ÇİFTLİK HAYVANLARINDA İN VİTRO EMBRİYO ÜRETİMİ



Aşamalar

- Mezbaha materyalinin temini
- Oositlerin ovaryumlardan toplanması ve uygun olanların seçilmesi
- İn vitro olgunlaştırma
- İn vitro fertilizasyon
  - Fertilizasyon
  - Hücre içi sperm enjeksiyonu (ICSI)
- İn vitro Kültür ve embriyonal gelişimlerin takip edilmesi

Ovaryumlar kesimden itibaren en fazla 2 saat içinde laboratuara ulaştırılır.

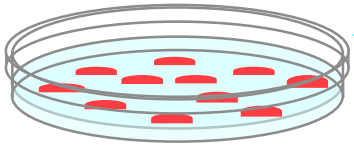
MEZBAHA

30-35°C

PBS

~1 - 5 mm çaplı folliküllerin kesilmesi veya aspirasyonu ile kompakt yapıda, sağlıklı görünümdeki oositler kazanılır

İn Vitro Maturasyon

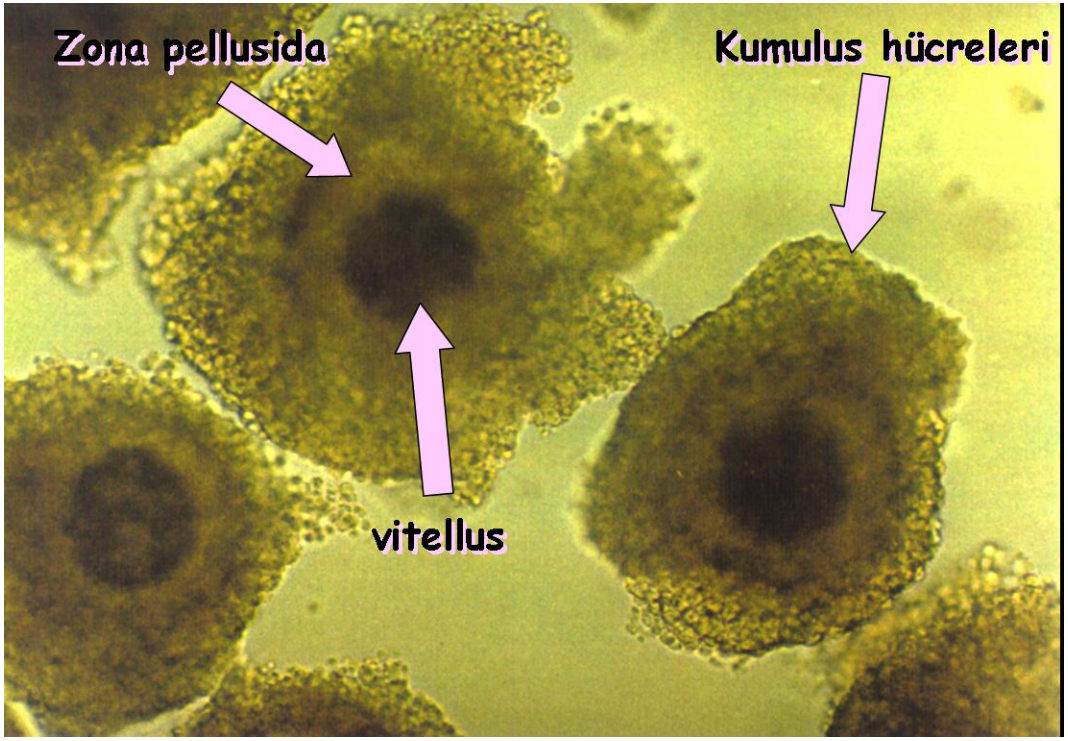




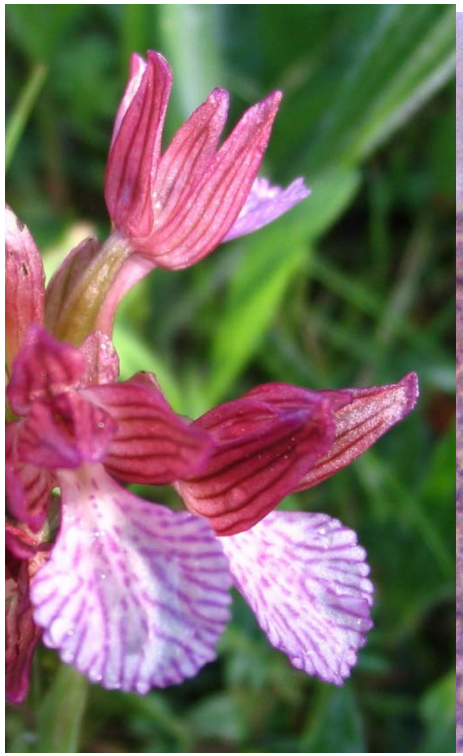
Ovaryumlardan Oositlerin Aspirasyon Tekniği ile Kazanılması

