

## İSVİÇRE ESMERİ DÜVELERDE DONDURULMUŞ EMBRİO NAKLİ UYGULAMALARI

(Field experiments with frozen-thawed bovine embryos in  
Brown-Swiss heifers.)

**Sungur, H.\* Alaçam, E.\*\* Tekeli, T.\*\* Kadak, R.\*\*\* Pakdi1, N.\*  
Whitaker, R.O.\*\*\*\***

### SUMMARY

Seven days old frozen Brangus embryos imported from Granada Limited Company of USA were non-surgically transferred to the 64 Brown-Swiss heifers.

Recipient heifers were synchronised by two prostaglandin injections 11 days apart. Transfers were performed 7 days after the estrous. Results were controlled by rectal palpation 45 days later.

Estrous symptoms were observed between 36-72 nd hours following 2 nd prostaglandin injections (aprox.  $60.47 \pm 9.73$  hour). After thawing, embryos were classified as, 43 morula, 9 early blastocyst, 11 blastocyst and 1 expanded blastocyst. On quality examination, excellent (G1), good (G2) and fair (G3) embryos were differentiated 28.31 and 5 respectively. Pregnancy rate was 32.81 % after all transfers. This rate was 39.28 % in G1 and 25.80 % in G2 embryos. The highest pregnancy rate was held by using blastocyst phase embryos (62.50 %).

It's decided that, the pregnancy rates could be improved by using excellent quality and early phase embryos.

### ÖZET

Bu çalışmada, 7 günlük dondurulmuş Brangus ırkı inek embrioları 64 adet İsviçre esmeri ırkı düveye cervical yoldan nakledildi.

---

\* Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Ankara

\*\* Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Konya.

\*\*\* Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Konya.

\*\*\*\* Granada Limited Company , USA.

Taşıyıcı düvelerin seksüel siklusları, 11 gün ara ile uygulanan iki prostaglandin enjeksiyonu ile kontrol altına alındı. Embrio nakilleri östrüsü izleyen 7. günde yapıldı. Sonuçlar nakilleri izleyen 45. günde yapılan rektal palpasyon ile kontrol edildi.

Senkronize düvelerde östrüsler ikinci prostaglandin enjeksiyonunu izleyen 36-72.saatler arasında ve ortalama  $60.47 \pm 9.73$  saatte izlendi. Çözülerek, stereo mikroskopta değerlendirilen embriolardan 43 tanesi morula, 9 tanesi erken blastosit, 11 tanesi blastosit, 1 tanesi de expanded blastosit olarak değerlendirildi. Kalite yönünden ise 28 tanesi mükemmel (G1), 31 tanesi iyi (G2) ve 5 tanesi orta (G3) olarak belirlendi. Nakiller sonucunda ortalama % 32.81 oranında gebelik elde edildi. Bu oran G1 embriolarla % 39.28, G2 lerde ise % 25.80 olarak belirlendi. En yüksek gebelik oranına blastosit aşamasındaki embriolar ile ulaşıldı ( % 62.50).

İyi kaliteli ve aynı günde daha erken gelişme aşamasındaki embriolar kullanılarak ve deneyim kazanılarak gebelik oranlarının daha da yükseltilebileceği kanısına varıldı.

## GİRİŞ

Embrio nakli, fertilize olmuş ve normal gelişmesine devam eden zigot' (un/ların) ana hayvanın oviduct ya da uterusundan alınarak hemen veya dondurularak kısa-uzun süre korunduktan sonra, aynı türden diğer bir hayvana nakli ve gebelik-doğum süresini burada tamamlaması olarak tanımlanabilir.

İnek embriolarının ilk defa Wilmot ve Rowson (21) tarafından dondurulduktan sonra başarıyla kullanılmasıyla bu türde de kıymetli genetik materyalin kısa ve uzun süreler fertil olarak saklanabileceği ortaya konulmuştur.

Hubbert ve Hopkins (7), operatif yolla ya da cervical yoldan uterusun yıkanmasıyla elde edilen embrioların dondurularak, uzun süreler saklanabildiklerini, eldeki fazla embrioların uygun taşıyıcılar bulunana kadar korunabildiklerini, etçi sürülerde aşım sezonu dışında toplanan embrioların aşım sezonunda kullanılabilirliğini bildirmekte ancak yöntemin taze nakillere göre pahalıya mal olması ve donma çözülme sırasında embrioların ölmesi gibi dezavantajlarının da bulunduğunu eklemektedirler.

Yapılan çeşitli araştırmaların sonuçlarına göre, taze embrio nakilleri ile % 60-80 oranında gebelik elde edilirken, dondurulmuş embrio nakilleri ile alınan sonuçlar % 30-50 arasında değişmektedir (5, 6, 10, 13).

