

SIĞIRLARDA EMBRİYO TRANSFERİNDE CIDR İLE SENKRONİZE EDİLEN DONÖRLERE ÖSTRUS ÖNCESİ GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇİFT PGF₂α UYGULAMALARININ ELDE EDİLEN EMBRİYOLARIN KALİTESİ VE SAYISI ÜZERİNE ETKİLERİ*

THE EFFECT OF DOUBLE PGF₂A ADMINISTRATIONS APPLIED TO DONOR BEFORE OESTRUS WITH SYNCHRONIZED CIDR ON THE NUMBER AND QUALITY OF OBTAINED EMBRYOS DURING EMBRYO TRANSFER IN CATTLE*

Uğur KARA¹, Tayfur BEKYÜREK²

¹Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana

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

ÖZ

Bu çalışmada, sığırlarda embriyo transferinde östrus öncesi uygulanan çift PGF₂α uygulamalarının elde edilen embriyoların kalitesi ve sayısı üzerine etkileri araştırıldı. Araştırmada, 5-7 yaşlı Holştayn ırkı, herhangi bir sağlık ve reproduktif problemi bulunmayan, siklusları düzenli seyreden 20 baş Holştayn ırkı inek iki gruba ayrıldı (n=10). Donörlere östrus siklusundan herhangi bir gününde CIDR uygulandı. CIDR uygulandıktan sonra süperovulasyon amacıyla yedinci günden başlayarak dört gün süreyle 12 saat aralıklarla azalan dozlarda (80:80 mg, 60:60mg, 40:30 mg, 30:20 mg) toplam 400 mg FSH kas içi yolla uygulandı. Daha sonra corpus luteum (CL) lize etmek amacıyla Grup I'de 5. FSH enjeksiyonuyla birlikte tek doz 500 µg Cloprostenol ve Grup II'de 5. ve 6. FSH enjeksiyonuyla birlikte çift doz toplam 1000 µg kas içi enjekte edildi. Her iki grupta da 6. FSH enjeksiyonuyla birlikte CIDR uzaklaştırıldı. Cloprostenol enjeksiyonundan 24 saat sonra günde üç kez donörlerin östrusları takip edildi ve östrus başlangıcından itibaren 12 saat ara ile üç kez tohumlandı. Embriyolar tohumlamayı takiben yedinci günün sonunda uterus yıkaması ile toplandı.

Sonuç olarak, iki protokol arasında embriyo sayısı ve kalitesi açısından fark bulunamamıştır. Ancak donörlere östrustan önce çift prostaglandin uygulamasının embriyo sayısı ve kalitesi üzerine sayısal olarak olumlu etkisi olduğu kanaatine varılmıştır.

ABSTRACT

In this study, the effect of embryo transfer applications from pre-applied double-PGF₂α before the oestrus period on the number and quality of the embryos in cattle were investigated. In the study, 20 Holstein cows aged 5 to 7 years and do not have any health and reproductive problems and had regular cycles were divided into two groups (n = 10). CIDR was applied to donors in any one day of estrous cycle. In order to superovulation decreasing FSH doses were intramuscularly administered after CIDR application by starting from 7th day with 12-hour intervals for four days (mg/ 80:80 mg, 60:60 mg, 40:30 mg, 30:20 mg) which was totally 400 mg. And later, in order to lyses corpus luteum with 5th FSH injections with a single dose 500 µg Cloprostenol and with 5th and 6th FSH injections with a double dose (500 µg+500 µg) Cloprostenol intramuscularly injected to Group I and Group II, respectively. In both Groups, CIDR was removed at the same time with 6th FSH injections. Donors' oestrus were followed up after 24 hours of cloprostenol injection three times a day and from the beginning of estrus with a 12-hours intervals three times inseminated. Embryos were collected at the end of the 7th day following the insemination, by uterus washing (flush).

In conclusion, no statistically significant differences between the two protocols was found in terms of embryo quality and number, but it was concluded that double-prostaglandin applications to the donors' before the oestrus, had positive impact on the quality and number of embryos.

Anahtar kelimeler: İnek, CIDR, Prostaglandin F₂α, Embriyo transferi

Keywords: Cattle, CIDR, Prostaglandin F₂α, Embryo transfer

* Yüksek Lisans Tezi olup, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSY-09-909 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 09.02.2017

Makale Kabul Tarihi: 27.11.2017

Corresponding Author: Vet. Hek. Uğur KARA

Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana

Tel: 0-322-388 45 00;

Fax: 0-322-388 44 99

e-mail: ugunvetkara@hotmail.com

GİRİŞ

Embriyo transferi; verici dişi hayvanlarda ekzojen hormon uygulanarak oluşturulan süperovulasyon sonrasında doğal aşım ya da suni tohumlama yoluyla fertilizasyonları sağlanan ovumların implantasyonları şekillenmeden uterusun toplanarak doğuma kadar yaşamlarını sürdürcekleri önceden senkronize edilerek hazırlanmış aynı türden alıcı dişilerin uterusuna nakledilmesi olarak tanımlanır (1). Bir başka deyişle donör dişilerin süperovulasyonunun başlatılması, embriyoların geri kazanımı ve onların alıcı dişilerin uterusuna transferini içeren bir üreme biyoteknolojisidir (2).