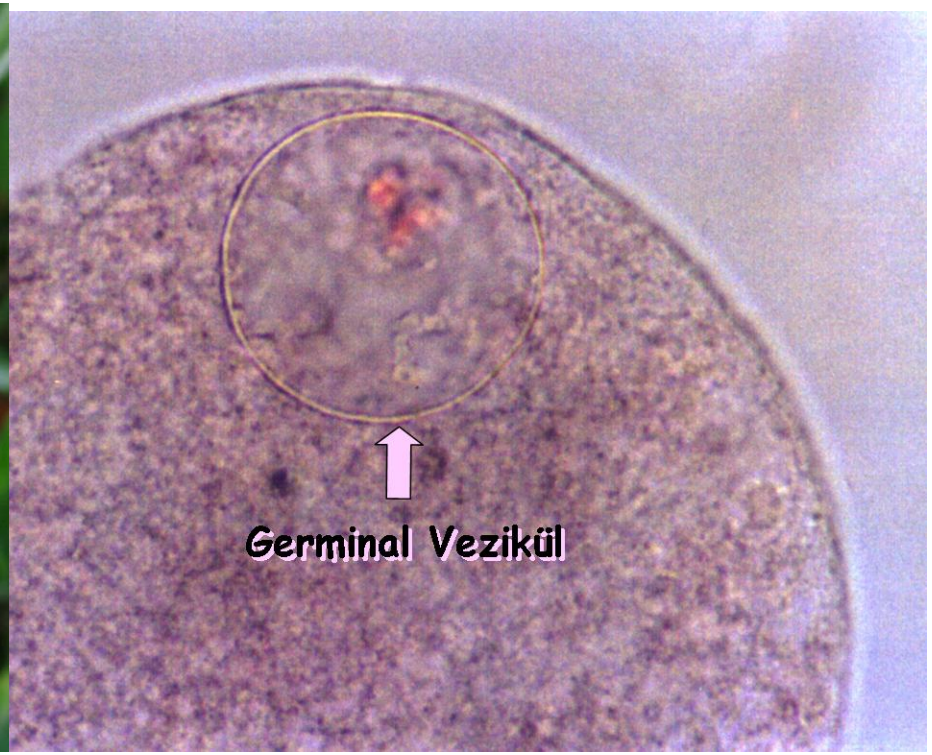


Olgunlaşma Öncesi Ovaryumlardan Kazanılan Primer Oositler

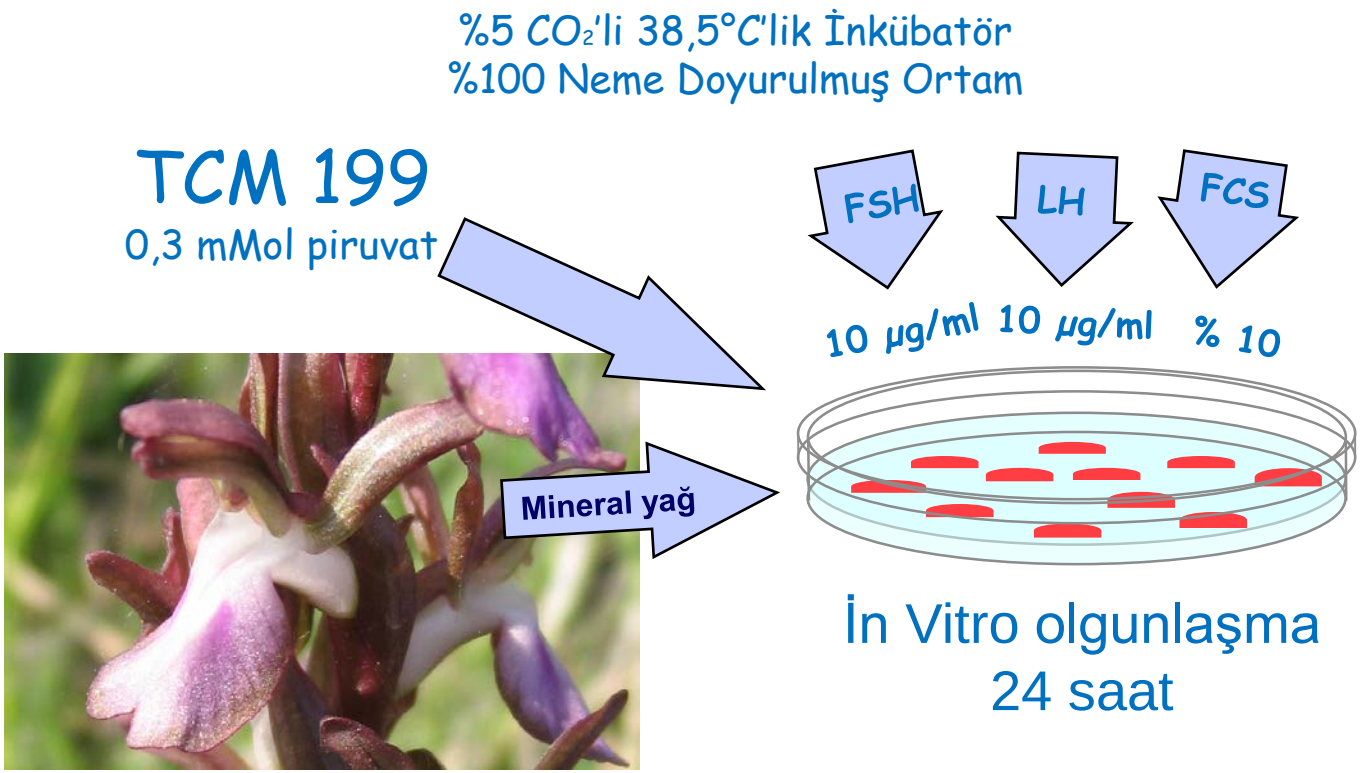


GV (Germinal Vezikül) Aşamasında Primer Oosit





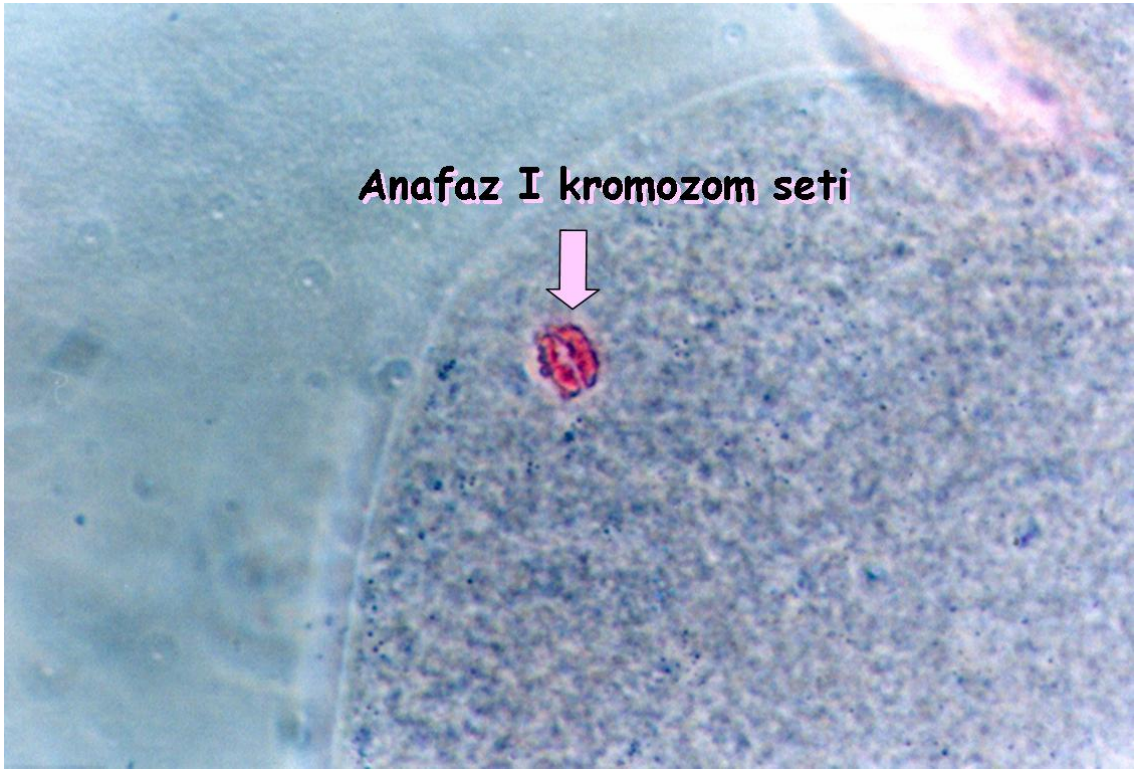
İn Vitro Olgunlaşma



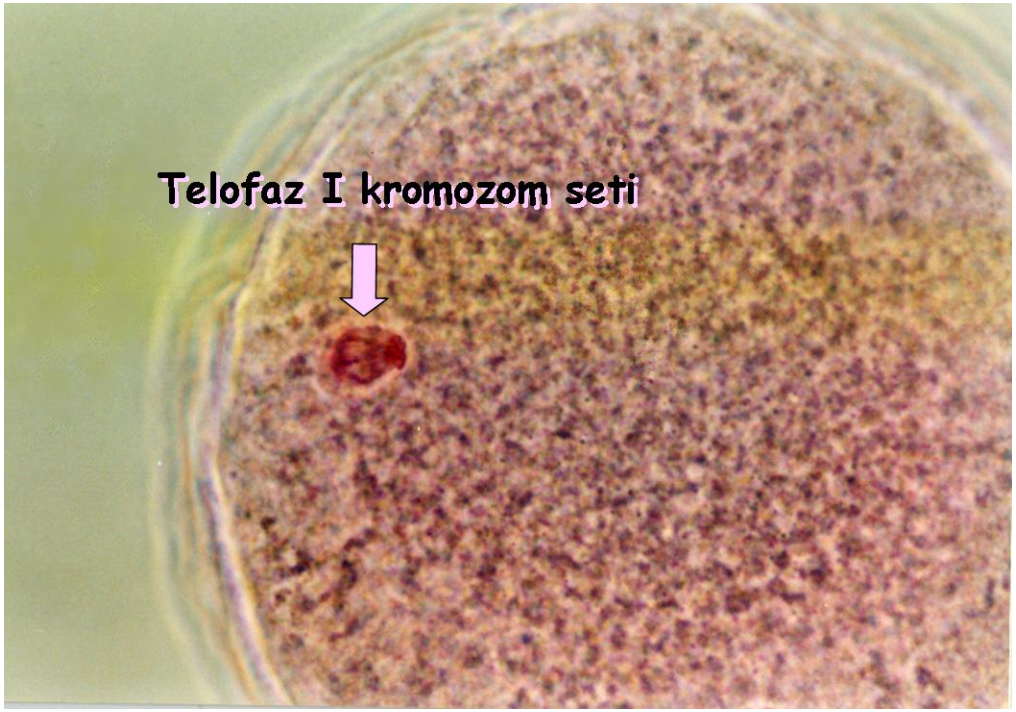
Metafaz I Aşamasındaki Oosit



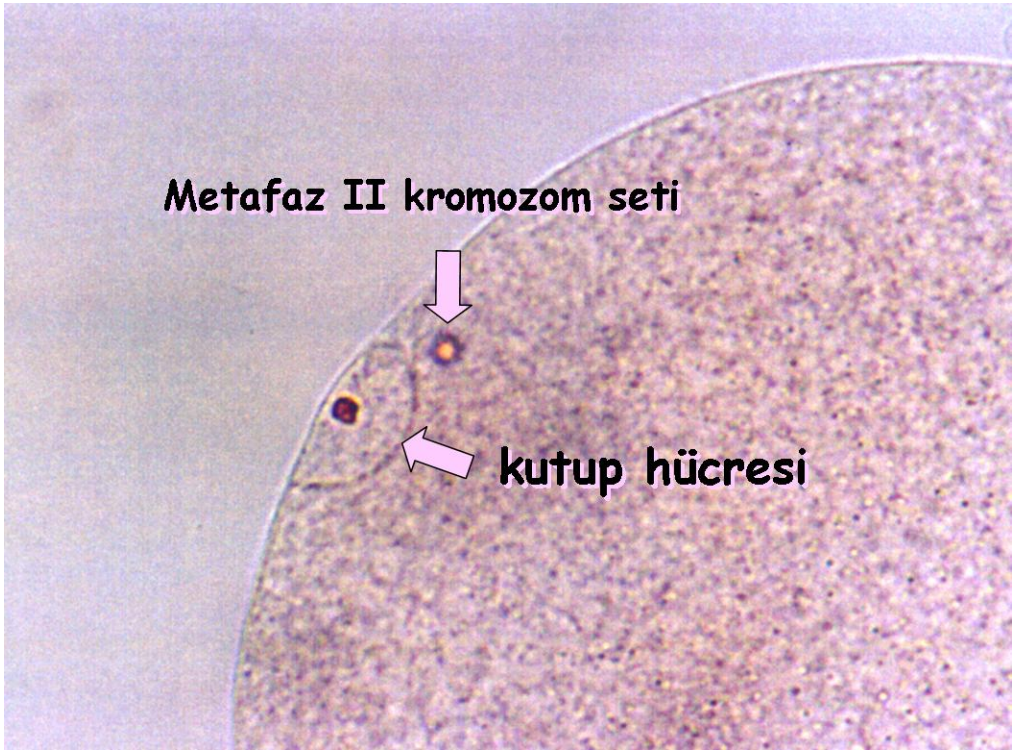
Anafaz I Aşamasındaki Oosit



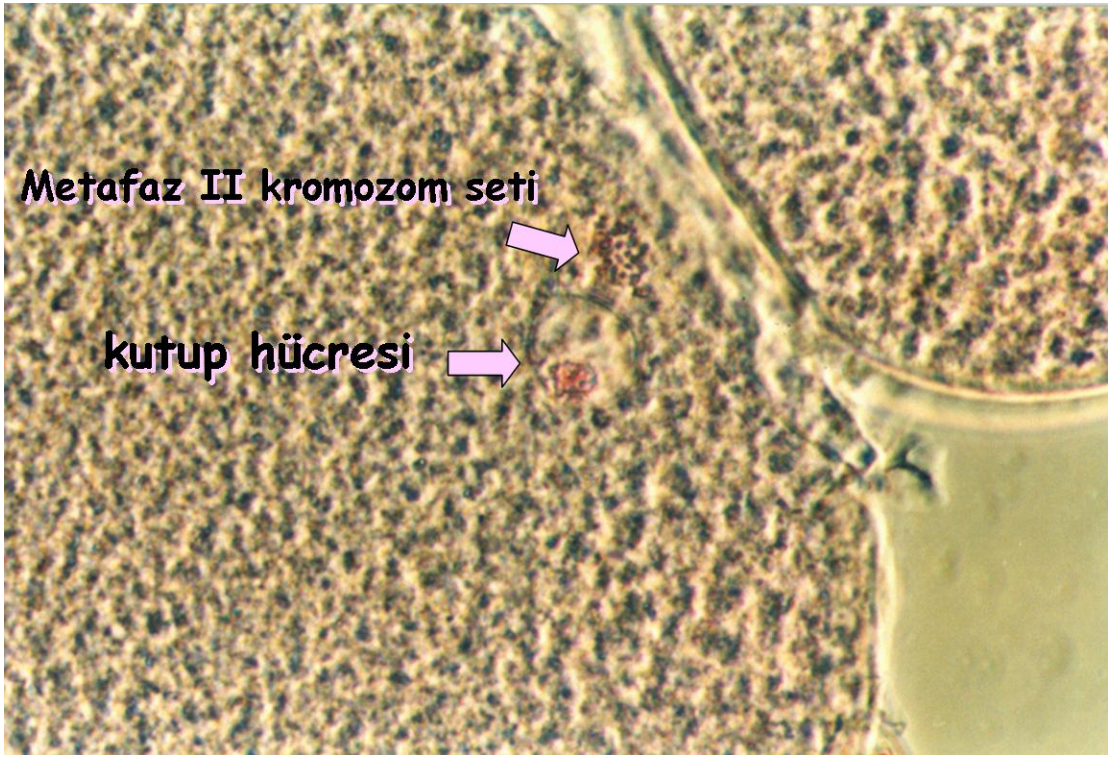