Dondurulmuş embrio nakillerinde başarıyı etkileyen faktörler arasında embriyonun kalitesi, taşıyıcıların döl sağlığı, seksüel senkronizasyonun uygunluğu, nakil için zamanlama, uygulayıcının deneyimi önemli ölçüde rol oynamaktadır (1, 8, 15, 18).

Değişik hayvan türlerinde, farklı dondurma teknikleri ve vasatlar kullanılarak yapılan çalışmalarda genellikle embrioların daha uzun süreler dejenere olmadan saklanabilmesi ve nakiller sonucunda daha yüksek bir fertilité oranı elde edilmesi üzerinde durulmaktadır (4, 9, 17).

Bu çalışmanın amacı ise, Türkiye' de ilk defa, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı tarafından ABD' den getirilen Brangus ırkı embrioların İsviçre esmeri düvelere nakillerinden alınan sonuçları ortaya koymaktır.

## **MATERYALMETOT**

### **1. Materyal:**

Sunulan çalışmada, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı tarafından ABD' nin Granada firmasından sağlanan Brangus (Brahman-Angus) ırkı, 7 günlük, dondurulmuş embriolar ile taşıyıcı olarak Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsüne ait 64 adet, 2-4 yaşlı İsviçre esmeri ırkından düve kullanıldı.

Deneme hayvanlarına yetiştirmenin olağan bakım ve beslenme şartları dışında ayrı bir özen gösterilmedi.

### **2. Metot:**

#### **2.1- Taşıyıcı düvelerin hazırlanması.**

Embrioların nakledileceği düveler, fenotip olarak ergin ağırlıklarının 2/3 ünü geçmiş, gelişmesi normal hayvanlar arasından seçildi. Seçilen materyale rektal muayene uygulanarak tubuler genital kanalın durumu ve ovaryumların siklik işlevleri kontrol edildi. Normal gelişmiş, ovaryum fonksiyonları normal (Ovaryumlarında genç-yaşlı corpus luteum, çapı 1 cm den büyük folliküller gibi fonksiyonel yapılar bulunan) hayvanlar ayrılarak embrio nakilleri için hazırlandılar.

Taşıyıcıların seksüel sikluslarını senkronize etmek amacıyla 11 gün ara ile iki defa 25 mg. Dinoprost tromethamine\*, i.m enjekte edildi. İkinci enjeksiyon sonrasında düveler, 24. saatten başlanarak günde iki defa (9.00 ve 16.00 saatlerinde) yarımşar saat gözlemlendi. Östrüs gösterenler rektal muayene ile doğrulandıktan sonra kaydedildiler.

Östrüsleri izleyen 7. günlerde taşıyıcılara yeniden rektal muayene uygulanarak, ovulasyon sonucu corpus luteumun şekillendiği ovaryumlar belirlendi. Corpus luteumlar büyüklüklerine ve derinliklerine göre; belirgin olanlar Cl 1 (+), küçük olanlar ise Cl2 (++) olarak değerlendirildiler.

#### **2.2- Dondurulmuş embrioların çözülerek nakle hazır hale getirmesi.**

0.25 ml. lik plastik payetler içinde ve sıvı azot tankında saklanan embrioların çözülmesi için dondurulma sırasında uygulanan yöntem bu defa son aşama-

---

\* Dinolytic, Eczacıbaşı.

dan ilk aşamaya doğru tekrarlandı. Bu amaçla; payetler öncelikle buz kristallerinin uzaklaştırılması için 15 saniye, 30 C derecelik su banyosunda bırakıldılar. Daha sonra uç kısımları kesilerek içlerindeki embriolar, steril bir tel yardımı ile dip kısımlarındaki pamuktan itilerek % 10 luk (1.37 M) gliserol solusyonuna aktarıldılar. Bunu takiben de beşer dakika süreyle;

1. % 6.6 gliserol 0.3 M. Sukroz,
2. % 3.3 gliserol 0.3 M. Sukroz,
- 3.3 M. sukroz,
4. MPBS (Modifiye fosfat bufer sol) + % 4 BSA,

solusyonlarında tutuldular. Emrioların değişik solusyonlara aktarılması sırasında tüberkülin şırıngasına iliştirilmiş plastik pastör pipetlerinden yararlanıldı.

### **2.3- Embrioların değerlendirilmesi.**

Çözülmüş embriolar stereo mikroskopta X10 büyültme altında değerlendirildiler. Embriolar iki değişik şekilde sınıflandırıldılar. Bunlardan ilki, gelişme aşamasına göre, (İdentifikasyon) