

Yerli Kara Düvelerde Farklı Süperovulasyon Protokolleri ile Elde Edilen Cevapların Araştırılması*

Muharrem Satılmış¹, Numan Akyol², Sedat Hamdi Kızıl¹, Tahir Karavaşahin³

¹ Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Lalahan-Ankara

² Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kırıkkale

³ Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Aksaray

Geliř Tarihi / Received: 14.04.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 17.05.2017

Özet: Sunulan çalışmanın amacı, süperovulasyon uygulamalarına yanıtı düşük olan Yerli Kara düvelerde, farklı FSH protokolleri ile oluşturulan uygulamaların süperovulasyon etkinliğine yönelik sonuçlarının incelenmesidir. Çalışmada kullanılan 24 baş Yerli Kara düve, rastgele seçilerek dört gruba ayrılmış ve dört farklı süperovulasyon protokolü gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda, tespit edilen korpus luteum (CL) sayıları üzerine farklı süperovulasyon protokollerinin etkinliği görülmemiştir ($P>0.05$). Eksojen progesteron uygulanmamış grupta (G1), fertilize olmamış oosit (UFO) oranları diğerlerine göre daha yüksek (%43.8) bulunmuştur ($P<0.01$). Dördüncü grupta (G4) ise diğer gruplara göre daha yüksek oranda embriyo (%72.7) elde edilmiştir ($P<0.001$). Sonuç olarak Yerli Kara düvelerde uygulanan farklı süperovulasyon protokollerine rağmen yeterli düzeyde cevap gelişmediği gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Eksojen progesteron, Embriyo, FSH, Süperovulasyon, Yerli Kara.

The Investigation of Superovulation Responses with Different Protocols in Anatolian Native Black Heifers

Abstract: The aim of the presented study was to investigate the effects of different superovulation programs on the superovulation results for Anatolian Black cows responding to superovulation applications in low rate. In this study, 24 Anatolian Black cows were randomly divided into four groups, each group was subjected to a different superovulation protocol. As regards the determined CL numbers, there was not effectiveness of different superovulation protocols ($P>0.05$). The protocol without exogenous progesterone application resulted in higher rate of unfertilized oocytes UFO (%43.8), compared to other protocols ($P<0.01$). FSH application in low doses gave the high embryo yield (%72.7) in comparison to the other protocols ($P<0.001$). As a result it was observed that the superovulation responses were not at adequate level despite the different superovulation protocols applied in Anatolian native black heifers.

Key words: Exogenous progesterone, Embryo, FSH, Superovulation, Anatolian native black.

Giriş

İnsanlar, temel yaşam ihtiyaçlarını önemli bir oranını doğrudan ya da dolaylı olarak evcil hayvanlardan karşılamaktadır [15]. Dünya üzerinde yaşayan pek çok hayvan türü uzun süredir yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Bunun sonucunda da hayvansal genetik çeşitlilik zamanla yok olmaktadır. Binlerce yıl boyunca buldukları bölgelere adapte olmuş ırkların son yüzyılda yeryüzünden yokolma tehlikesi artarak devam etmektedir [14]. Bazı araştırcılar sığır ırklarının %16'sının yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olduğunu bildirmişlerdir [9]. Hayvancılık açısından, genetik çeşitliliğin azalması neticesinde adaptasyon yeteneği düşük ırklar sayıca önemli oranda artış göstermiştir. Avrupa kıtasında

sığırların %60'ı kökenlerini Holstein Freisian ırkından almaktadır [13]. Genetik çeşitliliğin korunması buldukları koşullara adapte olmuş hayvanların her ne kadar düşük verim kapasitesine sahip olsalar da ileride heterozis gibi genetik özelliklerden faydalanmak amacıyla lokal ırkların kullanılmasını sağlayacaktır [18, 19]. Bu bakımdan soyu tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kalan pek çok ırk korunmaya çalışılmaktadır. [18]. Yeni eksitu muhafaza stratejilerinin geliştirilmesiyle birlikte yeniden sürü oluşturmak için gamet, embriyo ve diğer hücre/dokuların dondurularak saklanması söz konusu olmuştur [20]. Bu amaçla jenerasyonlar arası süreyi kısaltan embriyo transferi gibi yardımcı üreme teknikleri büyük önem kazanmaktadır ve dolayısıyla

* TURKHAYGEN-1 (106G005) projesi çerçevesinde TÜBİTAK tarafından finanse edilmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: Dr. Muharrem Satılmış, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Lalahan - ANKARA E-posta: satilmis96@hotmail.com

dondurarak embriyo saklamak bu amaç için en iyi yol olarak gösterilmektedir [2, 16].