Telofaz I Aşamasındaki Oosit



Metafaz II Aşamasındaki Oosit



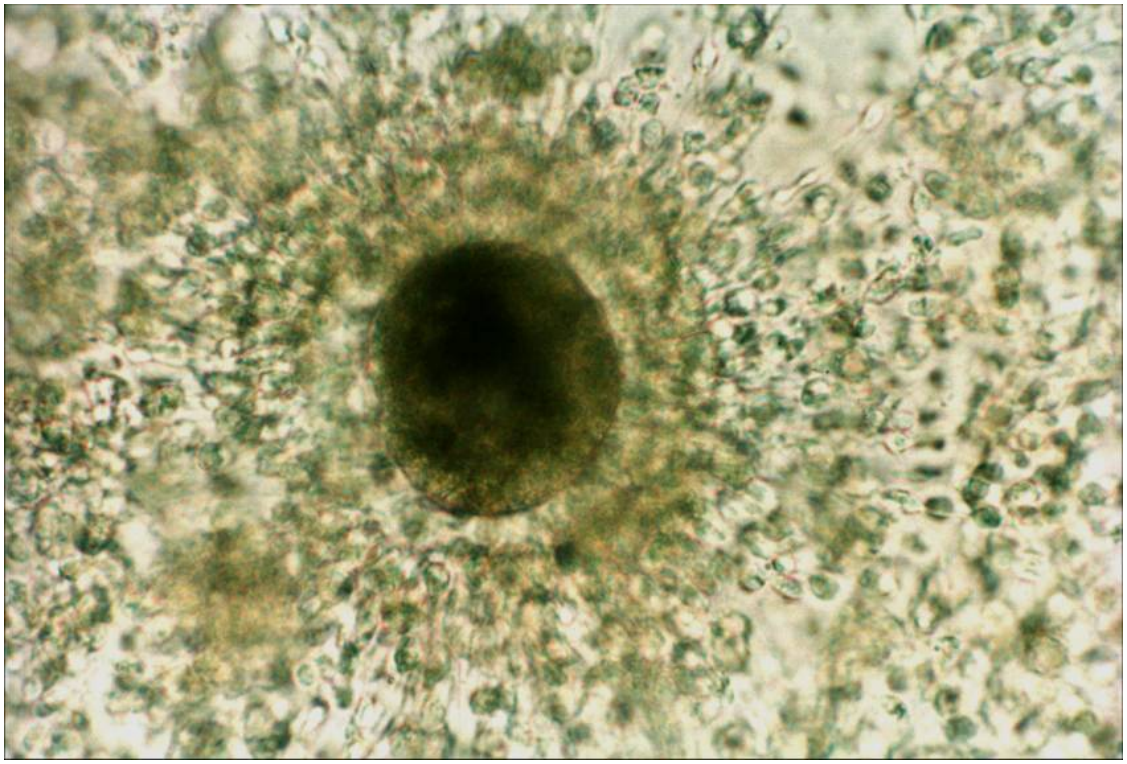
Metafaz II Aşamasındaki Oosit



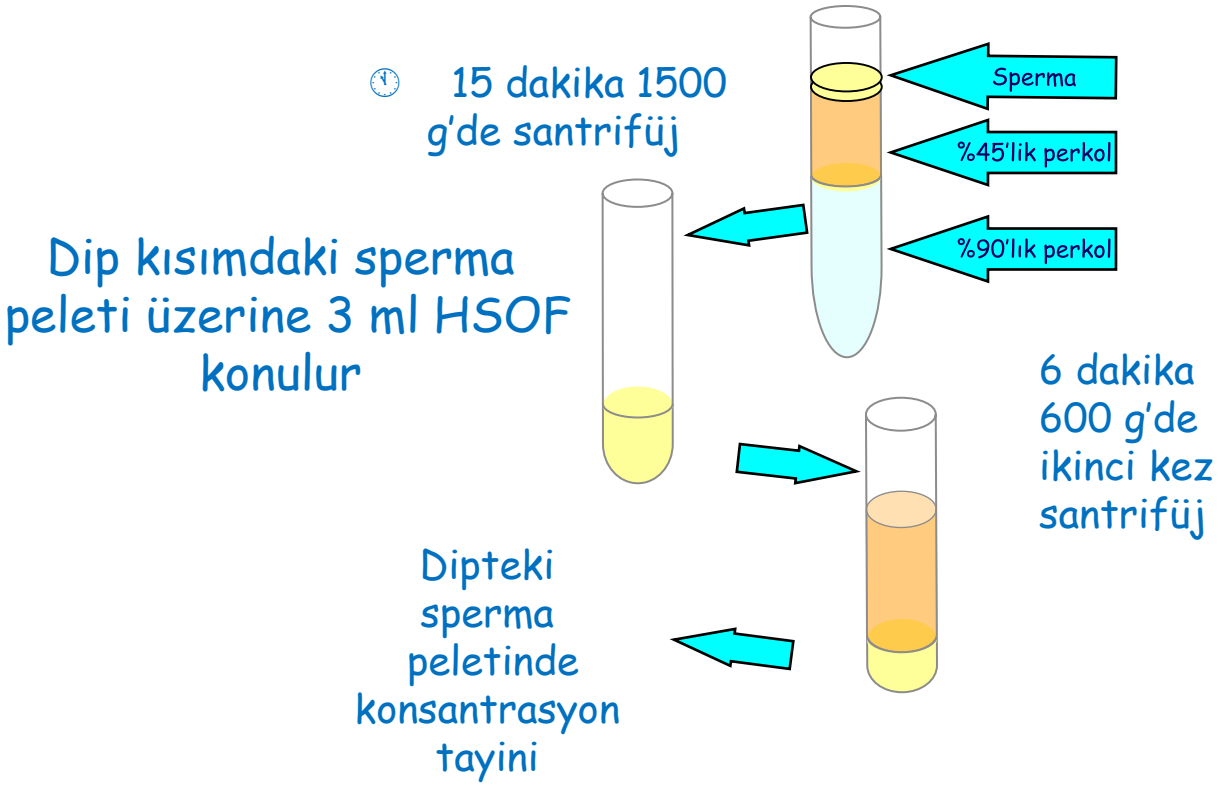
24 Saatlik Olgunlaşma Sonrası Kumulus Ekspansiyonu



Kumulus Ekspansiyonu Ve Kumulus Arasına Hiyaluronik Asit Depolanması

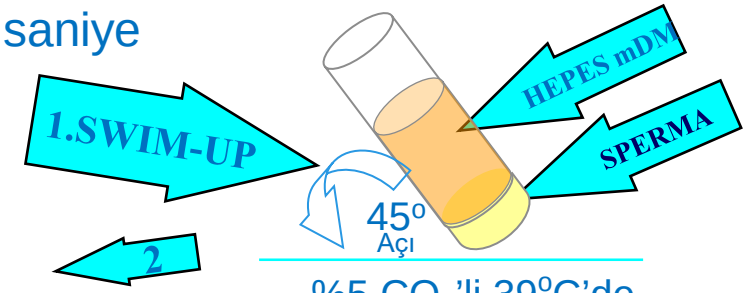


SPERMA HAZIRLIĞI



SPERMA HAZIRLIĞI

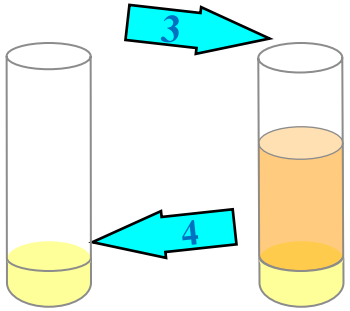
Sperma 37°C'de 30 saniye süre ile eritilir.