Embriyo transferinin temel amacı birim zamanda yüksek genetik kapasiteye sahip donörlerden elde edilecek üstün verimli yavruların sayısını artırmaktır. Böylece üstün verimli bir dişiden yaşamı boyunca elde edilebilecek yavru sayısının 4-5 katı yavru alınabilmektedir. Bu yöntem ile genetik kapasitenin artırılması yetiştiricilerin elindeki sürülerin ekonomik değerlerini, hayvancılık endüstrisinde hayvansal kaliteyi ve ekonomik kazancı artırmaktadır (3).

Genetik ilerlemede en hızlı yol sürüye damızlık değeri yüksek hayvanların doğrudan katılmasıdır. Böylece üstün verimli hayvanlardan beklenen fayda sürü içerisinde en kısa sürede gerçekleşecektir. Genetik ilerlemede dondurulmuş sperma da kullanılabilir ancak suni tohumlama yoluyla boğadan aktarılacak genetik ilerleme %50 düzeyinde olmaktadır (3).

Donörlerin süperovulasyon uygulamalarına verdikleri yanıtlardaki çeşitlilik ile süperovulasyon uygulamaları için gerekli zaman ve iş gücü genetik iyileştirme programlarında ET'nin yaygın olarak kullanılmasını etkileyen temel faktörlerdir (4).

Süperovulasyon uygulamalarının temel amacı, maksimum sayıda fertilizasyon ve gebelik elde edilme oranı yüksek transfer edilebilir embriyo elde etmektir (5).

Hayvanların süperovulasyon uygulamalarına fonksiyonel cevabı ırk, yaş, genel kondisyon, hormon tipi, uygulama şekli, iklim, verim durumu, laktasyon, beslenme ve çevresel koşullar gibi birçok faktör etkilidir. Genel olarak sütçü ineklerin süperovulasyon uygulamalarına cevabı etçi ırklardan daha düşüktür. Holstein'lere göre diğer sığır ırklarının süperovulasyona fonksiyonel cevabı daha iyidir. 10 yaşından sonra ineklerde süperovulasyon fonksiyonel cevabı azalmaktadır. Bu yüzden daha çok reproduktif geçmişi bilinen inekler ya da siklusları düzenli düveler tercih edilmelidir. Süperovulasyona fonksiyonel cevabın önceden tam olarak belirlenememesi günümüzde embriyo transferi kullanımının yaygınlaştırılmasını sınırlandıran en önemli faktördür (6,7).

Günümüzde ultrasonografi muayeneleri ile ovaryum foliküler dinamiklerinin ortaya konulması ile çok sayıda yeni süperovulasyon protokolleri geliştirilmiş ve uygulanmaya başlanılmasına rağmen hala süperovulasyona verilecek yanıt önceden tahmin edilememektedir. Süperovulasyon ve embriyo transferinin uygulamalarının başarısını, yaygınlaştırılmasını ve karlılığını etkileyen hayvanlar arasında önemli derecede farklılıklar oluşturan birçok parametre üzerinde araştırmalar yapılması gereklidir. Bazı araştırmacılar süperovulasyon sırasında

birinci PGF_{2α} enjeksiyonundan 12-24 saat sonra uygulanan ikinci PGF_{2α} enjeksiyonunun embriyo sayısını artırdığını bildirmişlerdir (7,8).

Bu çalışmada amaç, donörlere östrus öncesi yapılan çift PGF_{2α} uygulamalarının elde edilen embriyoların kalitesi ve sayısı üzerine etkilerini araştırmaktır.

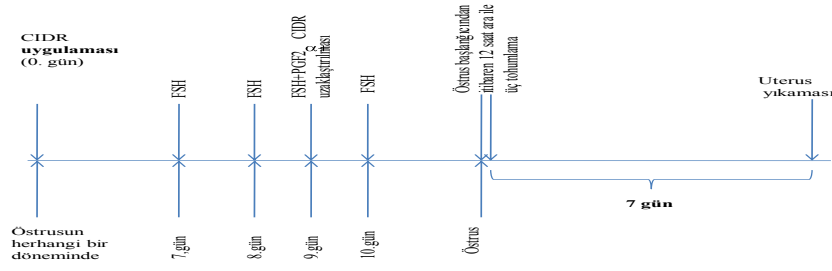
GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Adana Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Hacali Araştırma çiftliğinde Holştayn ırkı ineklerde 2010 yılı Nisan ayında gerçekleştirilmiş olup; çalışmada kullanılan donörler 5-7 yaşlı Holştayn ırkı inekler arasından herhangi bir sağlık ve reproduktif problemi bulunmayan, siklusları düzenli olanlardan seçildi.

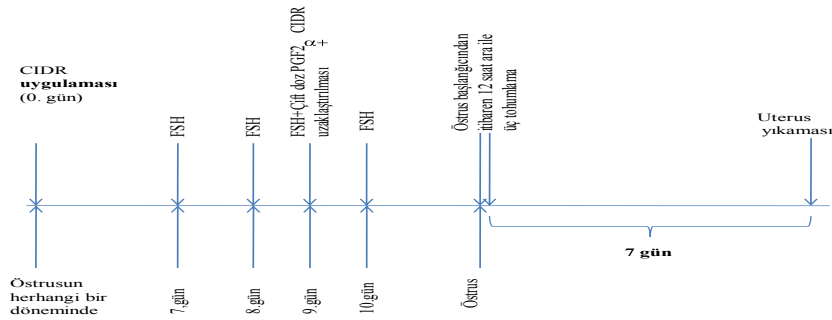
Çalışmada 20 baş inek süperovulasyon amacıyla 10'ar adet hayvandan oluşan iki gruba ayrıldı (Grup I ve Grup II). Donörlere östrus siklusunun herhangi bir gününde CIDR (Controlled Internal Drug Release, 1,38 gr progesteron, pharmlab & Upjohn company division of pfizer inc. Newyork NY10017) uygulandı. CIDR uygulandıktan sonra süperovulasyon amacıyla yedinci günden başlayarak dört gün, 12 saat ara ile günde iki kez sabah ve akşam azalan dozlarda (80:80 mg, 60:60mg, 40:30 mg, 30:20 mg) toplam 400 mg FSH (Folltropin-V, toplam 400 mg NIH-FSH-P1, Bioniche Animal Health Inc., Ontario, CANADA K8N5J2) kas içi olarak verildi. Daha sonra corpus luteum (CL)'ü lize etmek amacıyla Grup I' de beşinci FSH enjeksiyonuyla birlikte tek doz 500 µg Cloprostenol (Esumate, schering plough/Essex Animal Health sedelsberger strasse 2,26169 Friesoythe-ALMANYA) ve Grup II'de beşinci ve altıncı FSH enjeksiyonuyla birlikte çift doz (500 µg+500 µg) kas içi enjekte edildi. Her iki grupta da altıncı FSH enjeksiyonuyla birlikte CIDR vucuttan uzaklaştırıldı. Cloprostenol enjeksiyonundan 24 saat sonra günde üç kez donörlerin östrusları takip edildi ve östrus başlangıcından itibaren 12 saat ara ile 0,25 ml'lik payetlerdeki sperma ile üç kez tohumlandı. Embriyolar tohumlamayı takiben yedinci günün sonunda uterus yıkaması ile toplandı. Uterus yıkaması sırasında ultrason (5 MHz, Honda HS-101V) ile ovaryum muayeneleri yapılarak toplam CL ve toplam folikül sayıları tespit edildi. Yıkama solüsyonu olarak % 1 buzağı serumu (Fotal Bovine Serum Sigma F 9665) ve % 0.1 Kanamisin (Kanovet, Vetaş Veteriner ve Tarım İlaçları A.Ş.) içeren 1000 ml'lik laktatlı-ringer solüsyonu (Ringer-Fleks, Eczacıbaşı-Baxter Hastane Ürünleri, İstanbul) kullanıldı. Uterus yıkamasına başlamadan önce 4-6 ml lokal anestezi (Adokain, SANOVEL İlaç San.ve Tic. A.Ş.Maslak/İstanbul) solüsyonu kullanarak üst epidural anestezi uygulaması sonrası uterus yıkaması çift yönlü foley kateteri ile yapıldı. Kateterin balonu kornuların bifurkasyon noktasından yaklaşık beş cm içeri girdikten sonra 15-20 ml hava ile şişirilerek sabitlendi. İlk iki yıkama sırasında kornuların yaklaşık %70 den fazlası solüsyonla doldurulmadan her defasında 50-100 ml solüsyon verilerek her bir kornu 5-6 kez yaklaşık 500 ml solüsyon kullanılarak yıkandı. Alınan uterus yıkama içeriği filtreden geçirildikten sonra petri kutularına konarak stereo mikroskop altında embriyolar bulundu. Bulunan embriyolar arama solüsyonuna aktarıldı (Viqro TM HOLDİNG Plus Bioniche Animal Health USA INC Pulman WA, USA 509-3354047). Bu solüsyonda üç

kez yıkandıktan sonra embriyo sayısı, kalitesi ve gelişme evreleri belirlendi.