Yerli Kara ırkı sığırlar orta ve iç Anadolu'da yaşayan ve sert çevre koşullarına adaptasyon sağlamış verimleri düşük hayvanlardır. Soyları tükenmeye yüz tutmuş olduğundan ulusal koruma programı çerçevesinde Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı kontrolünde korumaya alınmışlardır [21, 22]. Embriyo transferi, genellikle süperovulasyon programlarıyla birlikte uygulanarak transfer edilebilir embriyo sayısının artırılmasıyla gerçekleştirilir. Ancak pek çok kimyasal ve fizyolojik unsur süperovulasyonun başarısına etki eder [1]. Günümüzde süperovulasyon amacıyla yaygın olarak 4-5 gün süreyle günde iki defa olmak üzere, ham hipofiz ekstraktı veya kısmen saflaştırılmış hipofiz ekstraktları, folikül sitümlasyonunu sağlamak amacıyla azalan dozlar şeklinde kullanılmaktadır. Folikül Stimüle edici Hormon (FSH) dozları, uygulanan hayvan türlerine göre oldukça farklılık gösterir. Doğru dozu uygulamak süperovulasyonda alınan cevabı da doğrudan etkilemektedir [8].

Ulusal koruma programına dâhil edilen bu hayvanların daha etkin muhafazası için bu ırktan elde edilen embriyo sayı ve kalitesinin de artırılması gerekmektedir. Bu çalışmayla Yerli Kara ineklerde farklı süperovulasyon protokolleri uygulanarak bu hayvanların süperovulasyona cevapları incelenmiş ve en uygun süperovulasyon protokolü tespit edilmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada 2-4 yaşlı, 200-250 kg canlı ağırlığa sahip, 24 baş Yerli Kara düve kullanılmıştır. Süperovulator

hormon olarak 400 mg Folltropin-V (Bioniche Animal Health Canada Inc) 1.56 g progesteron içeren Cue-Mate (Bioniche – Animal Health), senkronizasyon amacıyla Estrumate (Intervet Schering-Animal Health) ve uterus yıkaması için %1 buzağı serumu (Sigma, N4762- USA) ve 250 mg kanamisin sülfat (Kanavet - Vetaş) ilave edilmiş 1000 ml laktatlı ringer solüsyonu (Eczacıbaşı) kullanılmıştır. Hayvanlar her grupta altı düve olacak şekilde rastgele dört gruba ayrılmış ve her gruba farklı FSH dozları ve farklı protokoller uygulanmıştır. Eksojen progesteron uygulanmayan grup (G1) aynı zamanda kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Her süperovulasyon protokolü gruplarda bir kez uygulanmıştır. Gruplar arası fark olup olmadığı Varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiş, farklılık gözlenen grupların karşılaştırması Tukey testi ile yapılmıştır.

Gruplar

1. Grup (G1-Kontrol)

Bu gruptaki hayvanlar östrus gözlem esasına göre progesteron uygulanmaksızın süperovulasyon programına alınmıştır. Programa alınan hayvanlara prostaglandin enjeksiyonu yapılarak 48 saat sonra östrus takibi yapılmış ve enjeksiyonu takiben 9. gün ultrason ile korpus luteum (CL) kontrolü yapılarak östrus gözlenen ve CL tespiti yapılan hayvanlara 11. gün FSH enjeksiyonlarına başlanmış, toplam 14 ml = 280 mg (2.5 ml / 2.5 ml – 2 ml / 2 ml – 1.5 ml / 1.5 ml – 1 ml / 1 ml) azalan dozlarda sabah ve akşam olmak üzere dört gün boyunca i.m. FSH enjeksiyonu uygulanmıştır. 15 ve 16. gün suni tohumlamaları ve 22. gün uterus yıkamaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 1).