%5 CO_2'li 39°C'de inkübatörde 1 saat bekletilir

Üst taraftaki motil spermatozoonları içeren HEPES mDM alınır

- 10 dakika 350 g'de santrifüj

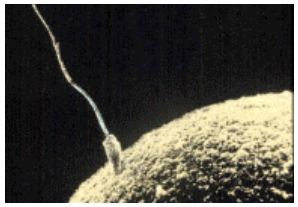


Dipteki sperma peletinin üzerine 5 ml sulandırıcı ekleyip

- 10 dakika 350 g'de ikinci kez santrifüj

Dip kısımdaki sperma peletinden YOĞUNLUK TAYİNİ

HEPARİNLE KAPASİTASYON



FERTİLİZASYON

%5 CO_2'li 39°C'lik İnkübatör
%100 Neme Doyurulmuş Ortam

Östrus koyun serumu

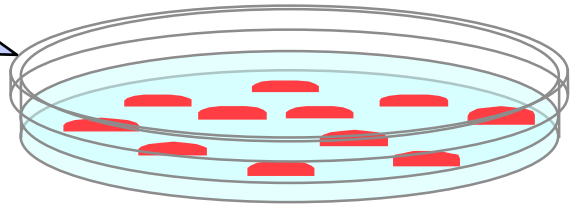
% 2

BSOF Medyumu

Motil Spermatozoon

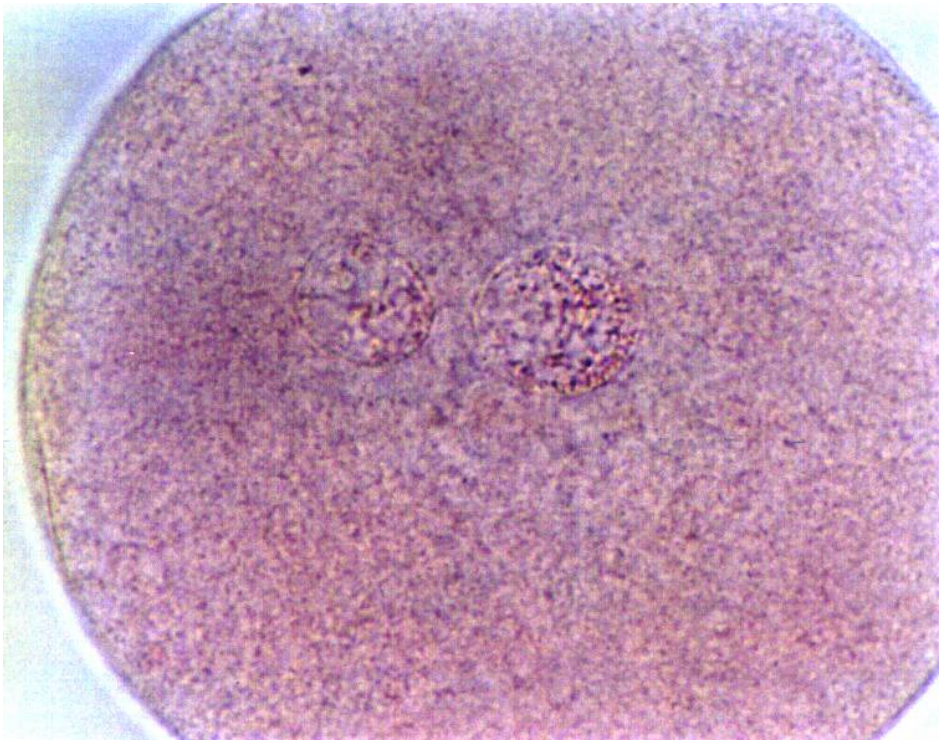
$0{,}8 \times 10^6$ / ml (final konsantrasyon)

Mineral yağ



İn Vitro Fertilizasyon 19-21 saat

Ferilizasyon Sonrası Pronükleus Gelişimi (Erkek Ve Dişi PN5)



Ferilizasyon Sonrası Pronükleus Gelişimi (Erkek Ve Dişi PN5)

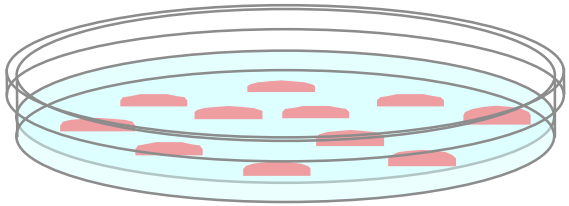


İN VİTRO KÜLTÜR

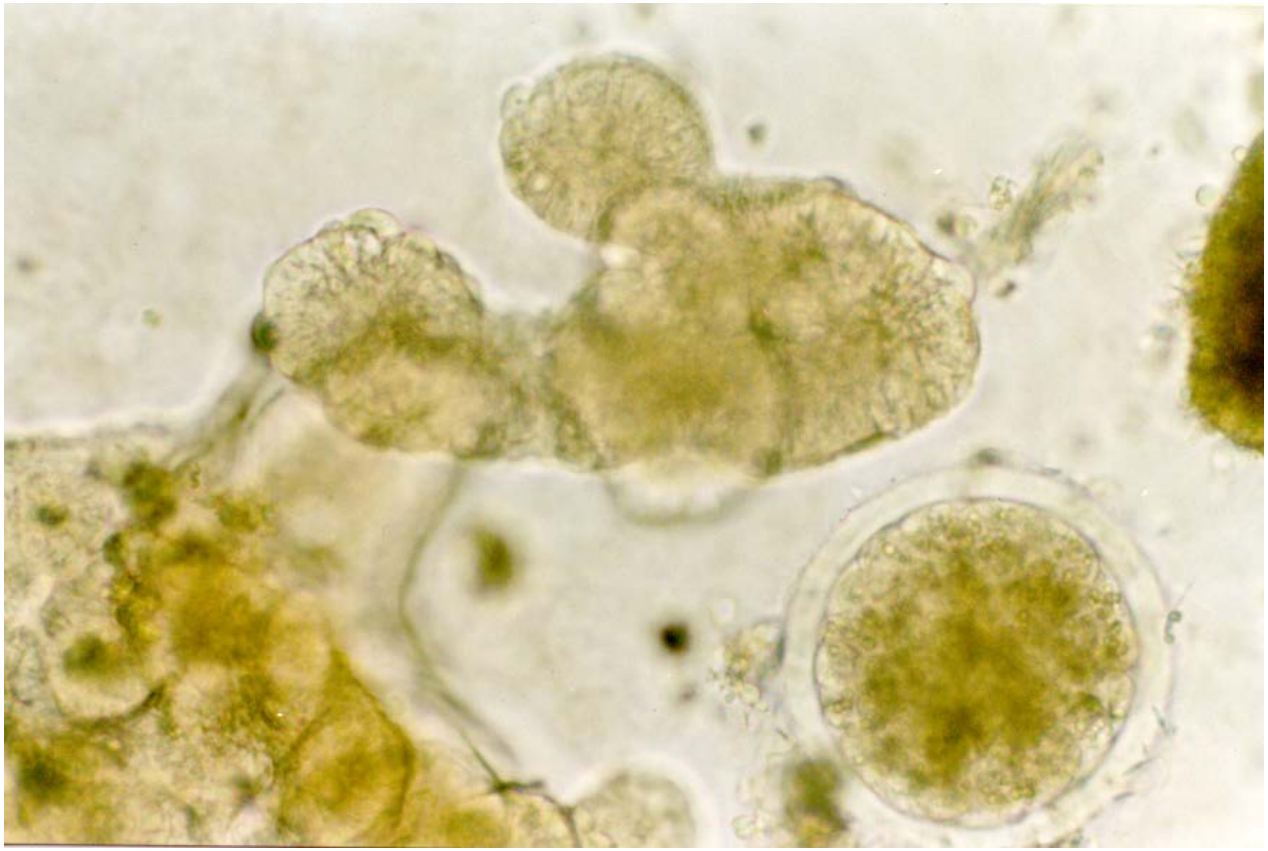
%5 CO_2,, %5 O_2 , %90 N_2 li 38,5°C'lik İnkübatör
%100 Neme Doyurulmuş Ortam

SOF + 4 mg/ml BSA

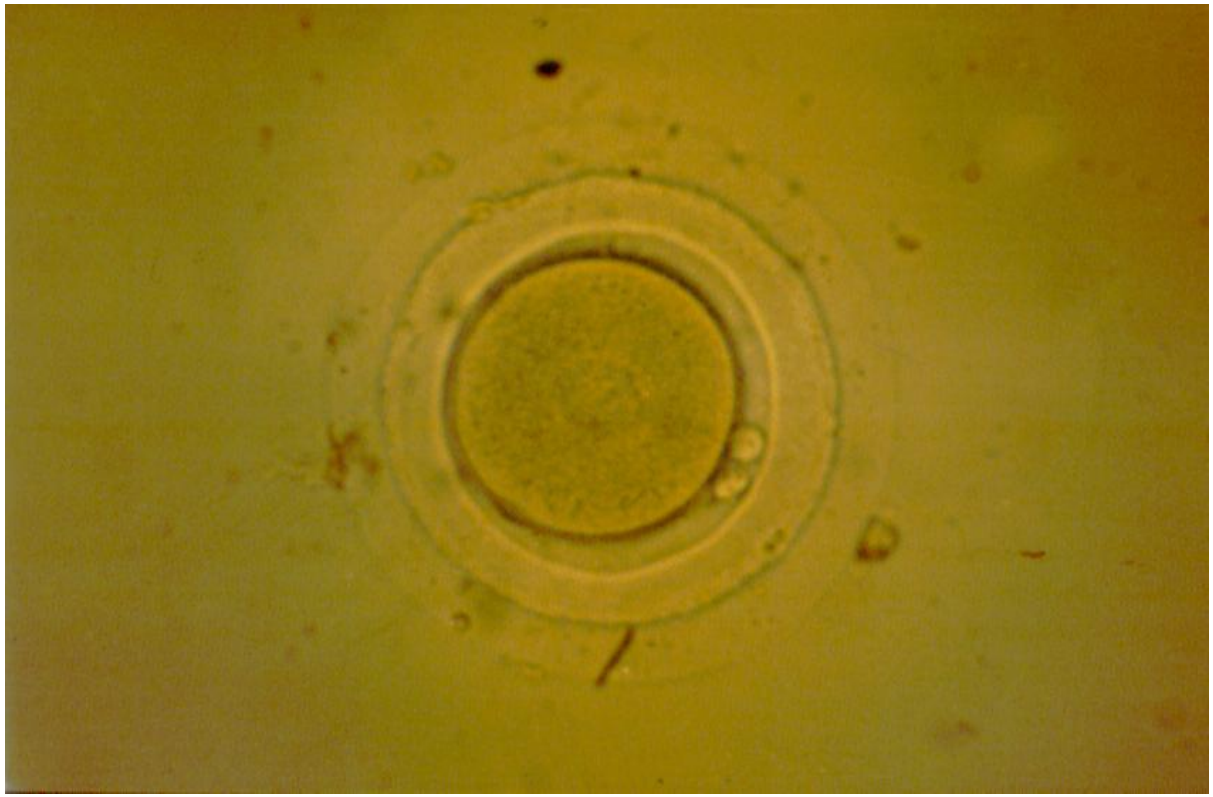
Kültürün 4. Günü 1.5 mMol glukoz ilavesi yapılır