dejenere embriyo ortalama sayıları değerlendirildiğinde, Grup 1'de sırasıyla 3.00±0.94, 11.90±2.51,



Şekil 1. Grup I'de uygulanan süperovulasyon protokolü



Şekil 2. Grup II'de uygulanan süperovulasyon protokolü

İstatistik analizler

Çalışmada iki farklı protokolün toplam anovulatör folikül sayısı, toplam CL sayısı, birinci, ikinci, üçüncü kalite embriyo sayıları, dejenere embriyo sayıları ve UFO görülme oranları üzerine etkileri ki-kare testi, Gruplar arasında toplam embriyo sayısı ve kalitesi, toplam oosit sayısı, toplam folikül, toplam CL, toplam embriyo, transfer edilebilir embriyo sayısı, kaliteleri ve dejenere embriyo sayılarına ait ortalamalar ortalamalar arası farka ait hipotez testi (t testi) yapılarak karşılaştırıldı. Elde edilen t değerleri t cetvel değeri ile karşılaştırılmış ve 0.05 önem seviyesinde önem kontrolü yapılmıştır. Analizler SPSS 11.5 istatistik paket programında yapıldı(9).

BULGULAR

Çalışmada iki farklı grupta toplam 20 adet süperovulasyon uygulandı. Uterus yıkamasının yapıldığı gün rektal muayene ve ultrasonografik muayenelerle Grup I'de 119 adet ve Grup II'de ise 93 adet CL tespit edildi. Grup I'de iki adet ve Grup II'de bir adet donörden embriyo toplanamadı. Çalışma sonunda, toplam follikül, toplam corpus luteum, toplam embriyo, transfer edilebilir embriyo, 1, 2 ve 3. kalite embriyo ve

4.40±1.17, 2.70±0.82, 1.90±0.67, 0.90±0.40, 0.60±0.26, ve 1.00±0.39; Grup 2'de sırasıyla 4.60±1.55, 9.30±1.36, 4.70±1.61, 3.60±1.38, 2.80±1.19, 0.80±0.24, 0.90±0.31 ve 0.20±0.13 olarak tespit edildi (P >0,05). Gruplar arasında embriyo sayısı, kaliteleri ve oosit görülme oranları bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur (P>0.05). Ancak ikinci grubun birinci kalite embriyo oranı yüksek dejenere embriyo oranı düşüktür. Her iki grupta CL ve anovulatör folikül görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05). Her iki grupta elde edilen bulguların karşılaştırılması Tablo I ve Tablo II'de sunulmuştur. Denemede I. Grupta 44, II. Grupta 47 adet embriyo elde edilmiştir. Gruplar arasında toplam folikül, toplam CL, toplam embriyo sayısı, transfer edilebilir embriyo sayısı, kaliteleri ve dejenere embriyo sayılarına ait ortalamalar bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır (P>0,05). Birinci ve ikinci grubun toplam folikül, toplam CL, toplam embriyo sayısı ve kaliteleri, transfer edilebilir embriyo sayısı ve kaliteleri ve dejenere embriyo sayılarına ait ortalamalar Tablo III'de verilmiştir. . Tablo III incelendiğinde gruplar arasında toplam folikül, toplam CL, toplam embriyo sayısı, transfer edi-

lebilir embriyo sayısı, kaliteleri ve dejenere embriyo sayılarına ait ortalamalar bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

mm) 3.5 ± 0.6 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki bulgularla uyum içersindedir. Sunulan bu çalışmada Gruplar arasında toplam CL sayı-

Tablo I. Her iki grupta elde edilen oosit sayıları ve embriyoların kalitelere göre sayılarının karşılaştırılması.

Protokol	1.Kalite (Görülme Oranı)	2.Kalite (Görülme Oranı)	3.Kalite (Görülme Oranı)	Dejenere (Görülme Oranı)	UFO (Görülme Oranı)	Ki-Kare Değeri	İstatistik Önem
Grup I TEK	19	9	6	10	5 (%10.2)	8.209	P=0.84
Grup II ÇİFT PG F ₂ α	28	8	9	2	3		

Gruplar arasında embriyo sayısı, kaliteleri ve oosit görülme oranları bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($P>0.05$). Ancak ikinci grubun birinci kalite embriyo oranı yüksek dejenere embriyo oranı düşüktür.

Tablo II. Her iki grupta yapılan muayenelerde elde edilen ovaryum bulgularının karşılaştırılması .

Protokol	CL Sayısı (Görülme Oranı)	Anovulatör Folikül (Görülme Oranı)	Ki-Kare Değeri	İstatistik Önem Kontrolü
Grup I TEK PG F ₂ α	119 (% 79.9)	30(% 20.1)	6.212	P=0.013
Grup II ÇİFT PG F ₂ α	93(% 66.9)	46(% 33.1)		

Her iki grupta CL ve anovulatör folikül görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. ($P<0.05$).

