, normal östrus sikluslarına sahip ve en az 2 siklusunu düzenli aralıklarla geçirmis olmalı

In vivo ET

***Donör seçimi*:**



- Yaşlı veya çok genç olmamalıdır
- Fertiliteyi etkileyecek hastalıklar taşımaması gerekmektedir (BSE, IBR-IPV, Şap, BVD, Leucosis, Tuberculosis, Brucellosis.

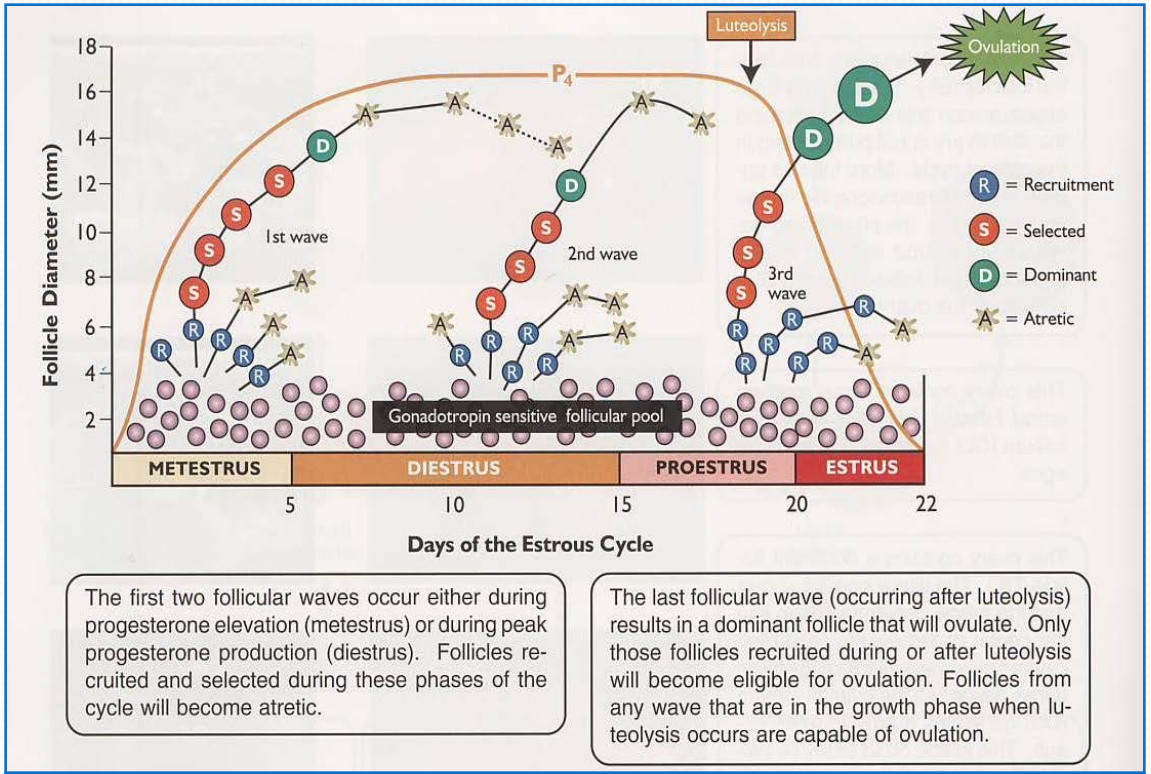
In vivo ET

❖ ***Resipient seçimi:***

- Konjenital bozukluğu bulunmayan, saglıklı hayvanlar
- Reprodüktif gecmişinde herhangi bir bozukluğu olmayan normal ve düzenli östrus siklusuna sahip
- Yaşlı olmayan
- Beslenme problemi ve metabolik sorunları bulunmayan
- Vücüt kondisyonu normal
- Fertilitesini etkileyecek hastalıkları taşımayan

ET – Östrus senkronizasyonu

❖ Bir siklus cerçevesinde foliküler dinamiği (P. L. Senger. Pathways to Pregnancy and Parturition, 2005)



Recruitment = *high FSH + low LH + no inhibin + no estradiol*

Selection = *low FSH + moderate LH + low inhibin*

Dominance = *low FSH + high LH + high inhibin*

Atresia = *degeneration of follicles*

- En önemli konular`dan biri olarak hayvan östrus siklusları kontrol eden mekanizmalar ve foliküler dinamik hakkında kapsamlı bilgiye sahip olmak gerekmektedir.

- **Superovulasyon** – hormonal indüksiyon sonucu normalinden daha fazla oosit maturasyonu ve ovulasyonu (in stage secondary oocytes)

ET – Östrus senkronizasyonu

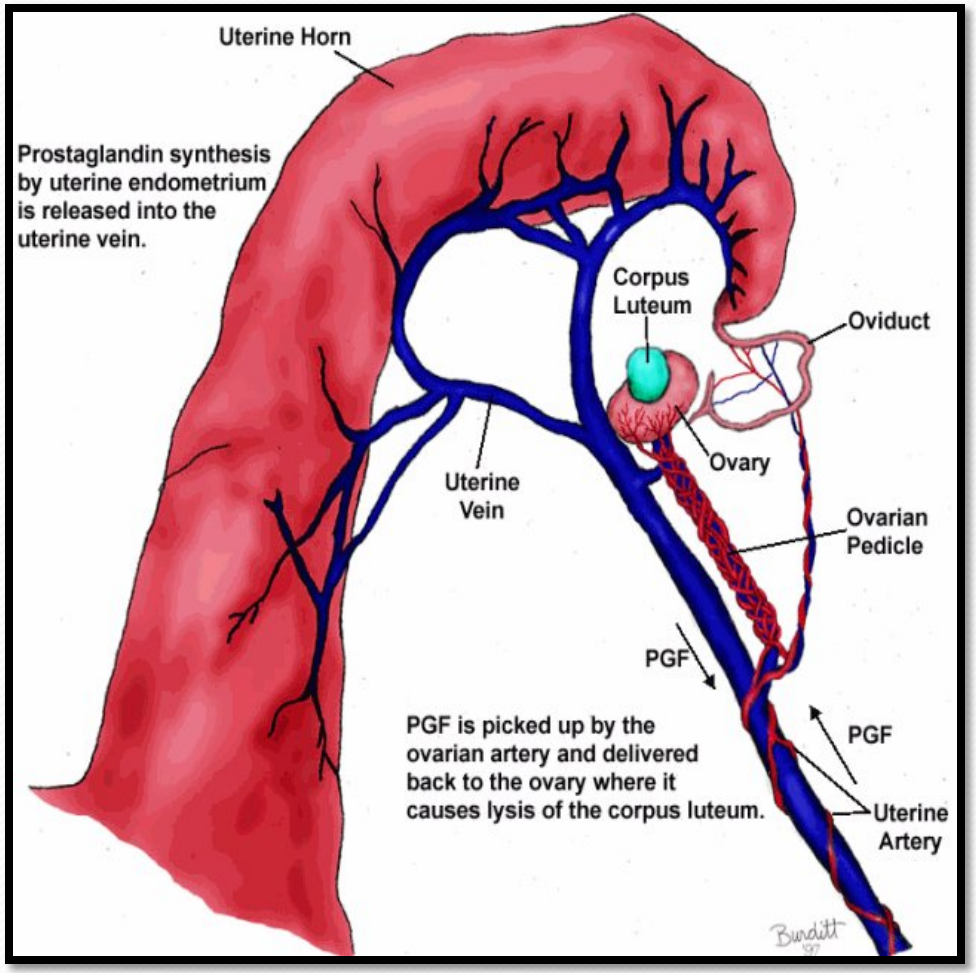
❖ Senkronizasyon protokollerinde Progestogen ve PGF2α kullanımın genel prensipleri

➢ *Östrus* senkronizasyonu icin CIDR® (Controlled Intravaginal Drug Release) 7 gün vagina`da kalıyor ve bununla birlikte 6`nci gün Lutalyse ® - 5 ml (25 mg prostaglandin F2α) uygulanıyor. Sonuçta aniden progesteron konsantrasyonu düştüğü icin, bunu takiben GnRH ve gonadotropin (FSH,LH) konsantrasyonları yukselip folikül gelişimi gerçekleşiyor. Boylece 2-3 gün içerisinde inekler proestrus ve estrus evrelerine "girmiş " oluyorlar. Lutalyse – pregnant cows(NB!)

Radiograph showing the CIDR® inside the vagina (V) with the "wings" expanded to prevent loss after insertion. (CX = cervix; U = uterus).

(Picture from P. L. Senger. Pathways to Pregnancy and Parturition, 2005)

ET – Östrus senkronizasyonu



- İneklerde *estrus*`un 7 ve 18 günler arası uygulanan $PGF_2\alpha$ enjeksiyonu yaklaşık 3 gün (60-80 saat sonra) kızgınlık göstermelerine neden oluyor. İneklerde *corpus luteum*, 1`ci ve 6`ci günler arasında uygulanan $PGF_2\alpha$ enjeksiyonunu etkisisz bırakıyor, çünkü *corpus luteum* 1 – 6 günler arası $PGF_2\alpha$`ya karşı duyarlı degildir.

Pıcture from http://www.partners-in-reproduction.com/reproduction-cattle/mechanism-luteolysis.asp

ET –Östrus senkronizasyonu

ET amaçlı siklik hayvanların östrusu senkronize ediliyor. Bunu başarmak için genel olarak östrus siklusunu Prostaglandin F2α (PGF2α) ve Progesteron/progestagen (Pg) preparatları ile manipule ediyoruz. Bunlara ilave olarak farklı senkronizasyon protokollerinde GnRH, FSH, LH ve Estrogen iceren preparatlar`da kullanılıyor.

- *Estrus synchronization products and commercial names*

Type	Commercial name
GnRH	Cystorelin®, Factrel®, Fertagyl®, OvaCyst®, Receptal®, Buserelın®
PGF2α	estroPLAN®, Estrumate®, In-Synch®, Lutalyse®, ProstaMate®
Pg	MGA® (melengesterol acetate), CIDR®, ReguMate®, PRID®
FSH	Folligon®, Gestyl®, Metrodin®, Puregon®
LH	Chorulon®, Pregnyl®

ET –Östrus senkronizasyonu

- ***Embriyo transfer uygulamalarında en sık uygulanan senkronizasyon yontemi Ovsynch+Progesteron yontemidir.***

Step 1 - GnRH randomize olarak tohumlamaya uygun bulunan sıgırlara (fully recovered from their last parturition) uygulanıyor. Rastgele GnRH enjeksiyonu uygulanan ineklerde gerçekleşecek olan iki olaylardan birine sebep olunuyor:

a) Eğer *ovarium*`da dominant folikül mevcut ise (a follicle that is greater than 10mm and has an adequate population of LH receptors), inek GnRH enjeksiyonu sonucu ovulasyon gerçekleştirecek ve takiben *corpus luteum* şekillenecek.

b) Eğer dominant folikül mevcut degilse (an immature follicle that has few LH receptors), GnRH enjeksiyonu sonucu sürekli foliküler büyümesine neden olacaktır. Bu vakada bir onceki ovulasyon`da oluşan *corpus luteum* mevcuttur.

Step 2 - $PGF_2\alpha$`nin enjeksiyonu GnRH`ten 7 gün sonra uygulanırsa luteolysis gerçekleşiyor ve sığır *estrus*`un foliküler evresine girmiş oluyor.

Step 3 - $PGF_2\alpha$ enjeksiyonun`dan 48 saat sonra ikinci defa GnRH uygulanırsa ovulasyon gerçekleşiyor(24-32 h sonra).

Step 4 - Bunu takiben (GnRH uygulamasından 16 saat sonra) inekler sabit zamanda tohumlanabilir (kızgınlık kontrolü yapmaksızın).

Embryo Transfer

- İneklerde superovulasyonun uyarılması genellikle siklusun 8-12 günlerinde başlamaktadır (*ovarium* üzerindeki folikül dalgalarının bu günlere aktif hale geçmesidir).

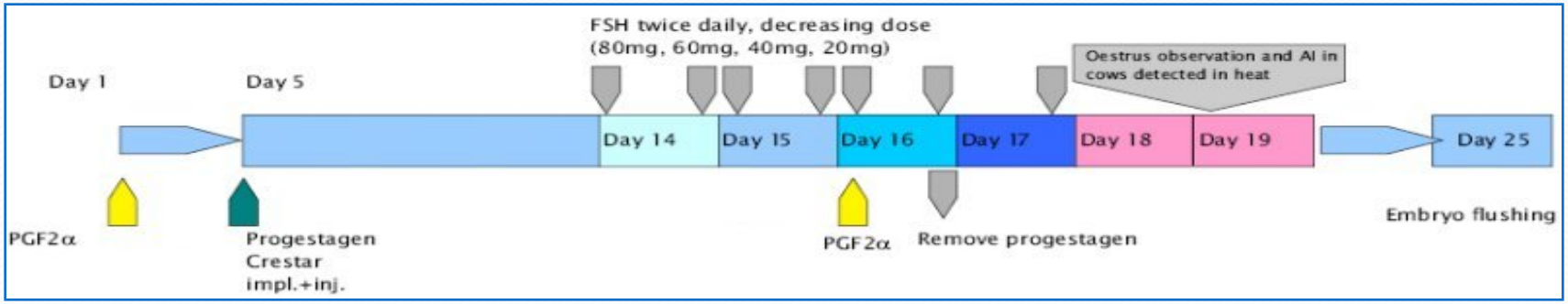
- Foliküler dalga sayısına göre değerlendirelecek olursa en başarılı sonuçların 3 dalgalı sistemlerde siklusun 9,5 gününde, 2 dalgalı sistemlerde ise 10,5 gününde elde edilebileceği belirtilmektedir.

- Iki dalgalı sistemlerde seksüel sikluslar 18-20 gün sürerken, üc dalgalı sistemlerde bu süre 21-23 güne uzamaktadır.

Embryo Transfer

- ***Donor management*** –estrus senkronizasyonu ve superovulasyon indüksiyonu, prostaglandin veya progestagen kullanimıyla yapılan *estrus* senkronizasyon esnasında, gonadotropinler ile gercekleşiyor(şekilleniyor).

Variant I: Oestrus synchronisation in donor cows with the use of progestagens (Crestar) and FSH

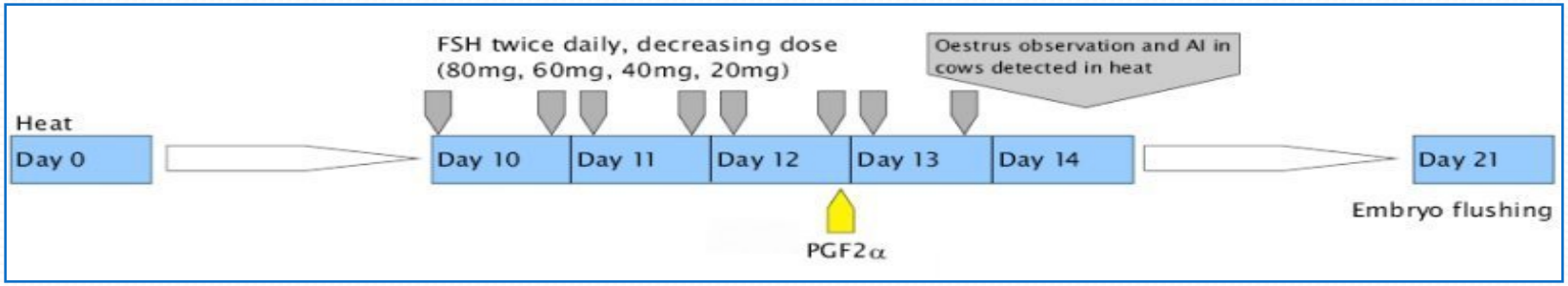


Source: http://www.partners-in-reproduction.com/reproduction-cattle/fsh-donors.asp#eg1

Embryo Transfer

- ***Donor management***

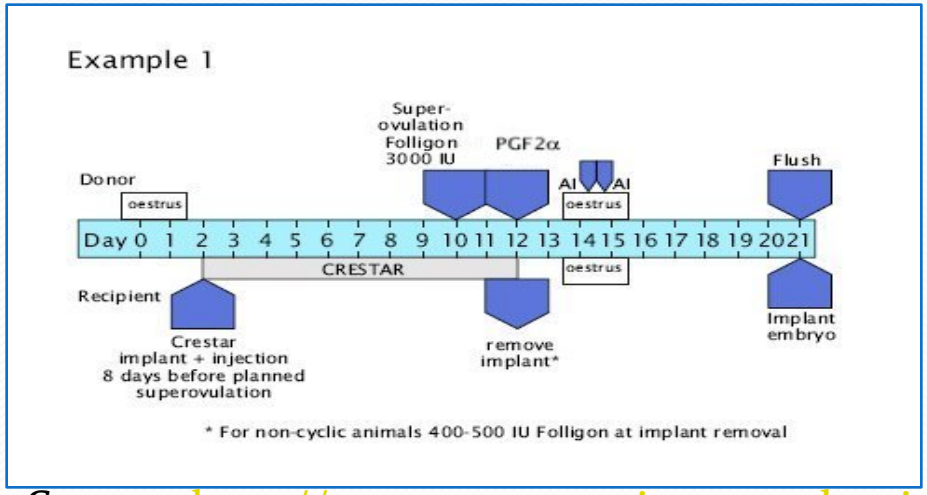
Variant II – Donör ineklerde Prostaglandin ve FSH ile *estrus* senkronizasyonu. Dogal FSH preparatlari domuz ve koyun menşeli olarak piyasada mevcuttur. FSH, nispeten kısa bir yarı ömre sahip olduğu için, genel olarak, 3-4 gün süre ile günde iki defa tatbik edilmektedir.

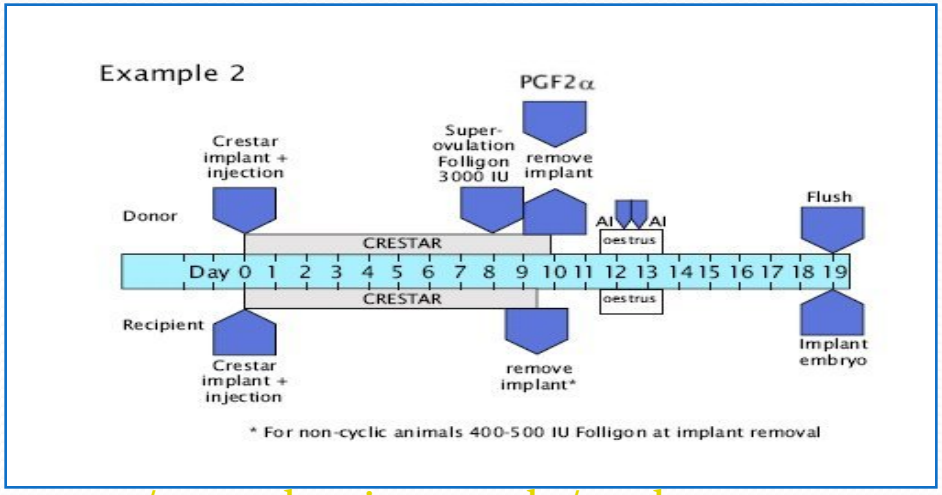


Source: http://www.partners-in-reproduction.com/reproduction-cattle/fsh-donors.asp#eg2

Embryo Transfer

- Eğer PMSG kullanılırsa uzun bir yarı-ömrü oldugu icin tek bir enjeksiyon yeterlidir. PMSG yüksek dozlarda ovulasyon üzerinde uzun süreli uyarıcı negatif etkiye sahip olduğu için ikinci bir foliküller dalganın ortaya çıkmasına neden oluyor.
- PMSG = eCG
- 48 Saat PMSG (veya ilk FSH) enjeksiyonundan sonra, *corpus luteum* regresyonu bir doz prostaglandin ile indüklenir.



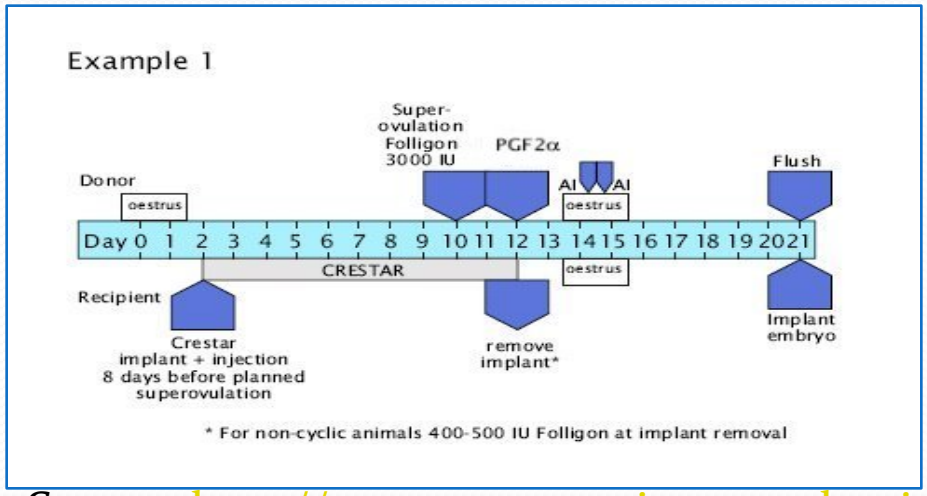


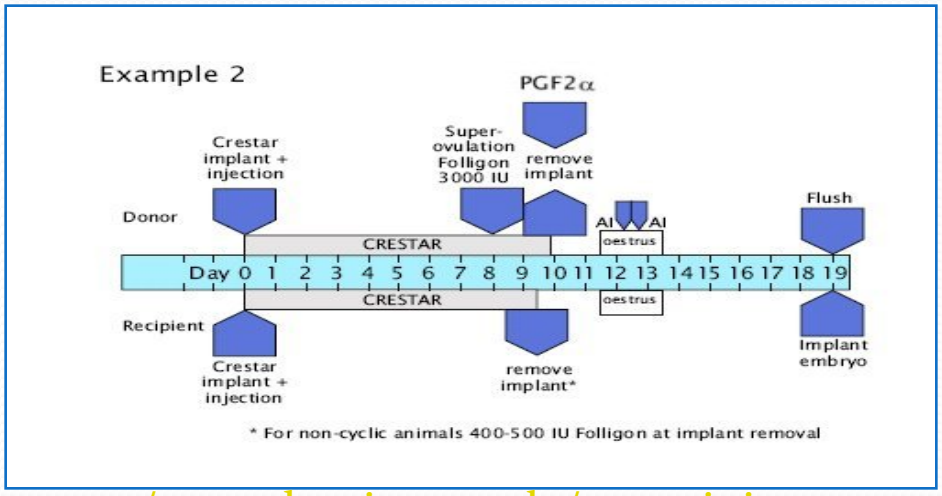
Source: http://www.partners-in-reproduction.com/reproduction-cattle/et-donor-management.asp

Embryo Transfer (Resipient hayvanların senkronizasyonu)

❖ *Management of the recipient cows*

- Direkt transfer ya da dondurulmuş embriyo transfer işlemine bağlı olarak protokol seçiliyor ve alıcı ineklerin de *estrus* siklusu buna göre ayarlanıyor (senkronize ediliyor) ki embriyoların transferi ovulasyondan sonra 6. – 8. günler arası denk gelsin. 24 saati aşan siklus asenkronisi konsepsiyonu negatif yönde etkiler.





Source: http://www.partners-in-reproduction.com/reproduction-cattle/et-recipient-cow.asp

Embryo Transfer- embriyo verimini etkileyen faktörler

- **Siklusun dönemi**
  Superovulasyonun 9. – 13. günler arasında uygulandığı zaman en iyi sonuçlar elde ediliyor /*Best results are obtained when superovulation is initiated during the mid-luteal phase (day 9-13).*
- **Superovulasyon indüksiyonu sırasında foliküler durumu**
  Superovulasyon sırasında *ovarıum*`da domınant folikül mevcut ise indüksiyon cevabı düşüktür. /*The presence of a large dominant follicle at the time of superovulation reduces the response*
- **Donör ineklerin yonetimi**
  - *avoiding stress*
  - *nutritional status*
  - *absence of pathology*
- **Sperma ve tohumlama**
  - Use of high quality semen and AI at 12-24 hours after the onset of standing oestrus
  - Repeated inseminations do not appear to give better fertilization rates
  - Differences have been reported between bulls

Embryo Transfer – Superovulasyon

❖ ***Superovulation protocols***

- **Atlar/Horses**
  - Domuz ve koyun hipofizlerinden üretilen FSH kısraklarda superovulasyon ındüklemesinde etkisiz kalıyor. / *FSH derived from porcine or ovine pituitaries not reliable to induce superovulation in mares*
  - At hipofiz FSH (eFSH) ekstresi superovulasyonu başarı ile indükler. / *Equine FSH pituitary extract (eFSH) succesfully induced superovulation*
  - Kısrakların *ovarium* özelliği (fossa ovulationis)? /*Anatomical structure of mare`s ovary (fossa ovulationis) – as a reason for single ovulation?*
- **Domuzlar/Sows**
  - PMSG takiben hCG uygulanıyor (normalde domuzlar çoklu ovulasyon yapıyorlar – daha az etkili)
  - Çoğu kez estrus senkronizasyonu doğumdan sonra 3.- 4. laktasyon haftasında anne domuzların aynı anda yavrularından uzaklaştırarak uygulanıyor (PGF2α domuzlarda luteolizisi uyarılması için çok daha az etkili olduğu için) / *Synchronization of oestrus is often achieved by simultaneously weaning groups of sows at 3 to 4 weeks of lactation (PGF2α is much less effective for inducing luteolysis in pigs)*

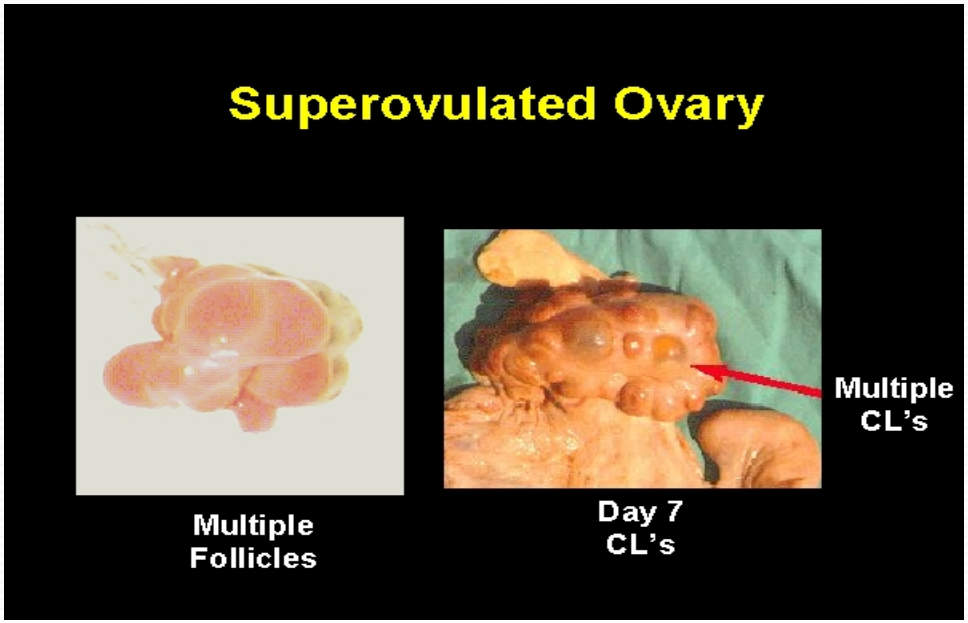
Embryo Transfer – Superovulation

❖ *Superovulation protocols*

- **Koyun ve keçiler/Ewes and goats**

  - Estrus senkronızasyonu progesteron içeren intravajinal süngerler(Chrono-gest®) ile gerçekleşiyor.
  - GnRH antagonist preparatlar 10 gün süre içerisinde 3 defa uygulanıyor ve böylece endojen gonadotropinleri baskılıyor.
  - Both multiple injection of FSH and single injections of eCG (300-500 UI in season).
  - Donors are inseminated primarily by a laparoscopic approach.

Embryo Transfer – embriyo toplama

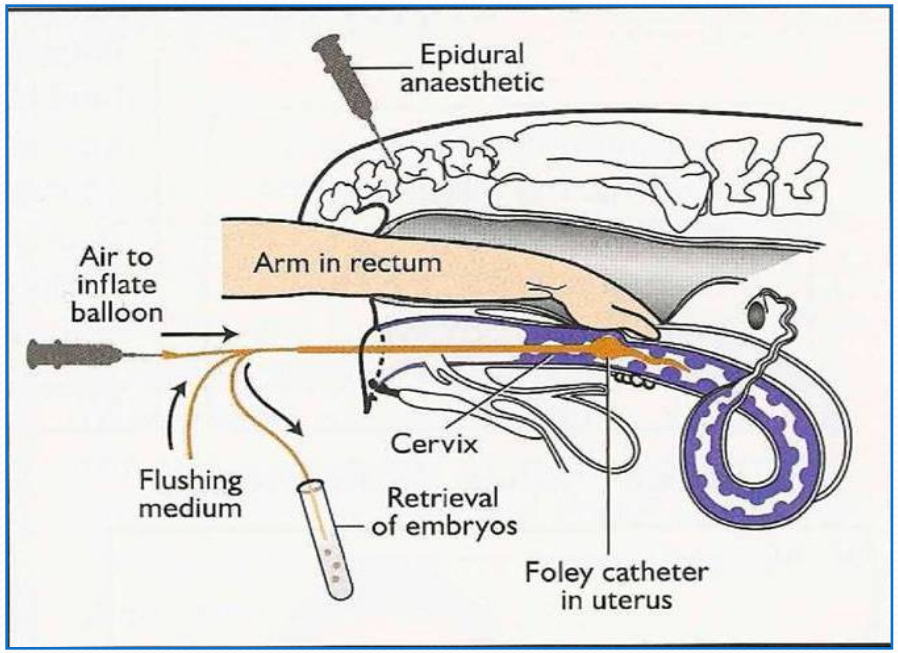


Picture from http://animalsciences.missouri.edu/reprod/ReproTech/Bovineet/sld005.htm

- **İnekler** – embriyolar *estrus*'u takiben 6. ve 8. günler arası toplanıyor. Superovulasyon uygulanan ineklerde toplanan ortalama embriyo miktarı 4 ila 7 arasındadır.

- Gecmiste cerrahi ve cerrahi olmayan metodlar sık uygulanırken, son yıllarda sadece cerrahi olmayan yöntemler kullanılıyor ve bu yöntem embriyo yıkama ("**flushing**" embryos) yöntemi olarak adlandırılıyor.

Embryo Transfer – embriyo toplanması



(Picture from P. L. Senger. Pathways to Pregnancy and Parturition, 2005)

Çalışma yöntemi:

- Toplama prosedüründen önce rektum gevşemesi için epidural anestezi uygulanıyor.
- 6. – 8. günler arası *uterus*'a özel kateter sokuluyor. Kateter'in ön kısmında balon mevcut ve bu balon yıkama sırasında medium'un dışarı çıkmasını engelliyor.
- Foley kateterin uygulamasında – 2 yöntem (*corpus uteri ya da cornua uteri)*
- Kateter yerleştirildikten sonra yıkama mediumu *uterus'*a ilave ediliyor ve lavaj uygulanıyor ve daha sonra medium toplama kabına alınıyor.

Embryo Transfer – embryo recovery

- Embryo flushing

http://landervet.net/embryo-transfers/

Foley Catheters

Embryo Transfer – embriyo toplanması

❖ ***Atlar***

➢Kateter daha büyük ve manşet serviks kanalın icerisinde sabitleniyor.

➢Bunu takiben uterus'a medium (DPBS ya da Laktatlı Ringer) ilave edilip bir kaç defa doldurup boşaltılıyor ve bunun için 2 – 6 l vasat kullanılıyor.

➢ *Uterus'*tan boşaltılan medium toplama kaplarına (şişelerine) alınıyor ya da embriyo filtresinden geçiriliyor (ineklerde kullanıldığı gibi).

Embryo filter (75µm of mesh)

Embryo Transfer – embriyo toplanması

- *Ewes:*
  - Laparoscopic method

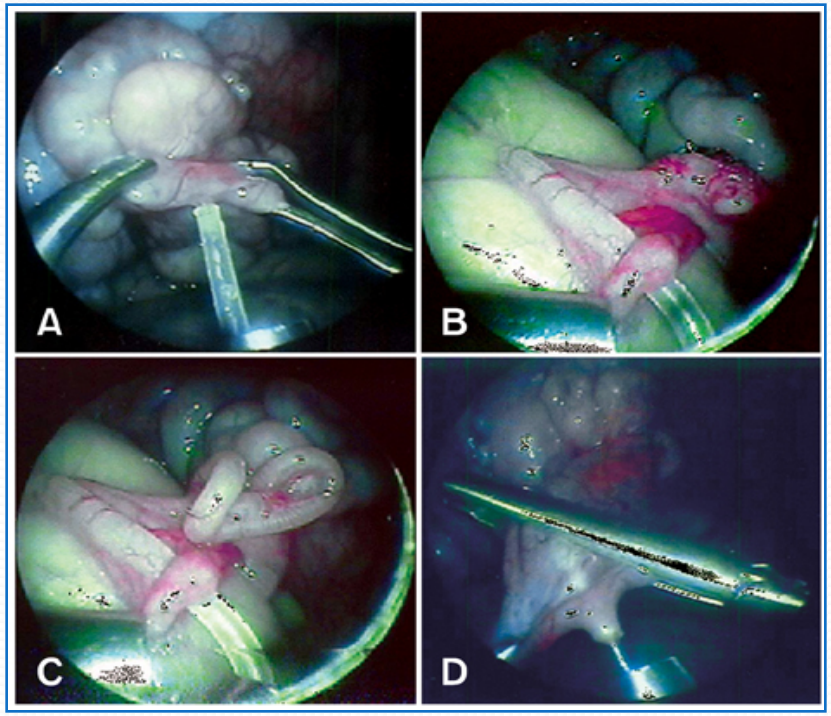
https://tahneemanton2012mgysastudytour.files.wordpress.com/2012/08/2012_0803usa60532.jpg

  - Surgical method (mid-line incision)

http://www.paragonvet.com/breeding-sheep_breeding-embryo_transfer__e_t_

Embryo Transfer – embriyo toplanması

- Laparoscopic method in sheep



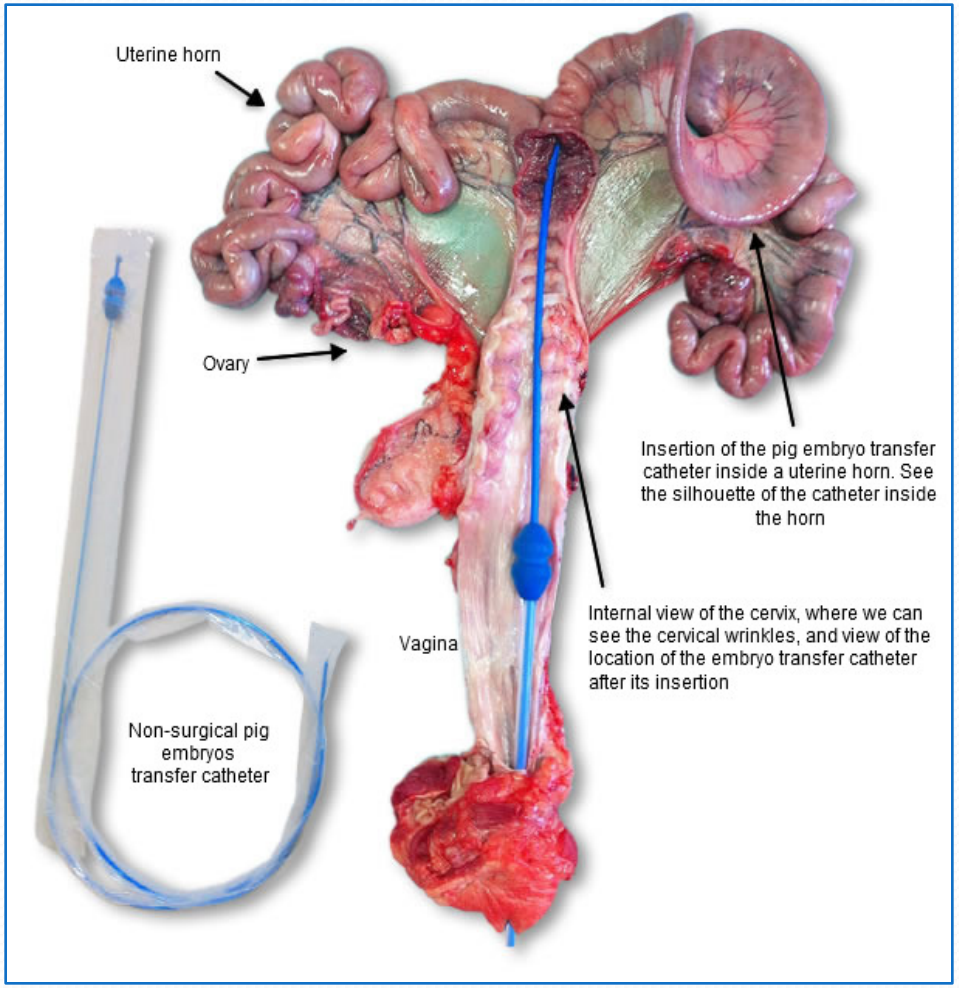
❖ **Laparoskopik embriyo transferi.**

(A) Infundibulum was grasped with assist forceps, and then inserted into a polyethylene tube. (B) Insertion of polyethylene tube into the ampulla via the infundibulum. (C) Swollen oviduct after embryo transfer. (D) Preventing back flow of medium into the abdominal cavity by grasping the infundibulum with assist forceps.

Source:http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2008.9.1.103&vmode=PUBREADER#!po=37.5000

Embryo Transfer – embriyo toplanması

❖ ***Domuzlar/Sows :*** Cerrahi olmayan metot



- Cerrahi metot
  - ➢ *Linea alba* kısmından insizyon vasıtasıyla anestezi altında uygulanıyor.
  - ➢ Domuzlarda *uterotubal junction* (ovidukt-kornu bağlantısı) *uterus*'tan yapılan geri dönümlü (retrograde) embriyo elde etmesini (yıkanmasını) engelliyor ve o yüzden embriyolar ovidukta takılan bir kanül ile tüplere toplanıyor.

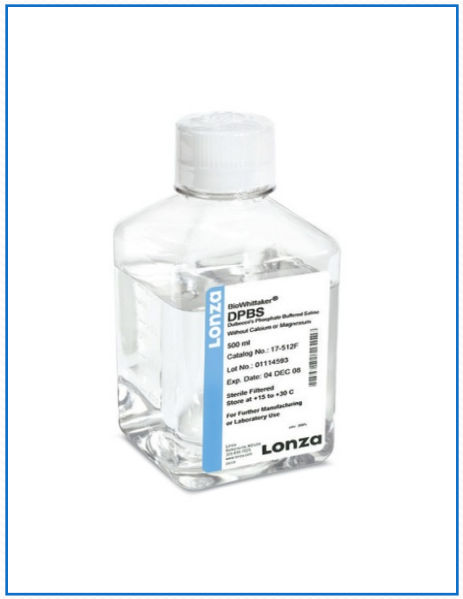
Picture from https://www.pig333.com/what_the_experts_say/non-surgical-pig-embryo-transfer-is-a-reality_8308/

Embryo Transfer – embriyo toplama vasatları

- Medium (Uterus yıkama vasatı)

➢ İsotonic mediumlar kullanılıyor ve bu vasatlar Dulbecco`s PBS veya Laktatlı Ringer bazındadır (Dosage: 0.5 – 1.0 l/cornu uteri).

➢ Antibiyotıkler (Penicilin, Streptomicin) artı Antimikotik ilave edilir.



➢ Surfactants (BSA ya da polyvinyl alcohol) – embrıyoların yapışkanlıgını onlemek için kullanılır.

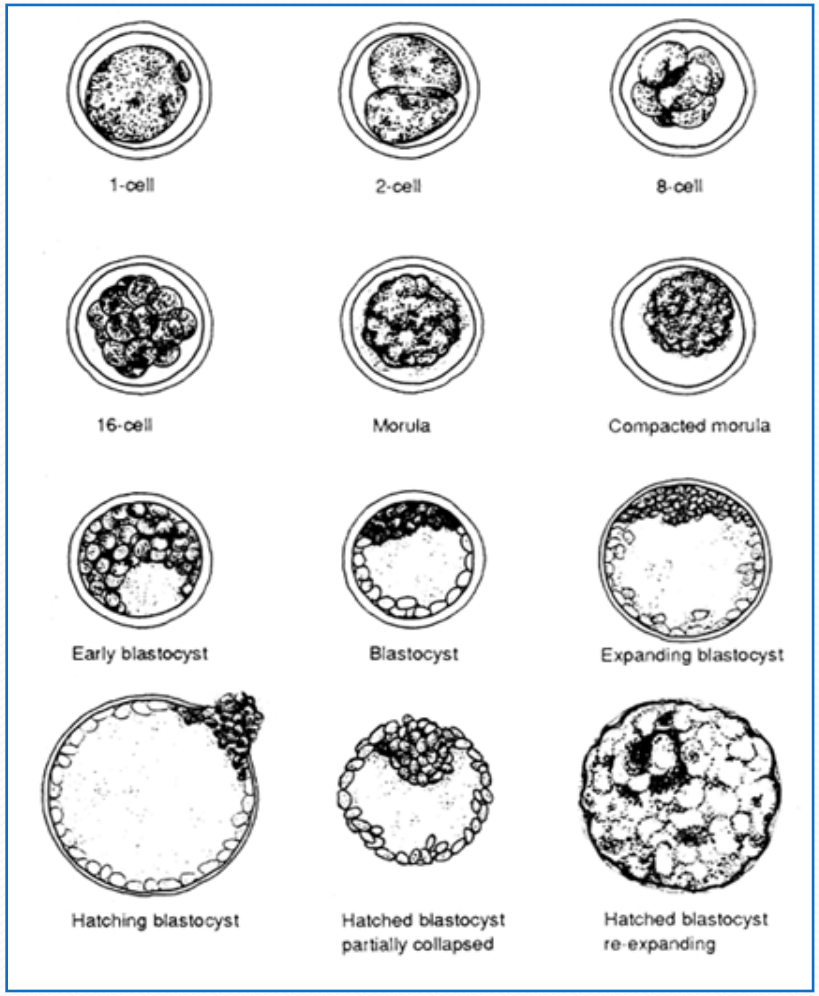
➢ Yıkama işlemi uygulandıktan sonra uterus içerisine iyot içerikli antiseptik (iyot-povidon) solüsyon verilmeli ve PGF2α i.m. uygulanmalı.

Embriyo işlemleri ve değerlendirmeleri

- Erken embriyonik gelişim tablosu

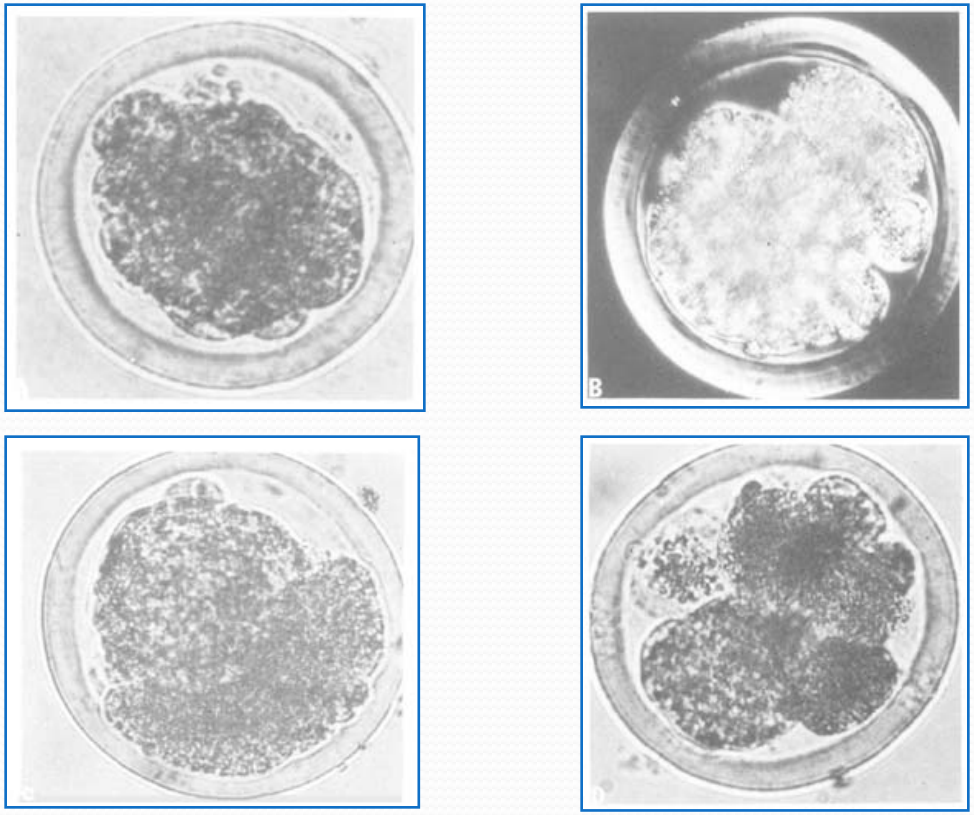
Species	First Cleavage	Second Cleavage	Entry into Uterus (h)	Stage of development	Loss of Zona	Placental Attachment
Cow	20-24	32-36	72-84	8-16 Cell	9-11 (day)	22 (day)
Sheep	16-18	28-32	66-72	8-16 Cell	7-8	15
Pig	14-16	20-24	46-48	4 Cell	6	13
Horse	24	30-36	140-144	Blastocyst	8	37

Embriyo işlemleri ve değerlendirmeleri



Picture from http://www.fao.org/docrep/004/t0120e/t0120e07.htm

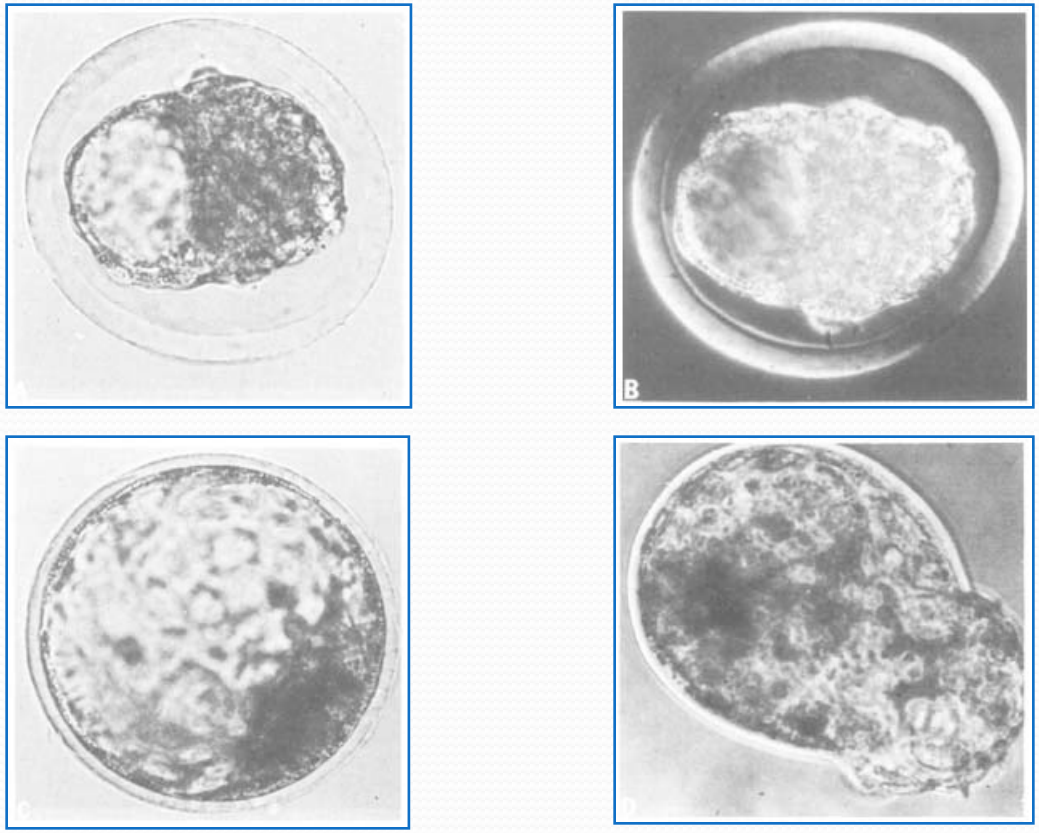
Embriyo işlemleri ve değerlendirmeleri



(A) Newly compacted morula recovered seven days after oestrus. Bright-field optics. (B) Compacted morula recovered seven days after oestrus with several excluded cells; good morphological quality. Nomarski optics. (C) Compacted morula recovered seven and a half days after oestrus with many large, excluded cells, fair morphological quality. Bright-field optics. (D) Poor quality morula with many degenerate cells. However, the small, compacted mass to the lower left has a small chance of developing into a calf. Bright-field optics

Source: http://www.fao.org/docrep/004/t0117e/T0117E07.htm#ch7

Embriyo işlemleri ve değerlendirmeleri



A) Normal, early, expanded blastocyst recovered seven days after oestrus. Bright-field optics. (B) Same embryo as in (A) but Nomarski optics. (C) Normal, expanded blastocyst recovered seven and a half days after oestrus. Note the thinned zona pellucida. Bright-field optics. (D) Hatching blastocyst typically found nine days after oestrus. Bright-field optics

Source: http://www.fao.org/docrep/004/t0117e/T0117E07.htm#ch7

Embriyo işlemleri ve değerlendirmeleri

- Embriyoların değerlendirilmesi – IETS`e göre standart olarak embriyonun gelişim dönemine ve kalitesine göre yapılmaktadır. Gelişme dönemi sınıflandırılması 1`den (Fertilize olmamış oosit veya 1 hücreli embrıyo) 9`a (Exspanded Hatching blastocyte) kadar yapılmaktadır.

No	Gelişim aşaması	Uluslar arası kısaltma
1	Fertilize olmamis	UFO
2	2-12 hucreli	
3	Erken morula	M
4	Kompakt morula	CM
5	Erken blastosit	EBl
6	Blastosit	Bl
7	Expanded Blastocyte	ExpBl
8	Hatched Blastocyte	HedBl
9	Expanded hatched Blastocyte	ExpHedBl

Embriyo işlemleri ve değerlendirmeleri

- Embriyo kalitesi de numaralandırarak yapılmakta ve embriyonun morfolojik butunluğune göre sınıflandırılmaktadır. Morfolojik yapılarına göre embriyolarda uygulanacak işlemler asağıdaki tabloda belirlenmiştir:

Morfolojik yapi	Kod	Yapılacak
1	Çok iyi *(Excellent)	ET veya dondurma
1	Iyi (Good)	ET veya dondurma
2	Orta (Fair)	Et veya dondurma
3	Saglıksız (Poor)	Kültür sonrası ET veya dondurma
4	Ölü veya dejenere** (Degenerate)	Kullanılmaz

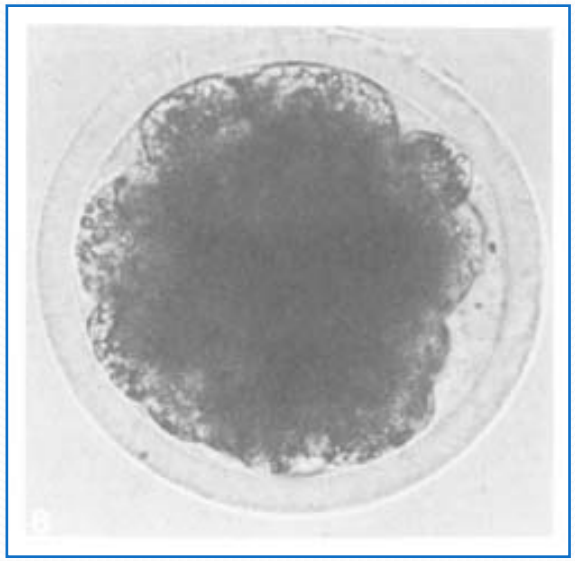
* Her bir blastomer yuvarlak sekilli uniform buyukluk, renk ve yogunluktadır. Bu embriyo, gelisiminin beklenen asaması ile tutarlılık gosterir. Hucreler arasındaki duzensizlik cok dusuk seviyededir ve yasayan embriyonik hucre orani 85% ve uzerindedir.ZP yuvarlak olmalı ve konkav ya da katlanmıs bir gorunumu olmamalıdır.

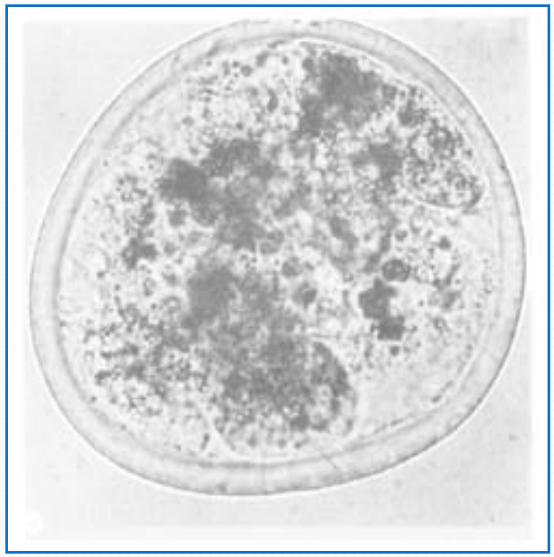
** Olu veya dejenere embriyolar, oositler ve 1 hucreli embriyolar canlı degillerdir.

Embriyo işlemleri ve değerlendirmeleri

❖Gelişim aşamasına ve morfolojik yapılarına göre değerlendirilen embriyolar 3 farklı şekilde kullanılabilir:

- Taze olarak transfer edilebilir;
- Dondurularak saklnabilir;
- Ileri biyoteknolojik uygulamalarda (cinsiyet tespiti, embryo bissection) kullanılabilir.



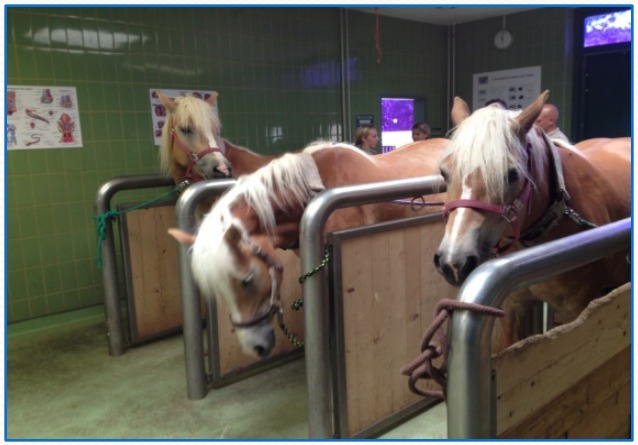


(B) *Estrus*'tan 3 gün sonra toplanan *uncompacted morula*(kompakt olmayan morula), koyu (dark) sitoplasma. (D) *Estrus*'tan 7 gün sonra toplanan ağır seviyede dejenere embriyo (Bright-field optics).

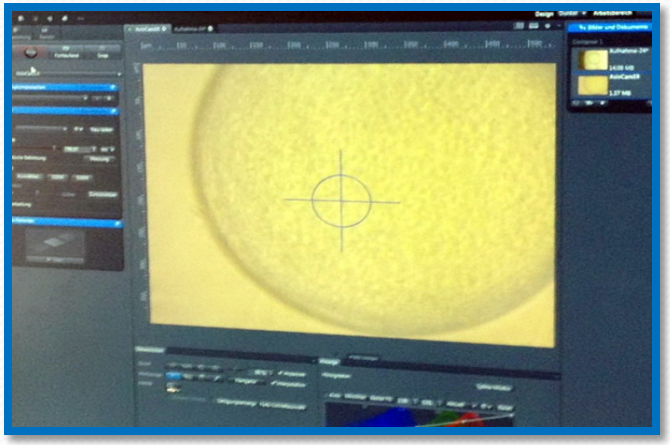
Source: http://www.fao.org/docrep/004/t0117e/T0117E07.htm#ch7

Embryo Transfer

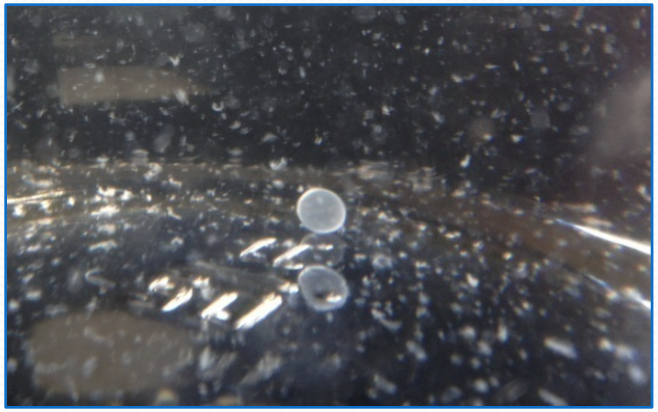
- Atlar/Horses



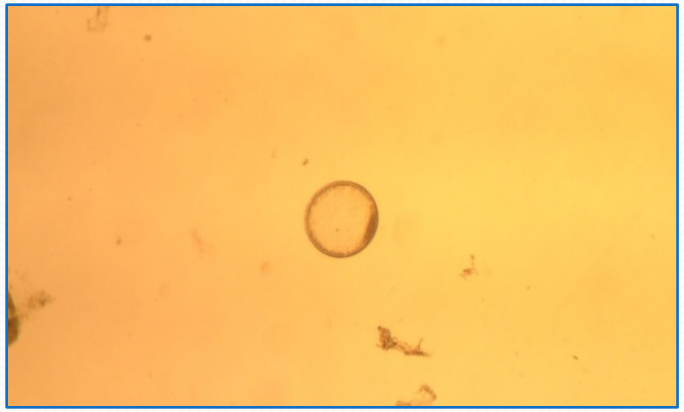
ET Station,VetmedUni, Vienna (orig.)



Embryo assesment (orig.)



Equine expanded blastocyst (orig.)



Equine expanded blastocyst with well visible inner cell mass(orig.)

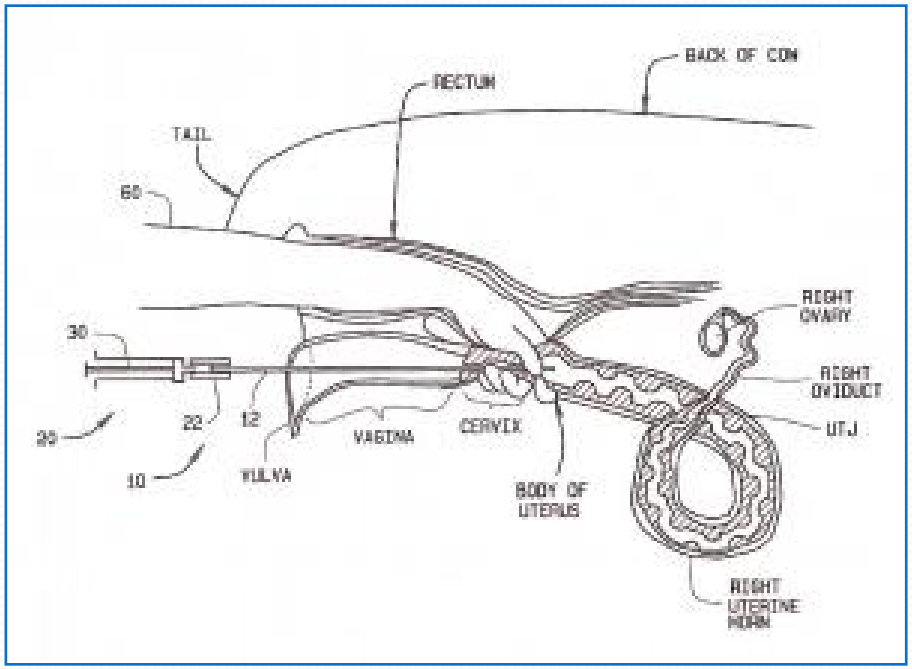
Embriyo işlemleri ve değerlendirmeleri

Hayvan türü	Embriyolarin alınması ve transferi –gün, estrus sonrası
Sıgır	6-8
At	7-8
Koyun/Keci	6-7
Domuz	5-6

- Toplanan embriyolar yıkama sıvısından biran once uzaklaştırılması gerekir. Sıvıda bulunan mukus, kan ve hucre dokuntuleri embriyo uzerinde olumsuz etki yaparlar.
- Yıkama sıvısı *Emcon* filtre kullanılarak süzuluyor, filtrede kalan kısım dilue edilerek pıhtı ve kandan uzaklaştırılıyor
- Petri kabına alınıyor ve daha sonra stereopmikroskop altında embriyolar aranıyor. Yıkama sıvısında belirlenen embriyolar taze hazırlanmıs saklama sıvısına alınmalı ve burda birkaç defa yıkanmalıdır (CS* 20% + modified D-PBS).

* *Calf Serum*

Transfer of Embryos



Picture from http://www.fao.org/docrep/004/t0120e/t0120e07.htm

- Amaç: Tum resipient hayvanlarda *cornu uteri*`lerine yuksek viabilite potansiyeline sahip embriyo nakliyesi/transferi;

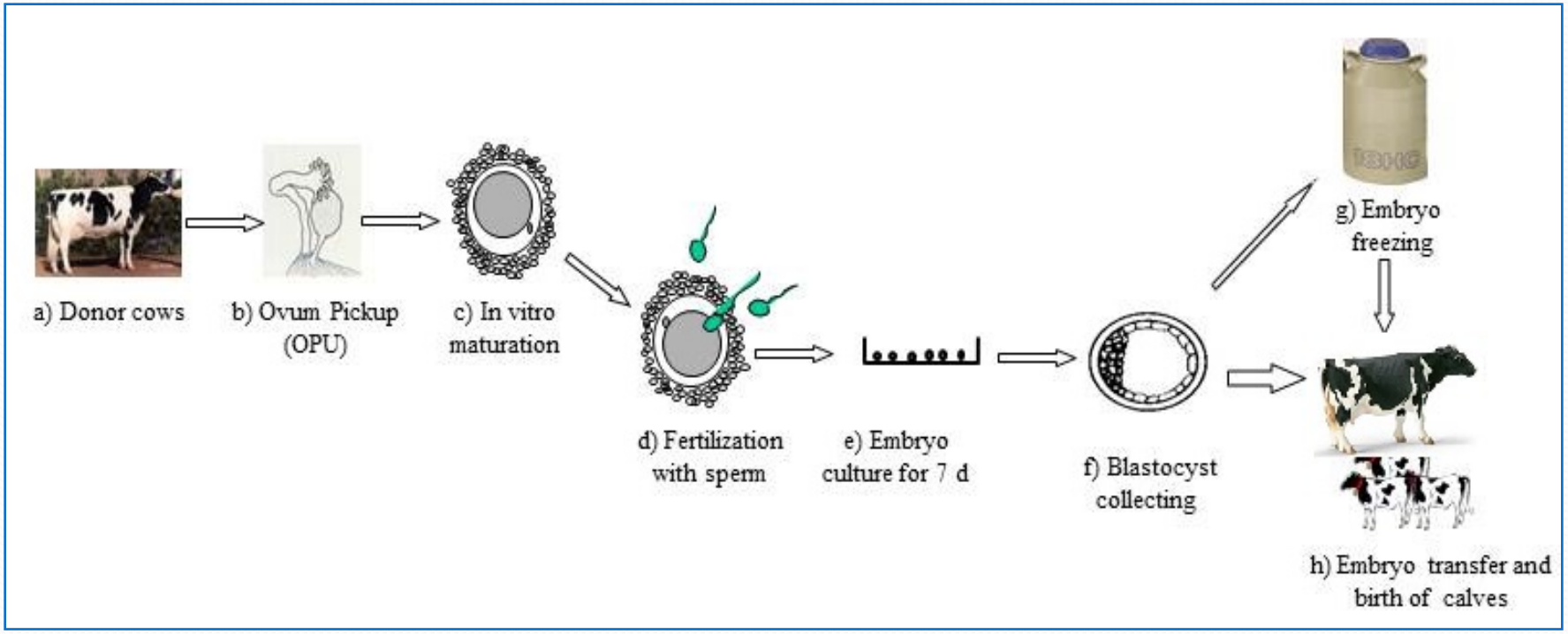
- Nedeni: Resipient hayvanlarda gebelik elde etmek icin;

- Teknik: Transfer kateteri kullanarak *cornu uteri*`ye tek embriyo transfer ediliyor (in ipsilateral side);

Note that both the donor and recipient should has CL at similar stages of leutinization. Thus, the uterine environment in the donor and recipient are quite similar.

In Vitro Production

❖ IVP prosedürlerin genel olarak aşamaları



Picture from http://www.renovalife.com/OPU-IVF_concepts.php

IVF

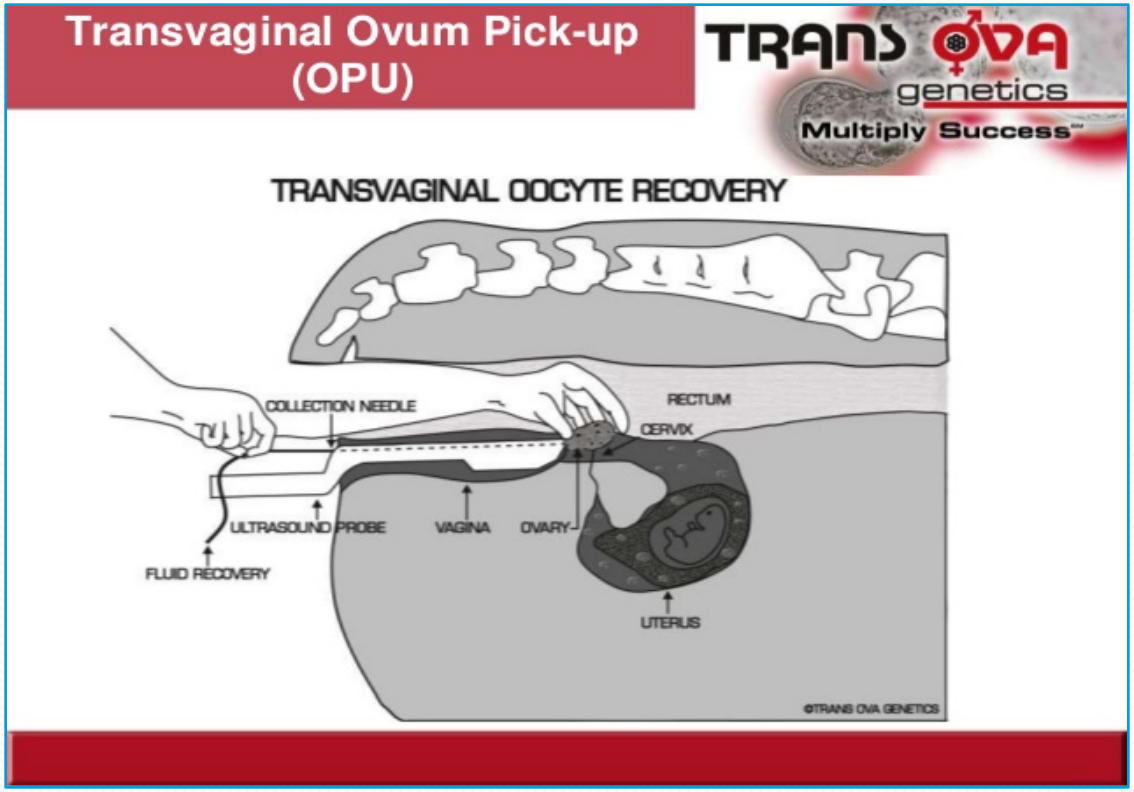
- In Vitro Embriyo üretim aşamaları:
  - Ovaryumlardan oosit eldesi
    - ✓ Mezbaha materyalinden,
    - ✓ “Ovum Pick-Up” (OPU) yöntemiyle
  - Oositlerin maturasyonu (IVM)
  - Spermanın fertilizasyon amacıyla hazırlanması
  - Oositlerin fertilizasyonu (IVF)
  - Embriyo kültürü (IVC)

In Vitro embriyo üretimi (IVP)

- In Vitro Embryo Production (IVP): Canlı donör hayvanlarda Ovum Pick-up (OPU) metodu uygulamalarında önemli hususlar:
  - Oosit kaynakları tespit edilebilir / *Oocyte source can be identified*
  - Tekrarlanan oosit toplanması (kazanımı) mümkün / *Repeated oocyte retrieval is possible*
  - Donörün fizyolojik statüsü bilinmektedir / *Physiological status of donor is known*
  - Hormonal stimülasyon gerekli değildir /*Hormonal stimulation is not necessary*
  - Subfertil hayvanlarda klinik bir yöntem olarak da kullanılabilir /*Can be used as a clinical tool in subfertile ani mals*

IVF (IVP/OPU) – oosit toplanması

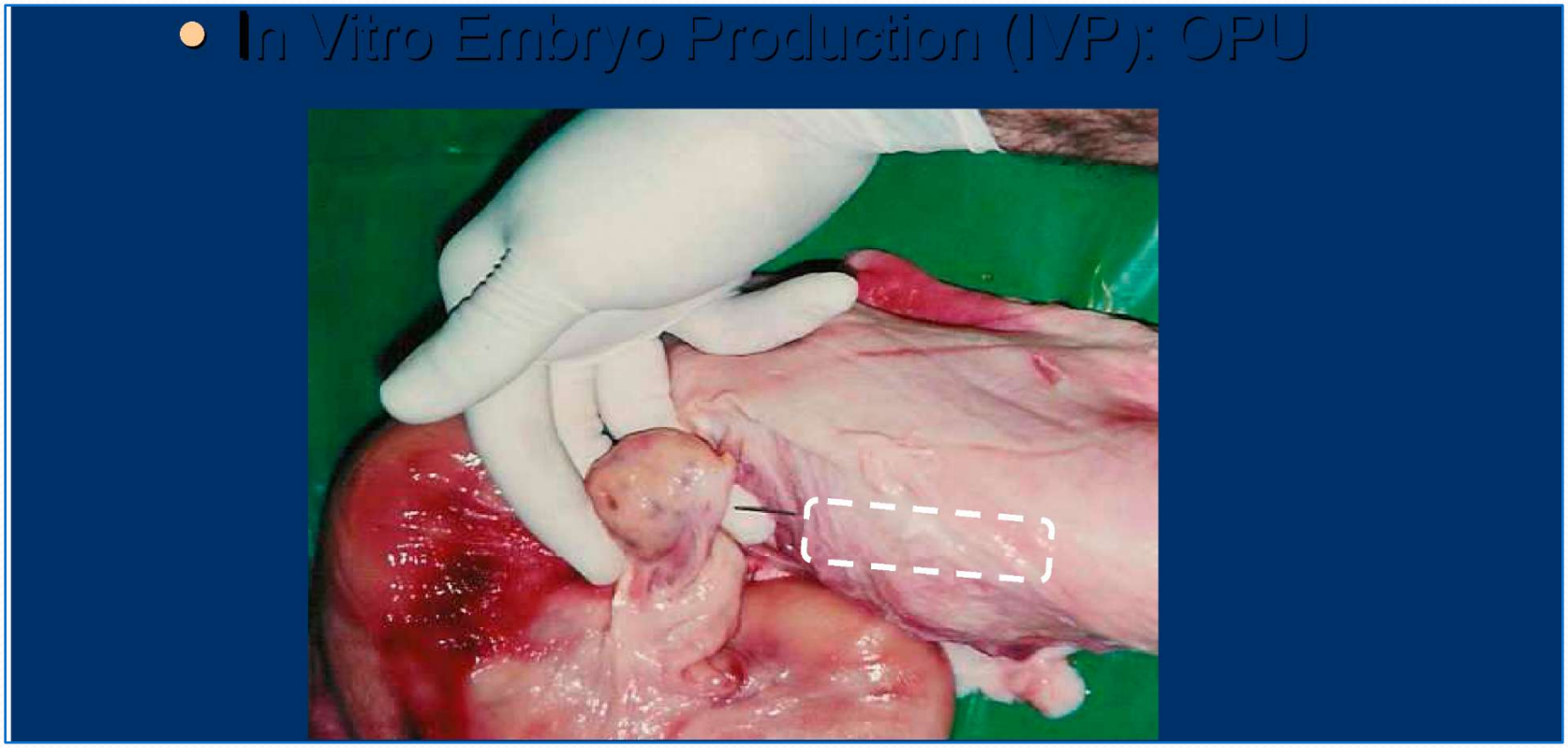
- Oositler ineklerde ve kısraklarda ovarium`lardan ultrason kontrolünde transvajinal aspirasyon yöntemi ile toplanıyor. Bu sırada diğer el rektum`dan ovarium`u vajinanin forniks duvarına yaklaştırarak sabit tutuyor. Küçük türlerde laparoskobik yöntem kullanılmasi tercih ediliyor ve böylece foliküller görunerek tanımlanıyor ve aspire edilebilir.



Picture from http://www.slideshare.net/truffl emedia/dr-mark-allen-present-future-bovine-genetic-reproductive-technologies

IVF (IVP/OPU)– oosit toplanması

- Oocyte collection through transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration



Picrure by Peter E.J. Bols. Biotechnology of reproduction in farm animals. AAP-2010, Leida-Spain

IVF

- Oosit toplama intervalleri:
  1. Haftada 2 defa

     a) 3 gun arayla
     b) 4 gun arayla

     } 8 oosit eldesi / OPU seans

  2. Haftada bir defa OPU (5,5 oocytes at each OPU session)

- Daha yuksek oosit eldesi ve erken embryo gelisim performansi icin:
  - Donorlari onceden gonadotropin uygulamasi
  - “Coasting period 48-84 h of FSH starvation”(FSH “açlık” suresi)

In a recent, very comprehensive comparison of different OPU intervals with and without FSH, Chaubal et al. (2006) reported that the most productive protocol in terms of oocyte and embryo production involved dominant follicle removal, FSH treatment 36 hours later, and OPU 48 hours after FSH. This treatment was alternated weekly with simple once weekly OPU.

IVF

- IVF - *in vitro* maturasyon (IVM), *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve *in vitro* kültür *(IVC)* prosedürleri içerir. Bu işlemler genellikle in vitro üretimi (IVP) embriyoların üretilmesi için sırayla gerçekleştirilir.
  - IVM – bazı durumlarda, oositler *in vivo* olarak olgunlaşmaya bırakılıyor ve Graaf foliküllerden ovulasyondan hemen önce aspirasyon yoluyla toplanıyor.
  - Bunu yapmak için oosit toplama zamanını çok hassas bir zamanlama gerektirir ve çoğu durumda, olgunlaşmamış oositler toplanıyor ve daha sonra, *in vitro* olarak olgunlaştırılır.
  - Bunu takiben oositler CO_2 dengelenmiş maturasyon mediumuna plastik tüplere yerleştirilir ve 39ºC portable inkübatör içerisinde nakledilebilir.
  - IVM medıum: TCM-199 + 5% CS

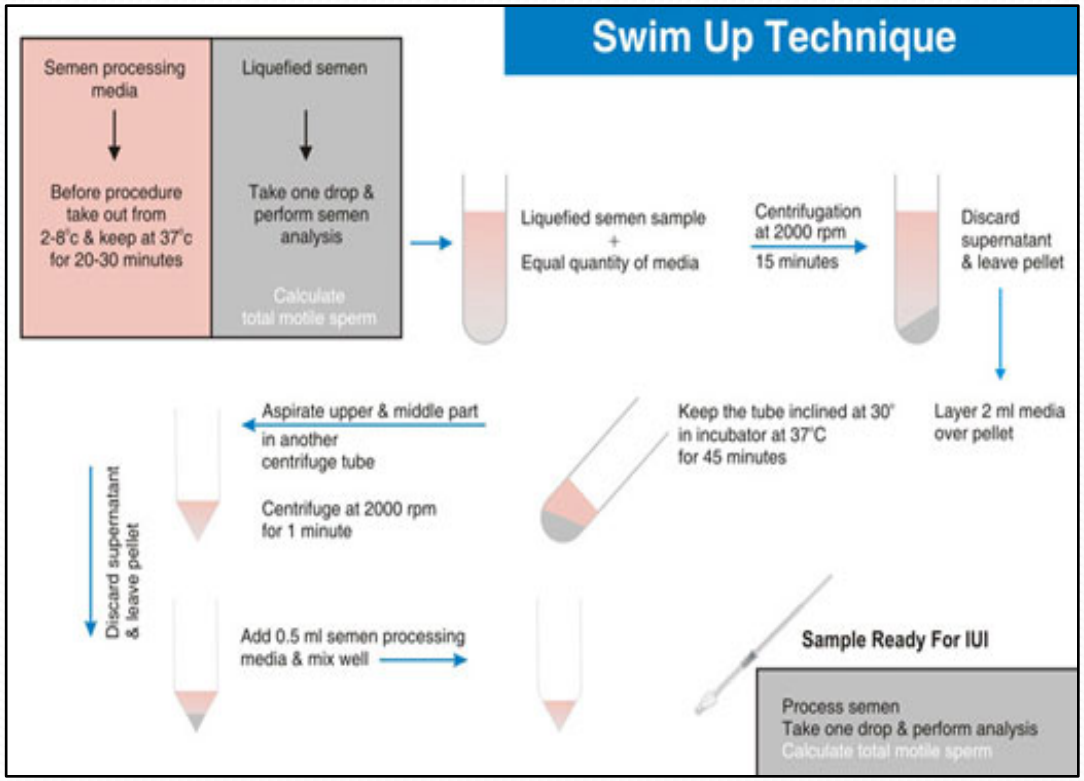
IVF

- In Vitro Maturasyon (IVM) – maturasyon sürecinde kullanılan vasatlar ve şartlar

- Oosit maturasyon surecinde *Tissue Culture Medium* (TCM – 199) vasatı en sık kullanılıyor . Buna ilave olarak 0.01µg/ml FSH , 0.01µg/ml LH, %3BSA ve 50 µg/ml gentamycin ekleniyor.
- Daha sonra petri kabına hazırlanmış olan maturasyon medium`undan (TCM-199) 50 µg mikrodamlalar (microdrop) damlatılıyor, her damlada 10 oosit olması gerekiyor ve bu damlalar mineral yağı ile dikkatlice kaplanıyor.
- Maturasyon 38.5 C, %5 CO_2 20 – 22 saat period içerisinde inkübatör`de gerçekleşiyor.