Ovidukt epiteli ile embriyoların Ko-Kültürü



ZİGOT AŞAMASINDAKİ TAVŞAN EMBRİYOSU



İki Blastomerli Bir Embriyo



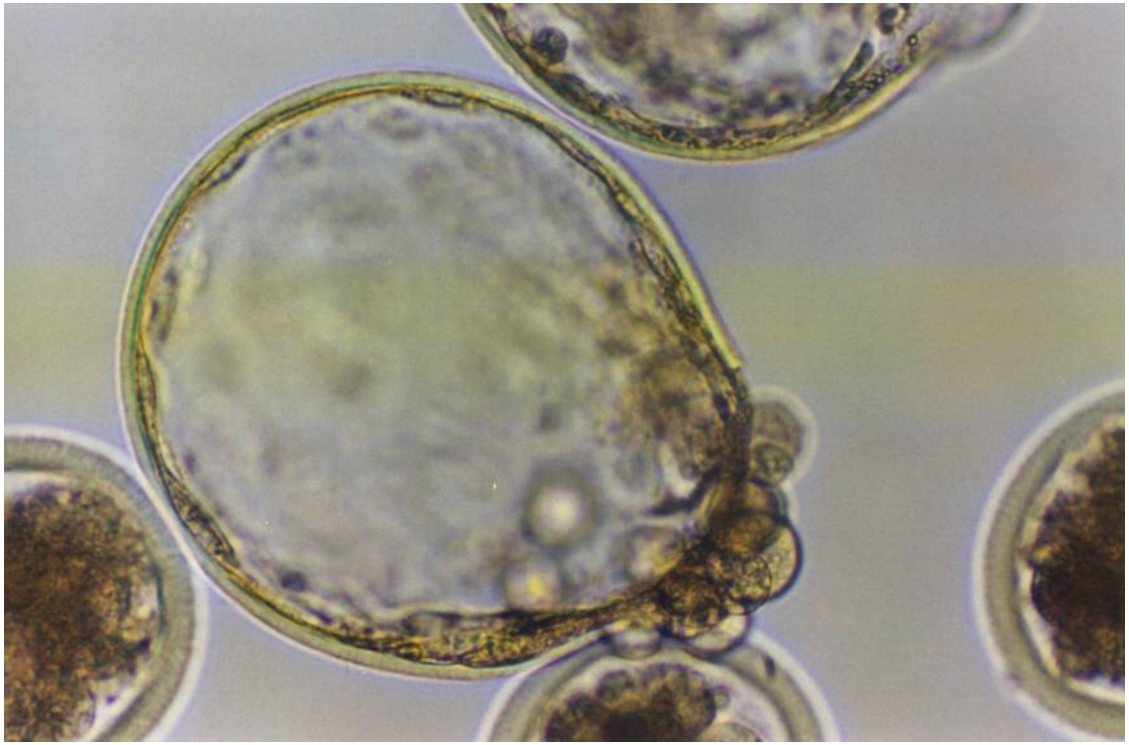
DÖRT BLASTOMERLİ TAVŞAN EMBRYOSU



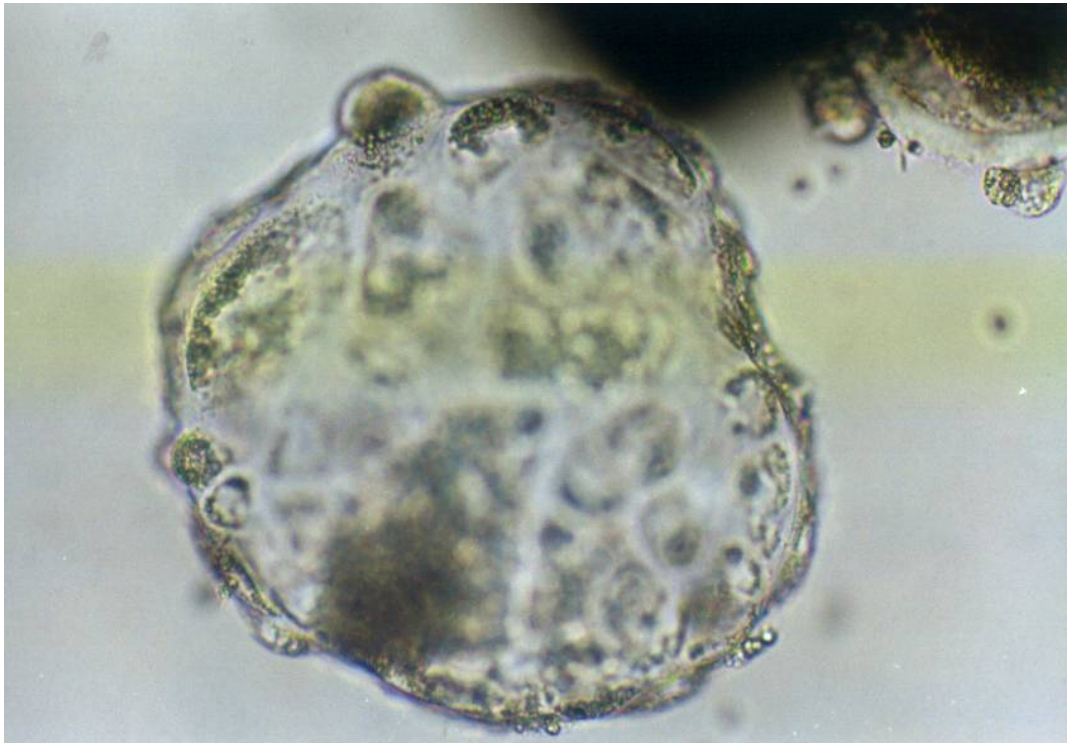
Kültürün 8. Günü 8 Blastomer Ve Morula Aşamasına Gelişen Embriyolar



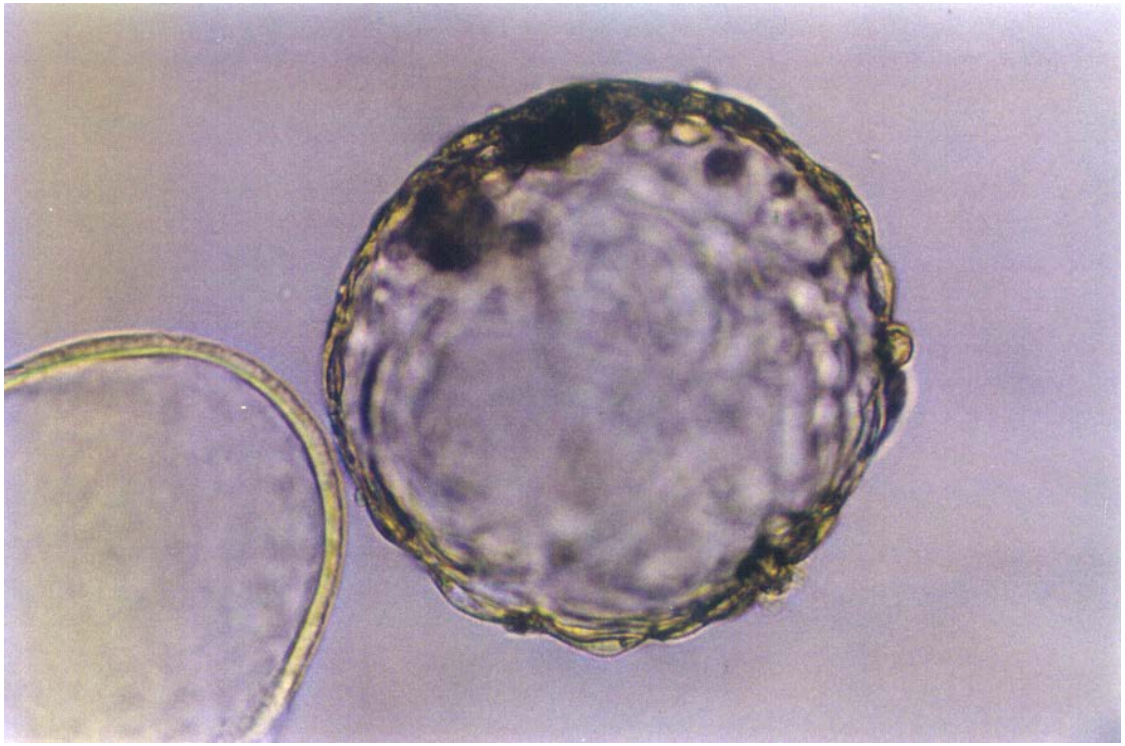
Kültürün 8. Günü Hatching(zonadan çıkan) Blastosist Aşamasına Gelişen Bir Embriyo



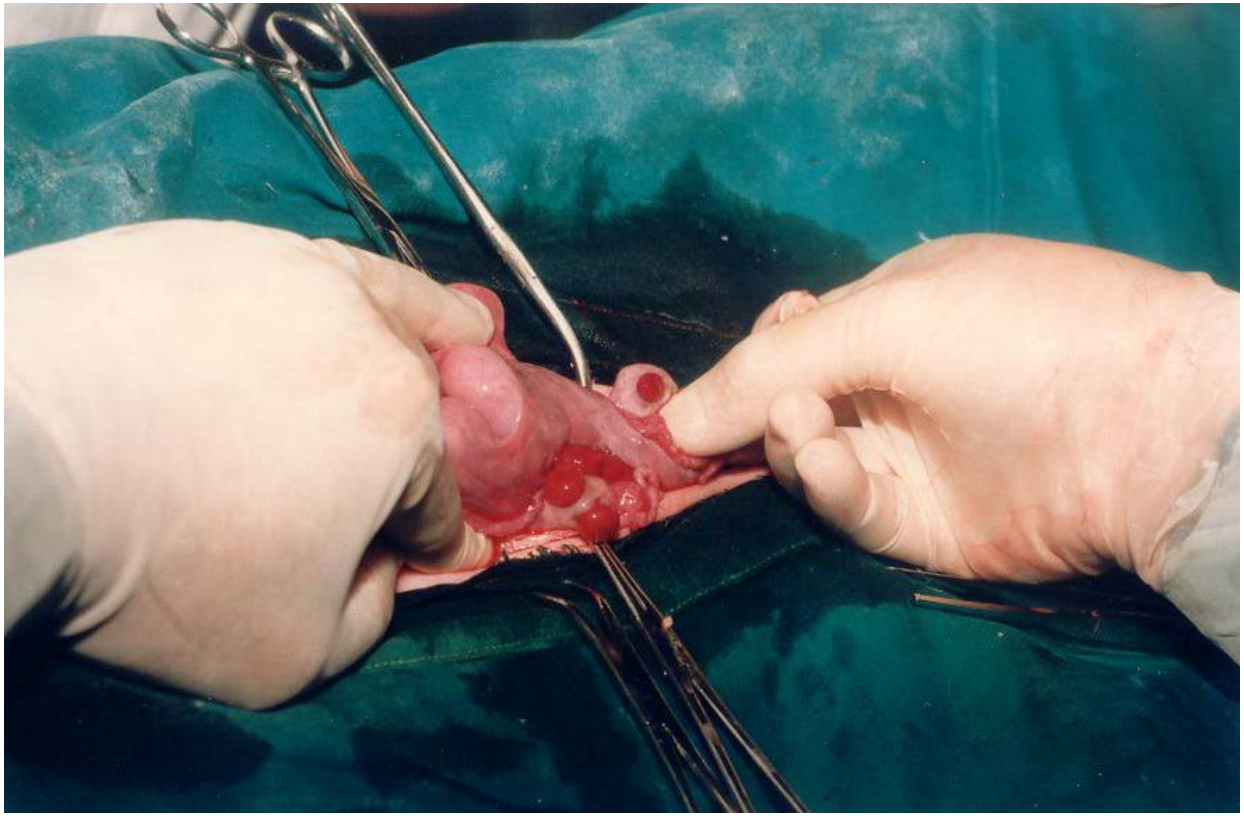
Kültürün 8. Günü Zonadan Çıkmış (Hatched) Bir Blastosist