Tablo III. Birinci ve ikinci grubun toplam folikül, toplam CL, toplam embriyo sayısı ve kaliteleri, transfer edilebilir embriyo sayısı ve kaliteleri ve dejenere embriyo sayılarına ait ortalamalar.

	Grup I (n=10) Ortalama± Standart Hata	Grup II (n=10) Ortalama± Standart Hata	t değeri	İstatistik Önem Kontrolü
Toplam Fol.	3,00±0,94	4,60±1,55	0,879	P>0.05
Toplam CL	11,90±2,51	9,30±1,36	0,91	
Toplam Embriyo	4,40±1,17	4,70±1,61	0,141	
Transfer edilebilir Embriyo	2,70±0,82	3,60±1,38	0,56	
Kalite1	1,90±0,67	2,80±1,19	0,65	
Kalite2	0,90±0,40	0,80±0,24	0,21	
Kalite3	0,60±0,26	0,90±0,31	0,743	
Dejenere	1,00±0,39	0,20±0,13	1,93	

Gruplar arasında toplam folikül, toplam CL, toplam embriyo sayısı, transfer edilebilir embriyo sayısı, kaliteleri ve dejenere embriyo sayılarına ait ortalamalar bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

TARTIŞMA

Sunulan bu çalışmada toplam folikül sayıları bakımından istatistik'i olarak önemli bir fark vardır ($P<0.05$). Ancak grup ortalamalarını karşılaştırdığımızda istatistik'i olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0.05$). 1. protokolde 3.00 ± 0.94 olan folikül sayısı, 2. protokolde 4.60 ± 1.55 olarak tespit edilmiştir. Yaakub ve ark. (10) yaptıkları çalışmada folikül sayılarını (> 10

ları bakımından istatistik'i olarak önemli bir fark vardır ($P<0.05$). Ancak grup ortalamalarını karşılaştırdığımızda istatistik'i olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($P>0.05$). Toplam CL ve anovulatör folikül sayıları bakımından 1. protokolde ortalama CL sayısı 11.90 ± 7.96 ve, 2. protokolde ortalama CL sayısı 9.30 ± 4.32 olarak saptanmıştır. Köse ve ark. (11) İsviçre esmeri ineklerde yaptıkları çalışmada ortalama CL sayılarını 11.54 ± 1.63

olarak tespit etmişlerdir. Farklı ırk ile yapılan bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızdaki bulgular uyum göstermektedir.

Nakajima ve ark. (12) iki grup üzerinde 4000 IU PMSG ve çift doz PGF₂α uygulamasını takiben östrusun başlangıcından 12 saat sonra bir gruba anti-PMSG serum uygulayarak yaptıkları çalışmada, anti-Gebe Kısrak Serum Gonadotropini serum uyguladıkları grupta ortalama CL, sayısını 12.7±5.2, kontrol grubunda ise ortalama CL sayısını 14.3±6.1 olarak tespit etmişlerdir. Elde edilen CL sayısı bizim çalışmamıza göre farklı çıkması süperovulasyon amacıyla kullanılan hormonun farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Sunulan bu çalışmada geri kazanım oranı ise Grup I' de % 41.2 (49/119) ve Grup II' de %53.8 (50/93) olarak tespit edildi (Tablo II). Köse ve ark. (11) İsviçre esmeri ineklerde yaptıkları çalışmada geri kazanım oranını % 74.0 olarak tespit etmişlerdir. Sartori ve ark. (13), Holstein ırkı düvelerde yaptıkları çalışmada geri kazanım oranını % 63.9 olarak tespit etmişlerdir. Bizim çalışma gruplarımızın her iki çalışmadaki geri kazanım oranlarından düşük olmasının sebepleri ırk, mevsim, besleme, süperovulasyon protokollerinin uygulanmasındaki farklılıklar, süperovulasyona başlamadan önce östrus siklusunun takip edilmemesi, süperovulasyon sırasında dominant follikülün varlığının kontrol edilmemesi, teknik personelin deneyiminden kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

Denemede elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; protokollerin toplam embriyo sayısı ve kalitesi üzerine olan etkisinin istatistik'i açıdan önemsiz olduğu görülmüştür (P>0.05). Toplam embriyo sayısı 1. protokolde 4.40 ve 2. protokolde de 4.70 olarak bulunmuştur. Yapılan araştırmalarda süperovulasyon uygulaması sonucunda ortalama 10 embriyo elde edilebildiği ve bunun yaklaşık %50'sini transfer edilebilir embriyoların oluşturduğu bildirilmektedir (14,15). Yaakub ve ark. (10) etçi düvelerde rasyona 3 kg konsantre yem ilave edilen çalışma grubunda toplam 265 mg NM-FSH-Pl'in sekiz eşit dozda uygulanması ve beşinci FSH enjeksiyonu ile birlikte tek doz prostaglandin uygulayarak yaptıkları çalışma da ortalama 9.8±0.9 ovum/embriyo elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki toplam embriyo sayısının yukarıda belirtilen çalışmadan daha düşük olduğu görülmektedir.