PROTOKOL 1						
PGF2α		PGF2α				Sabah
Östrus gözlemi		↓				Uterus yıkaması
		FSH				
0	2	11	12	13	14	15 16
						22. Günler
						Akşam

Şekil 1. Östrus gözlemi esasına göre uygulanan süperovulasyon protokolü

2. Grup (G2)

Hayvanlarda östrus gözlemlenmeksizin intravaginal progesteron (Cue-Mate) uygulaması ile süperovulasyon programına başlanmıştır. Toplam 20 ml =

400 mg FSH sabah - akşam olmak üzere azalan dozlarda 4 gün boyunca i.m. enjeksiyon uygulanmıştır (4 ml / 4 ml – 3 ml / 3 ml – 2 ml / 2 ml – 1 ml / 1 ml). 15 ve 16. gün suni tohumlamaları ve 22. gün uterus yıkamaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 2).

PROTOKOL 2									
	PGF2 α						Sabah		
	FSH			ST			Uterus yıkaması		
İntravaginal Progesteron									
0	7	8	9	10	11	12	22.	Günler	
			↑					Akşam	
Progesteron uzaklaştırma									

Şekil 2. Toplam 400 mg dozda 4 gün boyunca FSH ve eksojen progesteron uygulanan protokol

3. Grup (G3)

Hayvanlara intravaginal progesteron (Cue-Mate) uygulaması ile birlikte 5 mg östradiol valerat ve 3 mg norgestomet asetat enjeksiyonu yapılmıştır. Toplam 24 ml = 480 mg FSH, intravaginal progesteron uygulamasını takip eden 5. gün sabah akşam olmak üzere azalan dozlarda i.m. enjeksiyon şeklinde üç gün boyunca (5 ml / 5 ml – 4 ml / 4 ml – 3 ml / 3 ml) uygulanmıştır (Şekil 3).

teron uygulamasını takip eden 5. gün sabah akşam olmak üzere azalan dozlarda i.m. enjeksiyon şeklinde üç gün boyunca (5 ml / 5 ml – 4 ml / 4 ml – 3 ml / 3 ml) uygulanmıştır (Şekil 3).

PROTOKOL 3									
Östr. Val.+ Progest.	PGF2 α						Sabah		
	FSH			ST			Uterus yıkaması		
Progesteron implantı									
0	5	6	7	8	9	10	16.	Günler	
			↑					Akşam	
Progesteron uzaklaştırma									

Şekil 3. Toplam 480 mg dozda 3 gün boyunca FSH ve eksojen progesteron uygulanan protokol

4. Grup (G4)

Bu gruptaki hayvanlarda süperovulasyon programına, östrus gözlenmeksizin intravaginal progesteron (Cue-Mate) uygulaması ile başlanmıştır. Toplam

14 ml = 280 mg FSH olarak ve sabah - akşam i.m. enjeksiyon şeklinde azalan dozlarda 4 gün boyunca (2.5 ml / 2.5 ml – 2 ml / 2 ml – 1.5 ml / 1.5 ml – 1 ml / 1 ml) uygulanmıştır (Şekil 4).

PROTOKOL 4									
Östr. Val.+ Progest.	PGF2 α						Sabah		
	FSH			ST			Uterus yıkaması		
Progesteron implantı									
0	7	8	9	10	11	12	18.	Günler	
			↑					Akşam	
Progesteron uzaklaştırma									

Şekil 4. Toplam 280 mg dozda 4 gün boyunca FSH ve eksojen progesteron uygulanan protokol

Bulgular

Yerli Kara ırkı düvelerde farklı süperovulasyon programlarının denendiği bu çalışmada, istatistikî önemde olmasa da G3 grubunda (24 ml FSH) en fazla CL tespit edilmiş ancak transfer edilebilir embriyo en az FSH (14 ml) uygulanan grupta (G4) önemli düzeyde yüksek ($P<0.001$) bulunmuştur. Eksojen progesteron uygulanmayan grupta (G1-Kontrol), eksojen progesteron uygulanan grupta

(G2, G3 ve G4) göre önemli düzeyde (%43.8) ($P<0,01$) döllenenmiş oosit (UFO) elde edilmiştir. Eksojen progesteron uygulanan grupta elde edilen CL açısından bir fark gözlenmezken, transfer edilebilir embriyo oranı bakımından G4'ün diğerlerine kıyasla yüksek olduğu görülmüştür ($P<0.001$). UFO ve transfer edilebilir embriyo dışında alınan dejeneren embriyo ve düşük kalite embriyolar aynı sütunda değerlendirilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Gruplarda elde edilen CL, transfer için uygun olmayan ve transfer edilebilir embriyo sayısı ve oranları

GRUPLAR	CL ($\bar{X}\pm S\bar{X}$)	UFO (%)	Transfer için uygun olmayan embriyo (%)	Transfer edilebilir embriyo (%)
G1	4.00±0.95	31.3 (5/16)b	43.8 (7/16)b	25.0 (4/16)a
G2	4.75±1.32	84.2 (16/19)a	5.3 (1/19)a	10.5 (2/19)a
G3	7.50±2.50	60.0 (9/15)a	6.7 (1/15)a	33.3 (5/15)a
G4	5.50±1.50	18.2 (4/22)b	9.1 (2/22)a	72.7 (16/22)b
P	-	*	*	**

Sütunlardaki farklı rakamlar istatistiki açıdan önemlidir (*: P<0.01, **:P<0.001)

Tartışma ve sonuç

Günümüzde kültür ırklarında uygulanan süperovulasyon protokolleri rutin hale gelmiş ve elde edilen sonuçlar ve beklentiler kısmen standartlaşmış olmasına rağmen, yerel ırklara özgü süperovulasyon protokolleri ve FSH dozlarıyla ilgili çalışmalar yapılmasına ihtiyaç olduğu açıktır. Östrus senkronizasyonu ve süperovulasyon programlarıyla ilgili olduğu bilinen süperovulasyona karşı gelişen cevaplar hala geniş bir varyasyon göstermektedir. Bazı yerel ırkların süperovulasyon programlarına yanıtları yeterli düzeyde iken, bazıları böyle bir potansiyelden yoksun olabilmektedir [3, 6, 7, 17]. Yerel ırkların donör olarak kullanıldığı bazı çalışmalarda 11 ila 22 arasında CL elde edilen hayvanlar için süperovulasyon cevabı açısından değerli bir potansiyel taşıdıklarını ifade eden araştırmacılar, uygun süperovulasyon protokollerinin seçimiyle daha yüksek sonuçlar alınmasının mümkün olabileceğini bildirmişlerdir [5, 11].

Bu çalışmada, Kontrol grubu G1, G2, G3 ve G4'te sırasıyla %68.8, %67.9, %43.3 ve %66.7 embriyo toplama oranı elde edilmiştir. Bu oranlar diğer çalışmalarda elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir [10]. Embriyo toplama başarısında, teknik eleman becerisinden, kullanılan hayvanın anatomisine kadar değişik birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir.

Sunulan çalışmada Yerli Karalarda ovule olmamış folikül sayısının düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. G2'de bir düvede iki ve G3'te bir düvede bir adet ovule olmamış foliküle rastlanmıştır. Total olarak %2.9 oranında ovule olmamış folikül tespit edilmiş olup bu oran diğer benzeri çalışmalarla uyumludur. Kaldı ki eksojen progesteron ile birlikte östradiol uygulamalarının dominant folikül oluşu-

munu baskıladığı bilinmekle birlikte bunun mekanizması net olarak aydınlatılmış değildir [4].

Bu çalışmada elde edilen transfer edilebilir embriyo oranı gruplarda %10.5 ila %72.7 arasında değişim göstermektedir. Genel olarak bütün hayvanlardan elde edilen transfer edilebilir embriyo oranı %37.5 olarak gerçekleşmiştir. Bu oranın diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu söylemek mümkündür. Bo ve arkadaşları çeşitli protokolleri denedikleri çalışmalarında %37 ila %50 arasında transfer edilebilir embriyo elde ettiklerini bildirmişlerdir [4]. Hayvan başına elde edilen transfer edilebilir embriyo miktarı olarak ele alındığında birey başına 1.12 transfer edilebilir embriyo elde edilmiştir. Bu oranın kültür ırklarında birey ve süperovulasyon başına 4.5-5 olduğu [1] düşünüldüğünde düşük düzeyde kaldığı görülmektedir. Colazo ve arkadaşlarının [12] vurguladığı gibi Yerli Kara ırkının süperovulasyona verdiği cevap açısından bu hayvanlarda bu anlamda düşük bir potansiyel olduğu söylenebilir. Bos indicuslarda 30 yılı aşkın zamandır yapılan çalışmaların ardından ovaryum ve foliküler dinamiğin büyük ölçüde aydınlatıldığı bu hayvanlarda süperovulasyona cevabın Bos Tauruslara göre daha iyi olduğu ancak bu cevabın bakım besleme gibi çevresel koşullara da bağlı olduğu vurgulanmaktadır [7]. Kültür ırklarında yıllar boyu yapılan çalışmalarda süperovulasyona cevap çok küçük düzeyde artırılabilmiş ya da artırılmamıştır [3, 4, 6].