Kültürün 8. Günü Zonadan Çıkmış (Hatched) Bir Blastosist ve Boş Zona



Senkronizasyon Sonucu Ovulasyon Şekillenmiş Ovaryum



Embriyoların Alıcı Koyunun Uterus Boşluğuna Transferi



Gebeliğin 45. Gününden Sonra Ultrason Bakısında Kotiledonların Görünümü



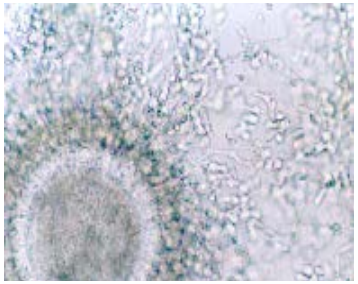
Gebeliğin 45. Gününden Sonra Ultrason Bakısında Yavrunun Görünümü



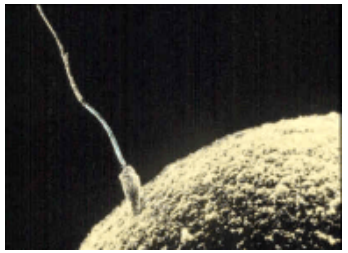
Doğan Kuzular ve Taşıyıcı Anneleri



Ovaryumların toplanması oosit kazanımı ve in vitro olgunlaştırma



in vitro fertilizasyon



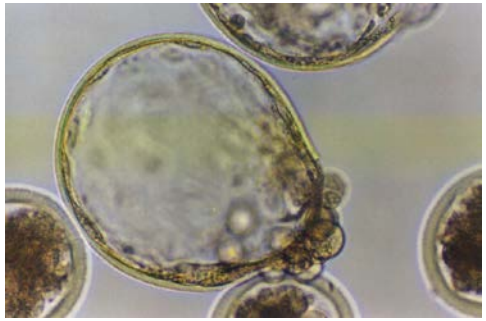




in vitro kültür



Transfer edilebilir embriyoların seçimi



Embriyoların alıcılara transferi

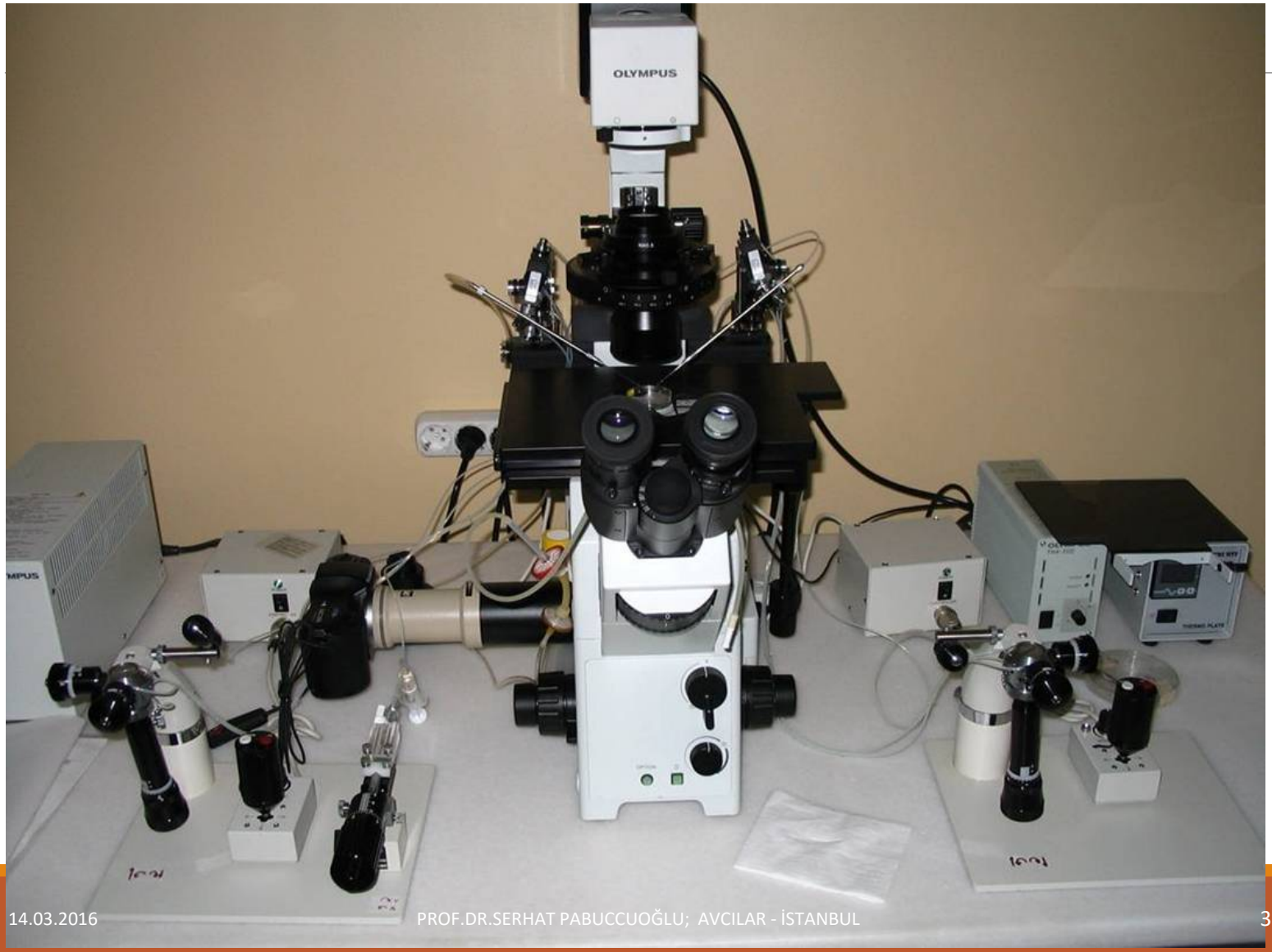


EMBRİYOLARDA MİKRO CERRAHİ İLE OLUŞTURULAN İKİZLİKLER

AMAÇ

Kazanılan embriyolardan daha fazla yavru elde etmek

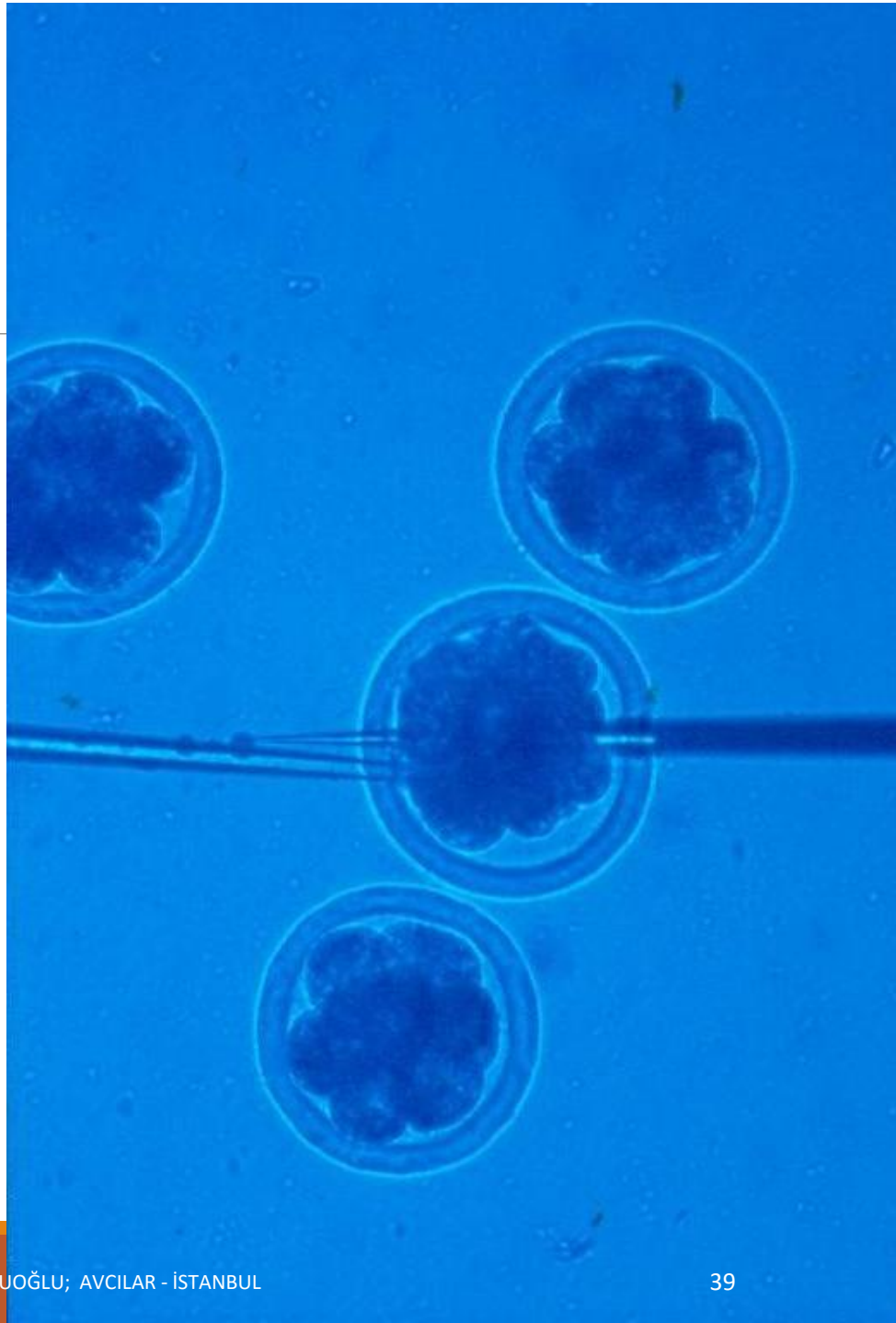
MİKROMANİPLATÖR



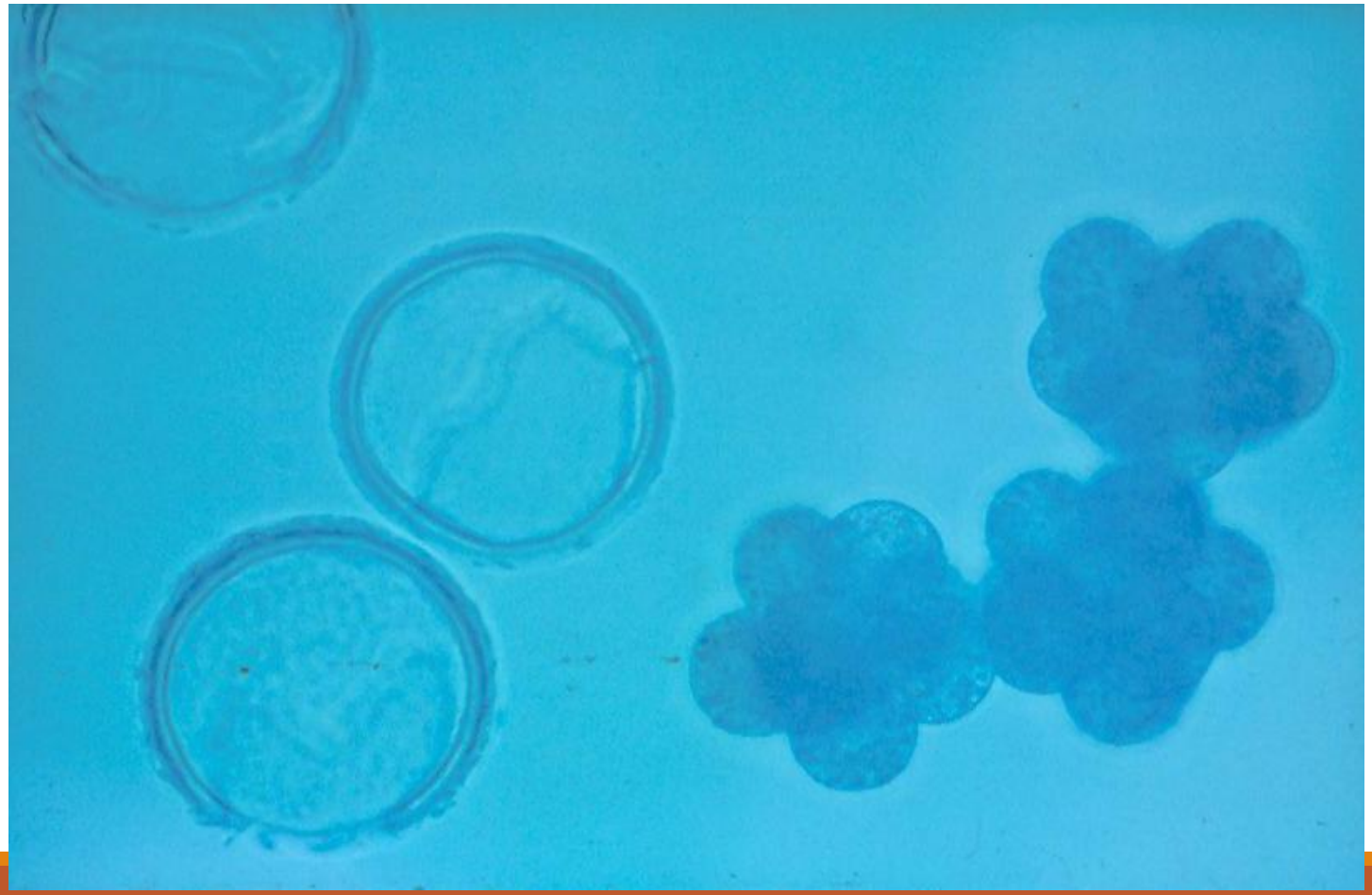
EMBRİYOLAR

MİKROCERRAHİ

YÖNTEMİ İLE İKİ VEYA DAHA FAZLA PARÇAYA AYRILIR