Sunulan bu çalışmada transfer edilebilir embriyo sayısı 1. protokolde 2.70±2.58; 2. protokolde 3.60±4.38 olarak tespit edilmiş, uygulamaların transfer edilebilir embriyo sayısı üzerine olan etkisi istatistik'i olarak önemsiz bulunmuştur (P>0.05).

Novotny ve ark. (16), ineklerde azalan dozlarda FSH ve çift doz PGF₂α uygulayarak tohumlama sırasında progesteron ölçüm sonuçlarına göre iki gruba ayırdığı çalışmalarında, progesteron düzeyi düşük grupta sırasıyla toplam embriyo sayısı ve transfer edilebilir embriyo sayısını 8.8 ve 5.06 olarak bulurken; progesteron düzeyi yüksek grupta da sırasıyla toplam embriyo sayısı ve transfer edilebilir embriyo sayısını 3.85 ve 1.43 olarak tespit etmişlerdir. Köse ve ark. (11) toplam 400 mg NM-FSH-Pl'in sekiz azalan dozda uygulanması ve beşinci FSH uygulaması ile birlikte tek doz PG uygulayarak yaptıkları çalışmada ortalama 8.54±1.69 ovum/embriyo elde etmişlerdir.

Bizim çalışma gruplarımızın her iki çalışmadaki toplam

embriyo sayısı ve transfer edilebilir embriyo sayısından düşük olduğu görülmektedir.

Süperovulasyon için PMSG kullanılan ineklerde residüel PMSG'nin transfer edilebilir embriyo üzerine olumsuz etkileri vardır. PMSG uygulanan ineklerde residüel PMSG'nin fertilizasyon ve embriyonik gelişim üzerine bu olumsuz etkilerini nötralize etmek için anti-PMSG kullanılabilir (1,17,18). Nakajima ve ark. (12), iki grup üzerinde 4000 IU PMSG ve çift doz PGF₂α uygulamasını takiben östrusun başlangıcından 12 saat sonra bir gruba anti-PMSG serum uygulayarak yaptıkları çalışmada, anti-PMSG serum uyguladıkları grupta ortalama transfer edilebilir embriyo sayısını 3.30 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuç süperovulasyon amacıyla kullanılan hormon farklı olmasına rağmen bizim çalışmamızdaki bulgularla uyum göstermektedir. Kontrol grubunda ise ortalama transfer edilebilir embriyo sayısını 2.00 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonucun Nakajima ve ark.(12) anti-PMSG uygulanmayan grubundaki transfer edilebilir embriyo sayılarının anti-PMSG uyguladıkları gruba ve bizim çalışma sonuçlarımıza göre düşük olmasının nedeni anti-PMSG uygulanmayan protokollerde PMSG'nin yarılanma ömrünün uzun olmasından dolayı FSH etkisinin devam etmiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda 1. ve 2. kalite embriyo sayısı 1. protokolde sırasıyla 1.90±2.13 ve 0.90±1.28 ve 2. Protokolde de sırasıyla 2.80±3.768 ve 0.80±0.788 olarak bulunmuştur. Denemede uygulanan 2. protokolün istatistik'i olarak önemli olmasa da 1. kalite embriyo sayısını artırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yaakub ve ark. (10) yaptıkları çalışmada ortalama 2.7±0.5, 1. ve 2. kalite embriyo elde etmişlerdir. Bu sonuçlar çalışmamızda 2. Protokolde elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir. Köse ve ark. (11) yaptıkları çalışmada elde ettikleri ortalama 1. kalite embriyo sayısı 3.23±1.18; 2. kalite embriyo sayısı da 1.69±0.47'dir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçlarından yüksek olduğu görülmektedir.

Siklus ortası FSH uygulamaları sırasında bir dominant follikülün bulunması süperovulasyona cevabı azaltmakta (17,18), ayrıca dominant folikülün uzaklaştırılmasıyla süperovulasyonla elde edilen embriyo sayısında artış sağlanmaktadır. Kim ve ark. (19), dominant folikülü uzaklaştırarak yaptıkları süperovulasyon çalışmasında, dominant folikülün uzaklaştırıldığı grupta toplam CL, toplam ovum/embriyo ve transfer edilebilir embriyo sayılarını sırasıyla 9.6 ± 1.1, 7.7 ± 1.3 ve 4.6 ± 0.9 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçların bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlardan yüksek olmasının sebebi, dominant folikülün uzaklaştırılmasını takiben FSH konsantrasyonunda ve küçük foliküllerin sayısındaki artış ve süperovulasyonun başlangıcında östrus siklusunun takip edilmesi gibi etkilerden kaynaklanmış olabilir. Kontrol grubunda ise toplam CL, toplam ovum/embriyo ve transfer edilebilir embriyo sayıları sırasıyla 6.1 ± 0.9, 3.9 ± 1.0 ve 2.3 ± 0.8 olarak tespit edilmiştir ve bizim elde ettiğimiz sonuçlardan biraz daha düşüktür.