IVF

- Sperm separasyonu – en yüksek motilitede ve fertilizasyon kapasitesine sahip spermatozoa seçimi
  - *Swim up* tekniği
  - *Percol gradient* teknigi



Picture from http://www.spermprocessor.com/sperm-swim-media.html

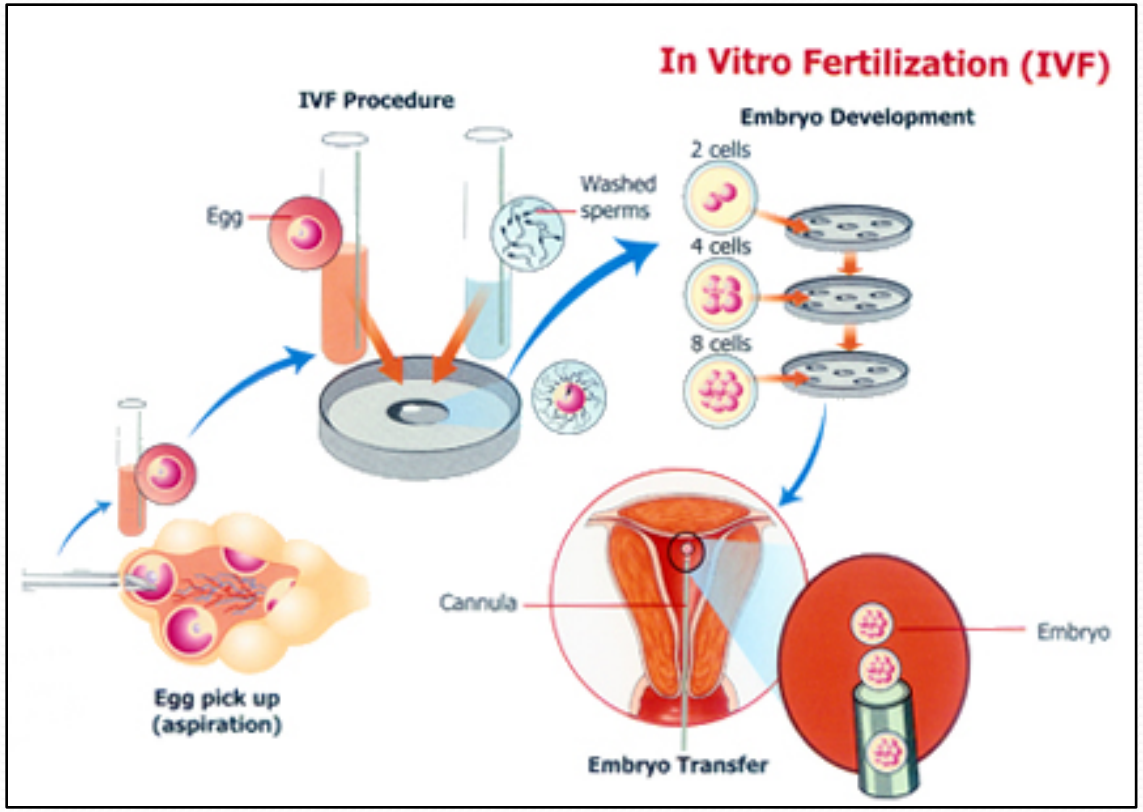
IVF

- Sperm kapasitasyuonu – spermatozoonların oositi dölleyebilme yeteneği kazanmaları. Spermatozoonlar dişi genital sistenminde ovidukta doğru hareket ettikleri süreçte yüzeylerinde bulunan glikoproteinlerin (decapacitation factors) yıkanması, spermlerde biyokimyasal değişiklikler ve sperm motilitesinin hızlanmasi ile sekillenir. Akrozomal reaksiyonun şekillenmesi, kapasitasyonun tamamlanmış olduğunun morfolojik göstergesidir. Bu yaklaşık 6 saat sürmektedir.

- Kapasitasyon mediumlari:
  - Sıgır – heparin ...
  - Hazır ticari mediumlar

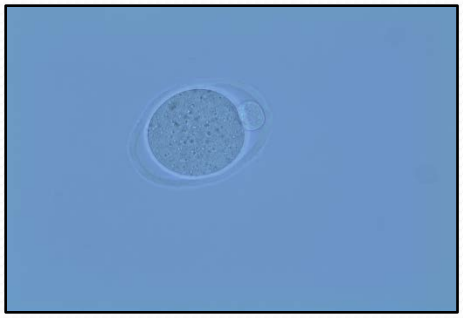
IVF

- IVF aşamaları



Picture from http://loved-forever.net/page/4/

Mouse oocytes (orig.)



Denuded mouse oocyte (orig.)

IVF with mouse gametes (orig.)

IVF/High-tech assisted reproduction techniques

- *Sperm sexing*: çoğu sperm ayırma teknikleri dengesiz sedimantasyon (*nonequilibrium sedimentation* – düşme hızına göre) veya yoğunluk gradyanına göre dengeli sedimantasyon (*sedimentation to the level where specific gravities of sperm and the medium are equal*) bazındadır.

  - Medium üzerinde imobilize edilmiş sperm sedimantasyonu

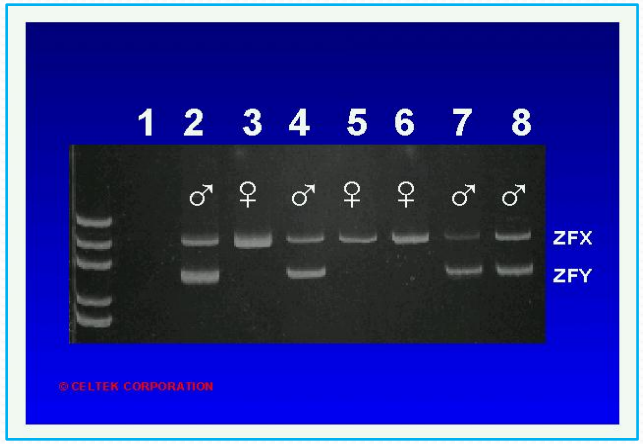
  - Albumin separasyonu – serum albumin kolonlar üzerine sperm yayıldığında, kolonlarından daha fazla Y spermatozoa elde edilir /*when semen layered over columns of serum albumin, increased number of Y sperm are recovered from the albumin layers*;

  - Trofoblast hucre biyopsi ve DNA analizi (PCR, FISH)

    ya da karyotyping;

  - Imunolojik metodlar (H-Y Antigens)

  - …



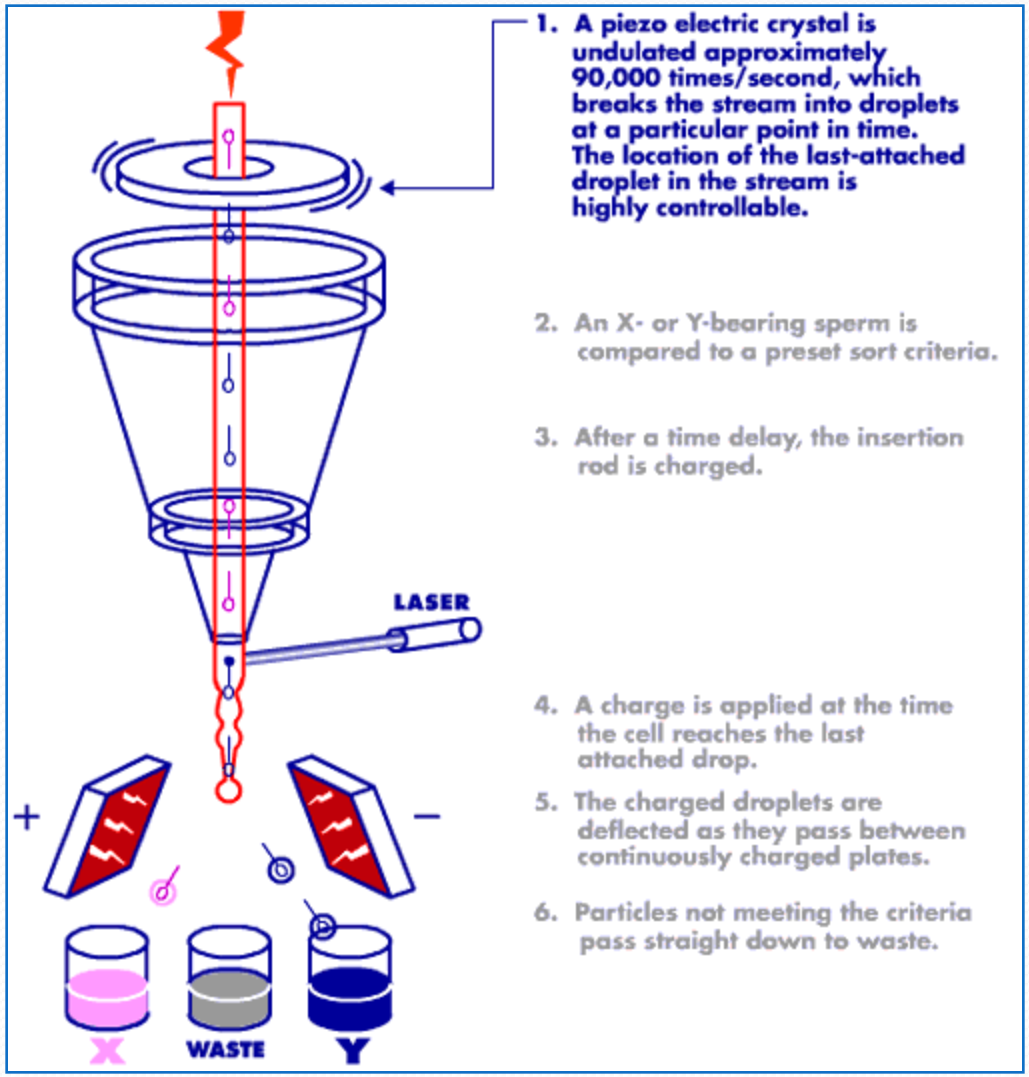
Picture from http://www.compgene.com/sex.htm

IVF/High-tech assisted reproduction techniques

❖ Flow cytometry – genel prensip

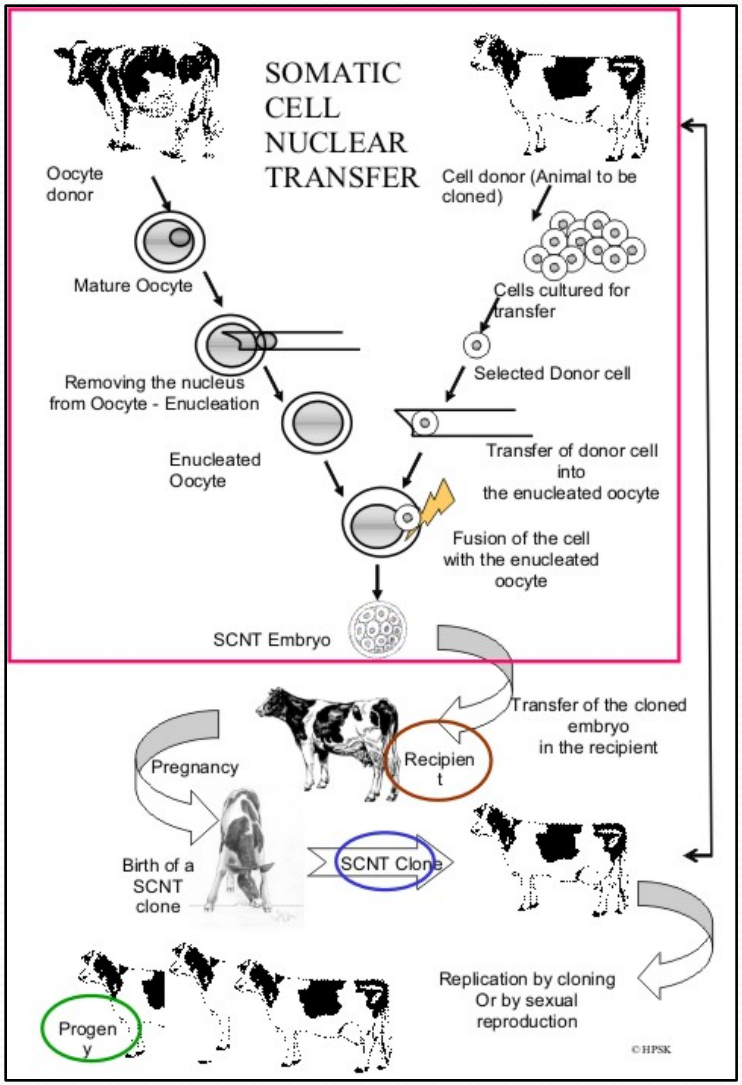
X- ve Y- kromozom taşıyan sperm hücrelerin aralarındaki farkları kullanarak spermatozoon ayırımı yapılabilir. İneklerde X- kromozomu taşıyan spermler %3.8 daha fazla miktarda DNA taşımaktadır – bunu kullanarak X ve Y taşıyan spermatozoonları ayırabiliriz.