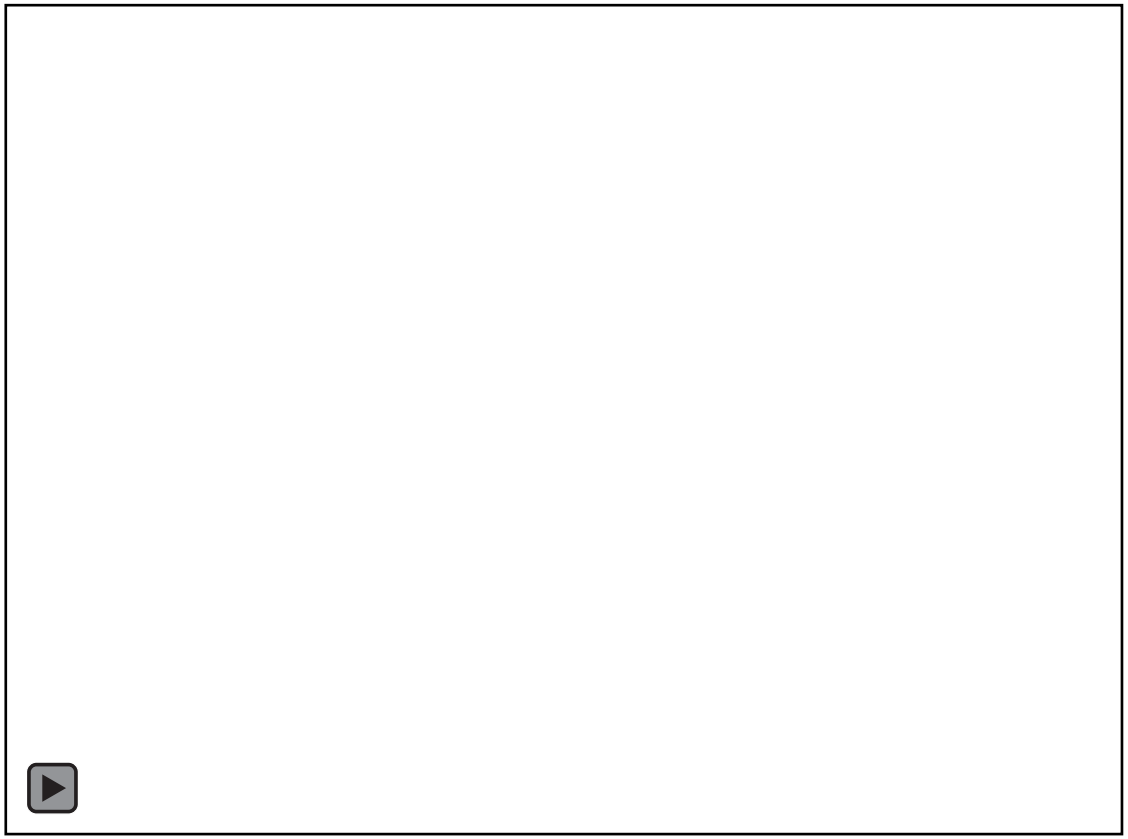
MİKROCERRAHİ İLE İKİYE BÖLÜNMÜŞ EMBRİYOLAR



MİKROCERRAHİ İLE BÖLÜNME SONRASI EMBRİYOLAR



Sığır Embriyosunun İkiye Bölünmesi



MİKROCERRAHİ İLE OLUŞTURULMUŞ İKİZLER



MİKROCERRAHİ İLE OLUŞTURULMUŞ İKİZ KUZULAR



MİKROCERRAHİ İLE OLUŞTURULMUŞ İKİZLER



EMBRİYOLARIN DONDURULMASI

Embriyoların Dondurulması Ne Amaçla Yapılır?

Kıymetli damızlıklardan elde edilen embriyoların daha uzun mesafelerde transportunu sağlayarak daha yaygın kullanımını sağlayabilmek.

Kıymetli damızlıklardan elde edilmiş embriyoların daha uzun süre saklanarak istenildiği anda transfer için kullanılabilmelerini sağlamak.

Hayvan ıslahında ve embriyo transferi uygulamalarının yaygınlaşmasını sağlamak.

Kıymetli damızlıkların veya soyu tükenmekte olan tür ve ırkların dondurulmuş materyallerin saklandığı bankalarda koruma altına alınmasını sağlamak.

Canlı hayvan transportu yerine dondurulmuş embriyoların bölgeye adapte taşıyıcılara transferi ile transport sonucu kayıpların önüne geçilmesini sağlamak.