Sugano ve Shinogi (20), 450 IU tek enjeksiyon, 600 IU tek enjeksiyon ve 600 IU günde iki kez 3 gün human menaposal gonadotropin(hMG) ve tek doz PGF₂α uygulayarak yaptıkları çalışma da ortalama transfer edilebilir embriyo sayılarını sırasıyla 450 IU tek enjeksiyon uygulama grubunda 5.4±2.6, 600 IU tek enjeksiyon uygulama grubunda 7.5±4.5, 600 IU günde iki kez 3 gün

uygulama grubunda 6.3 ± 5.2 olarak tespit etmişlerdir. Lopes da Costa ve ark. (21) ise toplam 400 mg NM-FSH-Pi sekiz eşit dozda uygulanması ve 6. FSH uygulaması ile birlikte tek doz prostaglandin uygulayarak yaptıkları çalışma da ortalama 6.4 ± 1.2 transfer edilebilir embriyo elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki transfer edilebilir embriyo sayısının yukarıda sözü edilen iki çalışmanın sonuçlarına göre düşük olduğu görülmektedir.

Süperovulasyon amacıyla kullanılan FSH preparatının içerdiği FSH/LH oranı da cevap üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (22). Preparat içinde bir miktar LH'nin bulunması gerektiği, yüksek LH oranının ise süperovulasyon cevabı, fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesini olumsuz etkilediği bildirilmektedir (23). Mapletoft ve ark. (24), ineklerde yaptıkları çalışmalarında, 400 mg NIH-FSH-P1 ve farklı dozlarda, %100 (standart FSH-P), %32 ve %16 LH içeren ve hiç LH içermeyen FSH preparatları ile süperovulasyon uygulamışlardır. Araştırmacılar gruplarda inek başına ortalama CL sayısını sırasıyla 10.2, 11.1, 15.6 ve 17.2 ve transfer edilebilir embriyo sayısını ise 4.0, 3.9, 7.7 ve 5.5 olarak saptamışlar ve en uygun LH oranının %16 olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte en uygun FSH/LH oranı ile ırklar'a göre farklı sonuçlar alınabileceği ifade edilmiştir (25).

Toplam folikül, anovulatör follikül, toplam Cl., toplam embriyo, transfer edilebilir embriyo, embriyo kalitesi gibi parametreler dikkate alındığında sunulan bu çalışmada elde edilen değerler ile yukarıda ayrıntıları verilen literatürlerde elde edilen değerler arasındaki farklılıkların süperovulasyon protokünün farklılığı, çevresel faktörler, besleme, süperovulasyon protokollerinin uygulanmasındaki farklılıklar, LH kullanılmaması, kullanılan preparatın FSH/LH oranı, süperovulasyona başlamadan önce östrus siklusunun takip edilmemesi, süperovulasyon sırasında dominant follikülün varlığının kontrol edilmemesi gibi birçok faktörden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Ticari embriyo transferi için devam etmekte olan en büyük problem, süperovulasyona cevaptaki farklılıklardır (26-28).

Teknolojinin yaygın bir kullanım alanının olması ve süperovulasyona yanıtı etkileyen faktörleri araştırmak, süperovulasyona yanıtı artırmak için yapılan girişimlere rağmen ekzojen gonadotropinlere cevap verme yeteneği, oosit kalitesi, LH dalgasının oluşumu, ovulasyon oranları, embriyo gelişimi, kullanılabilir embriyo sayısı gibi birçok parametrede doğal ve bireysel olarak hayvanlar arasında önemli derecede farklılıklar bulunmaktadır (19,29-32).

Sunulan çalışmamızda donör başına elde edilen embriyo sayısı ve kalitesi bazı çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde kullanılan hormon ve yöntem farklılığı, dozu, uygulama sayısı ve yöntemi, östrus siklusunun ve laktasyonun dönemi, çevresel faktörler, iklim ve mevsim, ovaryumların mevcut durumu, besleme, uygulamanın başlangıç zamanında ovaryumdaki foliküllerin dalganın takibinin yapılmaması gibi çok sayıda faktörün elde edilen embriyo sayısı ve kalitesi üzerinde etkili olabileceği kanaatine varılmıştır. Bu çalışmada PG'ler ile iki farklı süperovulasyon uygulamasının embriyo sayısı ve kalitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Embriyo sayısı ve kalitesi açısından her iki proto-