Sonuç olarak Yerli Kara Sığır ırkının süperovulasyona yüksek oranda cevap beklenebilecek bir potansiyeli olmadığı ancak elde edilen transfer edilebilir embriyo oranlarının yükseltilebilmesi için bu ırkın reproduksiyon parametrelerini ortaya koyacak ileri düzey çalışmalara ihtiyaç olduğu ve bu çalışmaların ışığında süperovulasyon protokollerinin ele alınmasına ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

- Akyol N, Kizil SH, Satılmış M, Kardeşin T, Erat S (2014): The results of consecutive superovulations in cows by induction with various exogenous progesterone routes. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 38(2): 157-160.
- Andrabi SMH, Maxwell WMC (2007): A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, 99(3): 223-243.
- Baruselli PS, de Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bó GA (2006): Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65(1): 77-88.
- Bó GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ (1995): Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, 39(3): 193-204.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ (1996): Effect of progestogen plus E-17b treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 45: 897-910.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Mapletoft RJ (2002): The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57(1): 53-72.
- Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF (2003): Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 78(3): 307-326.
- Bó GA, Mapletoft RJ (2014): Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1): 38-48.
- Cardellino RA, Boyazoglu J (2009): Research opportunities in the field of animal genetic resources. *Livestock Science*, 120(3): 166-173.
- Bülbül B, Kırbaş M, Köse M, Dursun Ş (2010): Investigation of superovulation response in Brown Swiss cows after synchronization using progesterone and oestradiol valerate. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 16: 463-468.
- Carvalho JBP (2004). Synchronization of ovulation with intravaginal with progesterone device in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* *Bos taurus* heifers. Ph.D. Thesis, University of São Paulo, Brasil, 2004.
- Colazo MG, Martinez MF, Small JA, Kastelic JP, Burnley CA, Ward DR, Mapletoft RJ (2005): Effect of estradiol valerate on ovarian follicle Dynamics and superovulatory response in progesterone-treated cattle. *Theriogenology*, 63(5): 1454-1468.
- Drucker AG, Gomez V, Anderson S (2001): The economic evaluation of farm animal genetic resources: a survey of available methods. *Ecological Economics*, 36(1): 1-18.
- FAO (1995): World watch list for domestic animal diversity. Edited by Scherf, B., FAO, Rome.
- FAO (1999): The global strategy for the management of farm animal genetic resources, Rome, Italy.
- FAO (2011): Draft Guidelines For The Cryoconservation Of Animal Genetic Resources, Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 13th Regular Session. Rome, Italy, 18-22 July.
- Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP (1997): Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science*, 46(1): 1-14.
- Mara L, Casu S, Carta A, Dattena M (2013): Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Animal Reproduction Science*, 138(1): 25-38.
- Mendelsohn R (2003): The challenge of conserving indigenous domesticated animals. *Ecological Economics*, 45(3): 501-510.
- Prentice JR, Anzar M (2011): Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Veterinary medicine international*. Volume 2011, Article ID 146405, 11 pages, doi:10.4061/2011/146405.
- Soysal MI, Özkan E, Gürcan EK (2003): The status of native farm animal genetic diversity in Türkiye and in the world. *Trakia J. Sci.* 1(3): 1-12.
- Yılmaz O, Akin O, Yener SM, Ertugrul M, Wilson RT (2012): The domestic livestock resources of Turkey: cattle local breeds and types and their conservation status. *Animal Genetic Resources*, 50: 65-73.