Embriyoların dondurulması

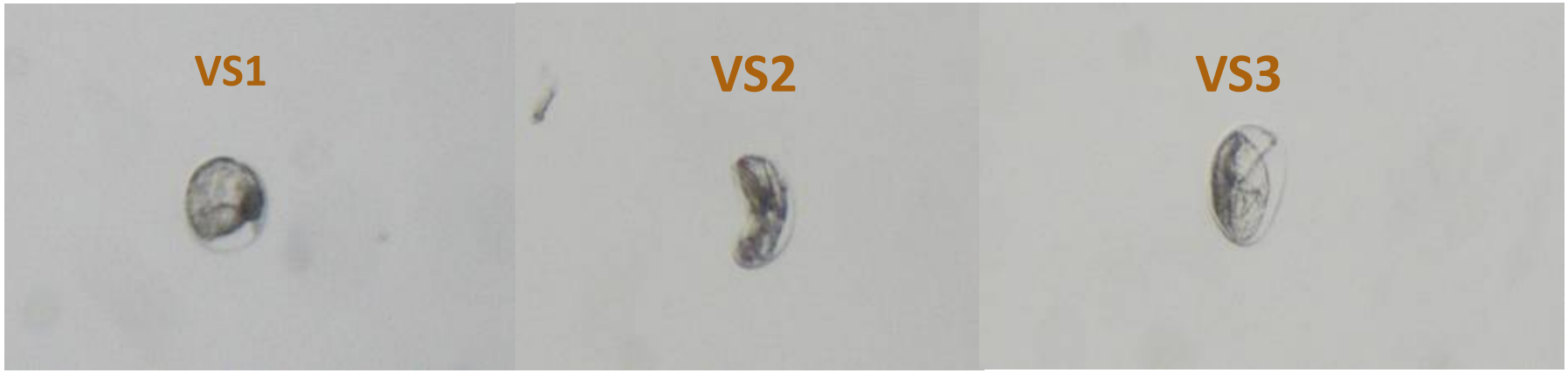
Kontrollu kademeli yavaş dondurma

- Morula - Blastosist aşaması arası embriyoların dondurulması için uygun bir yöntemdir.
- Düşük konsantrasyonlarda kryoprotektan kullanılır
- Cihaz donanım ihtiyacı vardır

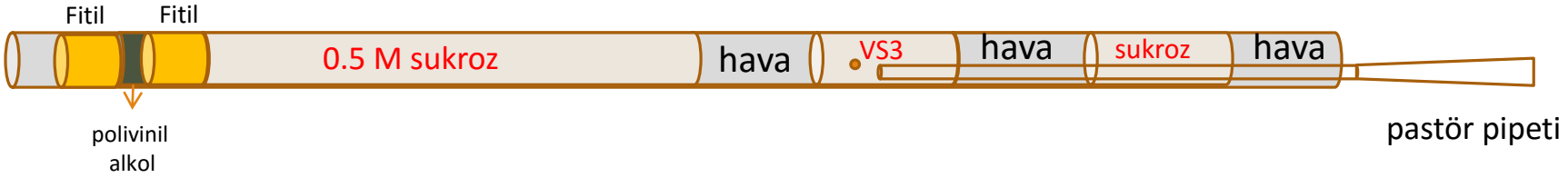
Vitrifikasyon

- Blastosist sonrası özellikle genişlemiş blastosisteler için idealdir
- Yüksek konsantrasyonlarda (toplam 7-8 M) kryoprotektan gerektirir ve kombinasyonlar kullanılır
- Cihaz donanım ihtiyacı olmayan basit bir yöntemdir

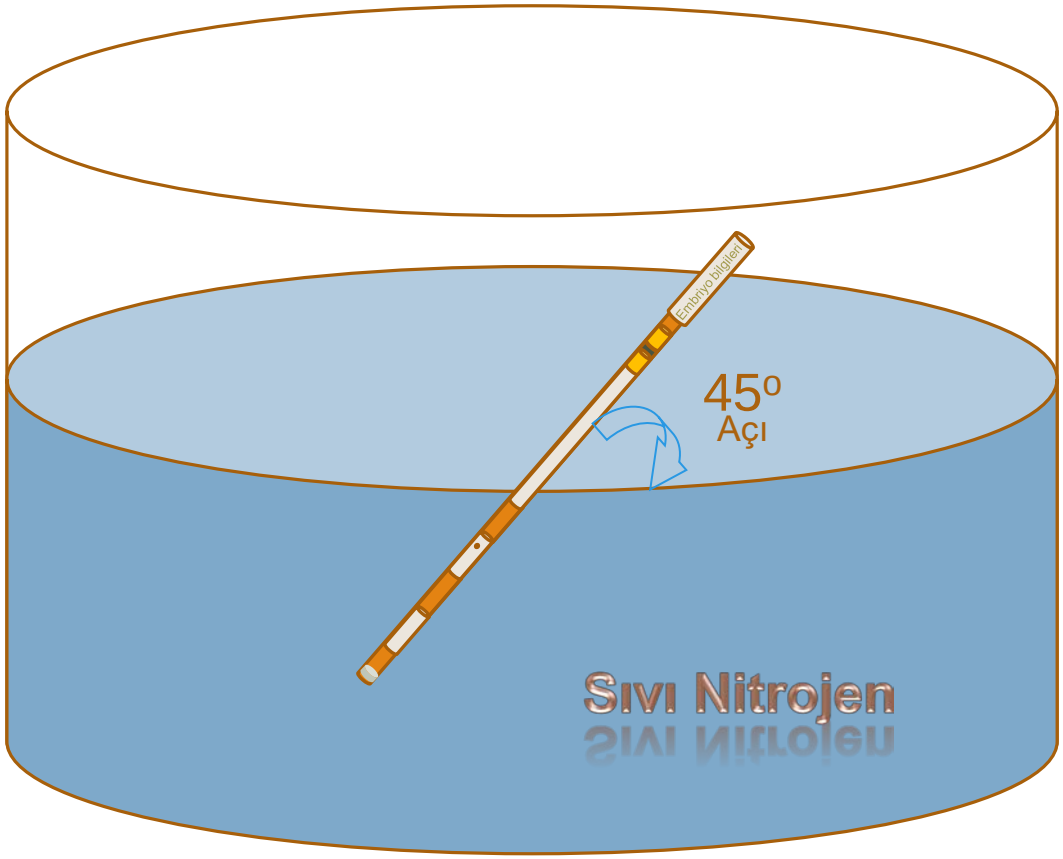
Vitrifikasyon işlemi sırasında embriyolarda gözlenen değişimler



Embriyonun vitrifikasyon için payete yüklenmesi



Embriyo Yüklenmiş Payetin Sıvı Nitrojene Daldırılışı



EMBRİYOLARDA CİNSİYETİN KONTROLU VE TAYİNİ

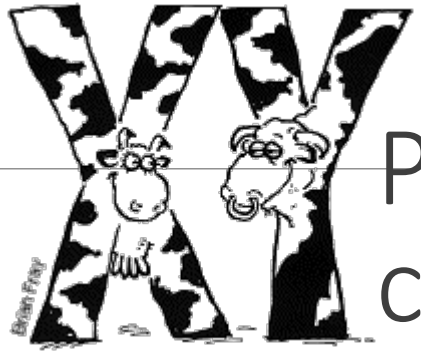
Embriyolarda cinsiyetin belirlenmesi

1. Biyopsi tekniği uygulanarak alınan materyalde kromozom eşleştirme ile (karyotiping)
2. Biyopsi tekniği uygulanarak alınan materyalde PZR tekniği kullanılarak Y kromozomuna özel bölgelerin çoğaltılarak örneklerde bu bölgelerin belirlenmesi
3. Floresan işaretlenmiş HY antijenine spesifik antikorlarla erkek embriyoların belirlenmesi

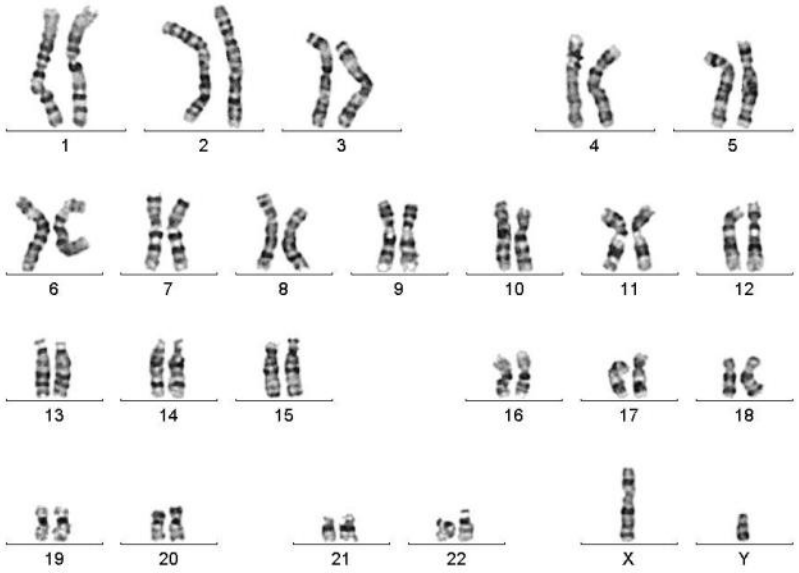
Embriyolarda blastomer ve trofoblast biyopsisi

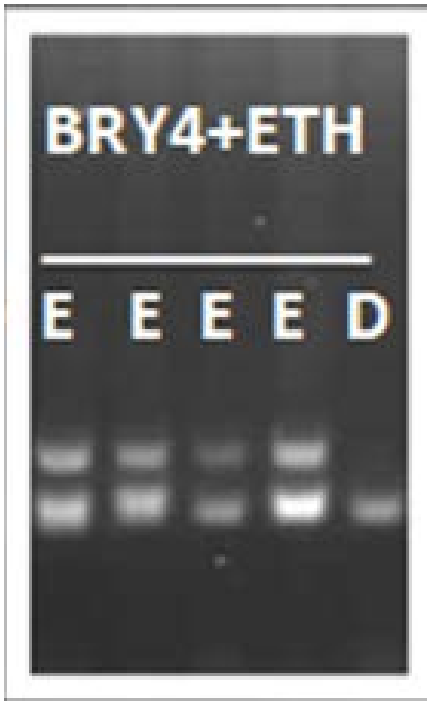


Karyotipleme (insan örnek)



PZR tekniği ile cinsiyet tayini





SPERMADA CİNSİYETİN KONTROLU ve BELİRLENMESİ (SEXING)

AMAÇ

Suni Tohumlamadan doğacak olan yavrunun cinsiyetini gebelik öncesi kontrol altına alabilmek ve yetiştiriciye %90-95 oranında dişi yavru elde edebilme şansını sağlamak

Spermada cinsiyetin kontrolu



Spermanın alınması

Spermanın değerlendirilmesi

Vital Floresan DNA boyası ile spermatozoanın işaretlenmesi

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)
Başarı: %90-95

X ve Y taşıyan spermatozoanın ayrıştırılması (FACS)