kol arasında istatistik'i olarak önemli bir farklılık bulunmamış olsa da donörlere östrüstan önce çift PG uygulamasının embriyo sayısı ve kalitesi üzerine sayısal olarak olumlu etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Süperovulasyon uygulamalarındaki en önemli problem, süperovulasyon uygulamasına karşı donörlerin cevaplarındaki bireysel farklılık ve elde edilen cevabın önceden belirlenememesidir. Süperovulasyona etki eden faktörler ve önem düzeylerinin belirlenmesi, süperovulasyon protokollerinde bu etkilere göre gerekli düzenlemelerin yapılması embriyo sayısı ve kalitesi yönünden en uygun ve maksimum sayıda transfer edilebilir embriyo elde edilmesine olanak sağlayacak tekniğin geliştirilmesi ile mevcut ülke şartlarında embriyo transferinin uygulanmasında önemli avantaj sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alaçam E. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite (1.Baskı). Konya 1994;pp 1-385.
2. Mapletoft RJ. The technology of embryo transfer. IETS, Montreal 1987; pp 2-41.
3. Sağırkaya H. Sığırlarda embriyo transfer uygulaması ve Türkiye açısından önemi. Uludağ Üniv Vet Fak Derg 2009; 28 :11-19.
4. Bó GA, Carballo Guerrero D, Adams GP. Alternative approaches to setting up donor cows for superovulation. Theriogenology 2008; 69:81-87.
5. Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. Theriogenology 1993; 39:7-24.
6. Akyol N. Sığır embriyo transferinde hormon kullanımı. Lalahan Hay Araşt Enst Derg 2001; 4:95-105.
7. Bülbül B, Dursun Ş. İneklerde süperovulasyon cevabına etki eden faktörler. Hay Araş Derg 2005; 15:16-25.
8. Seidel GE, Seidel SM. Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal. Production and health paper 77. Erişim: [http://www.fao.org/DOCREP/004/T0117E/T0117 E00.htm], Erişim Tarihi: 15 Temmuz 2015.
9. SPSS. Statistical Package Social Science. SPSS 11.5, SPSS Inc, 1999.
10. Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. Theriogenology 1999; 51:1259-1266.
11. Köse M, Dursun Ş, Bülbül B ve ark. İsviçre esmeri ineklerde FSH ile süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmaları. Hayvancılık Araştırma Dergisi 2006; 16:1-6.
12. Nakajima A, Hiraizumi S, Onodera K, et al. The use of bovine anti-PMSG serum in beef cattle after PMSG-superovulation. J Vet Med Sci 1992; 54:95
13. Sartori R, Suarez-Fernandez CA, Monson RL, et al. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. Theriogenology 2003; 60:1319-1330.
14. Selk G. Embryo transfer in cattle. 1996, Erişim: [http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3158web.pdf], Erişim Tarihi: 15 Temmuz 2015
15. Gordon IR. Reproductive technologies in farm

- animals, CAB International, Cambridge 2005.
16. Novotny F, Hajurka J, Macak V. Relationship between blood serum progesterone levels in cattle donors and the yield and quality of embryos. *Bull Vet Inst Pulawy* 2005; 49:49-52
 17. Dieleman SJ, Bevers MM, Vos PLAM et al. PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 1993; 39:25-42.
 18. Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, et al. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* 1994; 33:519-529.
 19. Kim IH, Son DS, Yeon SH, et al. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 2001; 55:937-945.
 20. Sugano M, Shinogi T. Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Anim Reprod Sci* 1999; 55:175-181.
 21. Lopes da Costa L, Chagas e Silva J, Robalo Silva J. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology* 2001; 56:65-77.
 22. Hasler JF. Current status and potential of embryo transfer and reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1992; 75:2857-2879.
 23. Kanitz W, Becker F, Schneider F et al. Superovulation in cattle: Practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42:587-599.
 24. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Superovulation in perspective. *Bioniche Animal Health Customer Service* 2002.
 25. Quaresma MA, Lopes da Costa L, Robalo Silva J. Superovulation of Mortelenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLTROPIN). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 2003; 98:81-84.
 26. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42:601-611.
 27. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP et al. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94:177-188.
 28. Nogueira MFG, Barros BJP, Teixeira AB, et al. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology* 2002; 57:1625-1634.
 29. Mikkola M, Mäntysaari P, Tammiranta N, et al. Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Anim Reprod Sci* 2005; 87:193-202.
 30. Callesen H, Greve T, Hyttel P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 1986; 25:71-86.
 31. Greve T, Callesen H, Hyttel P, et al. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 1995; 43:41-50.
 32. Vos PLAM, Van de Leemput EE, Zeinstra EC, et al. Postponement of the preovulatory LH surge does not impair the developmental potential of in vivo matured oocytes from eCG/PG-superovulated heifers. *Theriogenology* 1996; 45: 329 (abstract).