Animation from http://www.sexingtechnologies.com/



IVF/High-tech assisted reproduction techniques

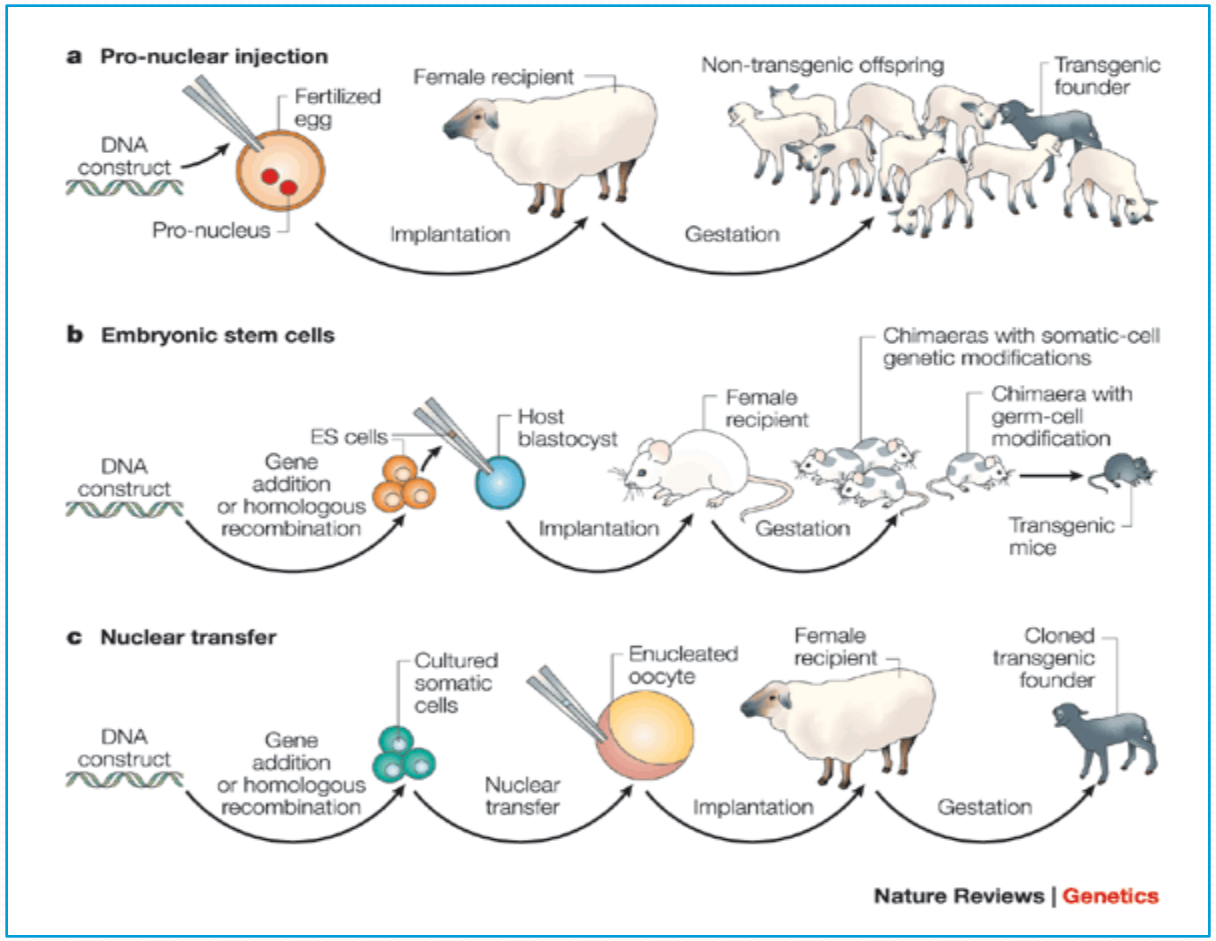
- Klonlama / Cloning
  - Reprodüktif klonlama embriyonun biseksiyonu veya nukleer transfer sonucunda aynı genetik yapiya sahip canlılar elde etmektir.
  - Nukleer transfer ile gerceklesen klonlamada genetik materyali çıkarılmış bir oosite, verici hayvandan alınan somatik hucre çekirdeğinin transferiyle yeni bir embriyo yaratılmaktadır.



Picture from http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.4.11.htm

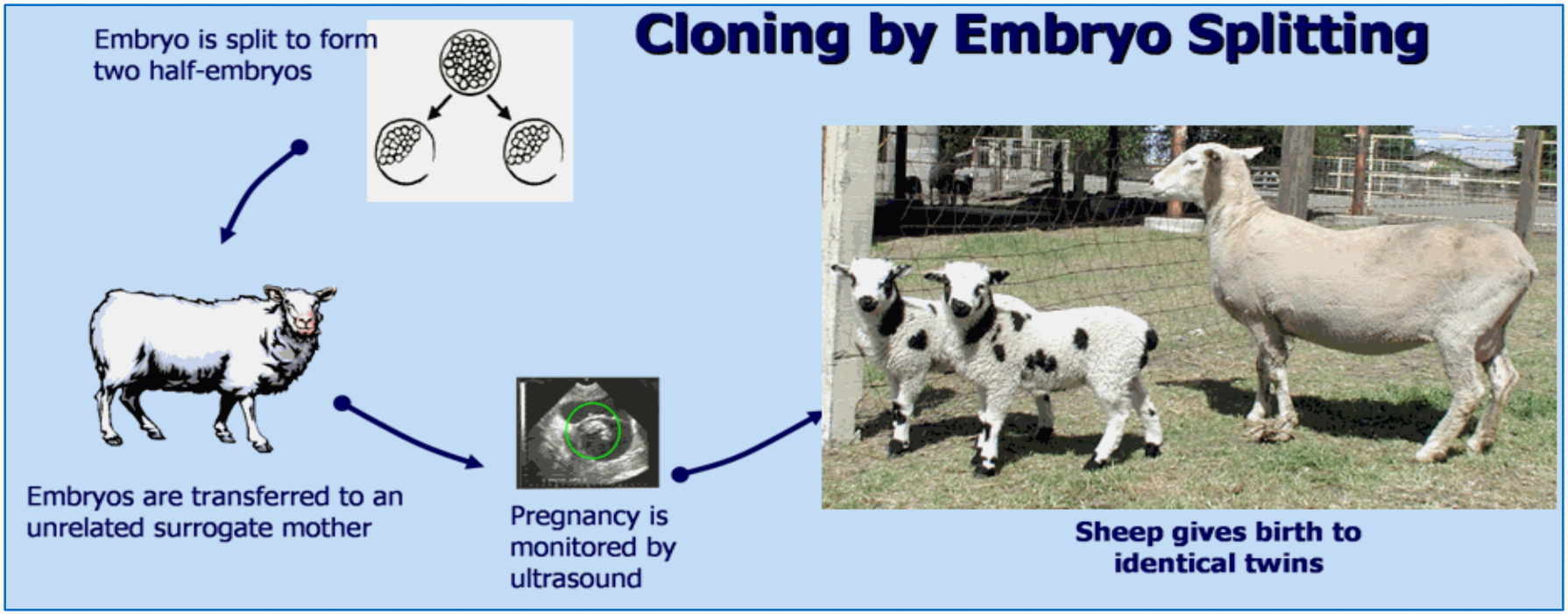
IVF/High-tech assisted reproduction techniques

- Transgenic animals – klonlanmış genlerin somatık hücreler ya da embriyo hücrelerine nakledilmesi, takiben nukleuslarına entegre olmaları ve sonuçta bu genlerin ekspresyonu (*cloned genes introduced into somatic cells or embryos*)

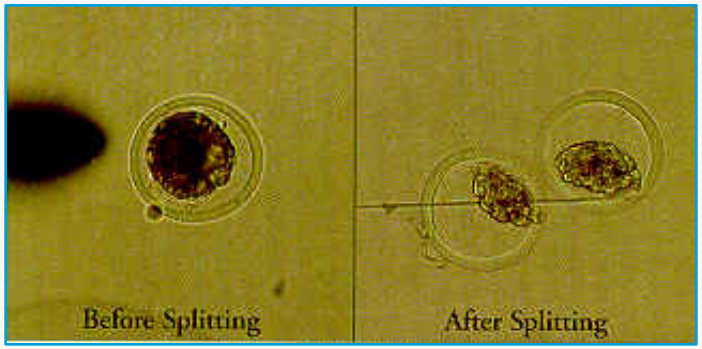


Picture from http://www.nature.com/nrg/journal/v4/n10/fig_tab/nrg1183_F1.html

Cloning



Picture from http://animalscience.ucdavis.edu/ANIMALBIOTECH/Biotechnology/Cloning/index.htm



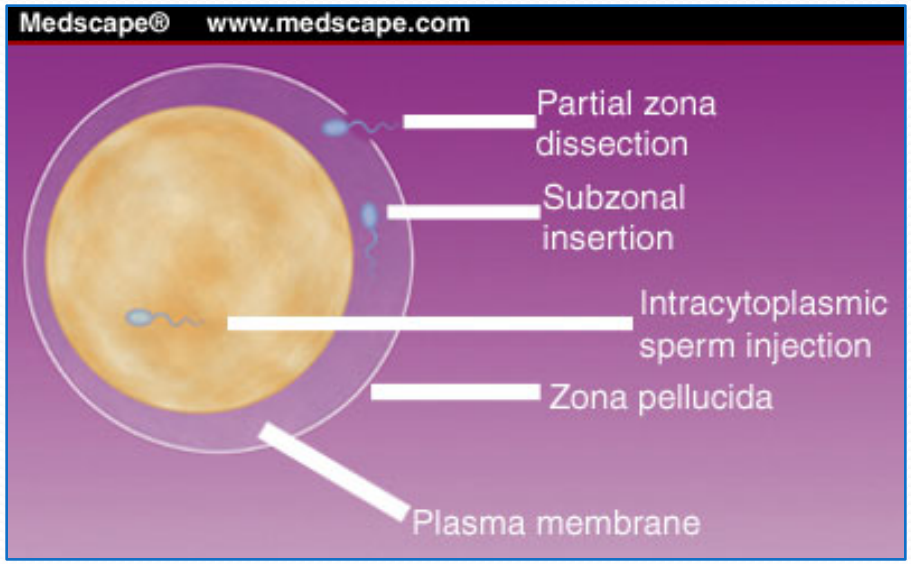
Picture from http://users.netonecom.net/~mapleview/cattle/biotech.php

IVF/High-tech assisted reproduction techniques

- Micromanipulation of zona pellucida
  - Fazla olan pronukleusu çıkarılması /*Removal of excess pronuclei*
  - *Zona pelucıda*` nın mekanık yöntemle incelmesi /*Zona drilling by mechanical force*
  - *Zona pelucıda*` nın punksiyonu /*Puncture with acid Tryod, pronase or trypsin solution with micropipette*
  - Mekanik yöntemle *Zona*`nın incelmesi

ve takiben mikroinseminasyon /

PZD – partial opening using mechanical force only, followed by microinsemination



Picture from http://www.medscape.com/viewarticle/410214_7

References

- P. L. Senger. Pathways to Pregnancy and Parturition, 2005
- E. S. E. Hafez. Reproduction in Farm Animals, 6th edition, 1993.
- Sang Tae Shin, Sung Keun Jang, Hong Suk Yang, Ok Keun Lee, Yhong Hee Shim ,Won Il Choi, Doo Soo Lee, Gwan Sun Lee, Jong Ki Cho, Young Won Lee. Laparoscopy vs. laparotomy for embryo transfer to produce transgenic goats (Capra hircus). J. Vet. Sci. (2008), 9(1), 103-107.
- Mustafa Kaymaz. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Medipres Matbaacılık Ltd., Malatya.
- Peter E.J. Bols. Biotechnology of reproduction in farm animals. AAP-2010, Leida-Spain.
- http://ww w.partners-in-reproduction.com/reproduction-cattle/
- http://www.fao.org/docrep/004/t0120e/T0120E00.htm#TOC
- www.currentconceptions.com
- http://animalsciences.missouri.edu/reprod
- http://www.iets.org/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true
- http://animalscience.ucdavis.edu/ANIMALBIOTECH/Biotechnology/Cloning/index.htm
- http://www.medscape.com/viewarticle/410214_7
- http://www.nature.com/nrg/journal/v4/n10/fig_tab/nrg1183_F1.html
- http://www.sexingtechnologies.com/
- http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.4.11.htm
- http://users.netonecom.net/~mapleview/cattle/biotech.php
- http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.4.11.htm
- http://www.spermprocessor.com/sperm-swim-media.html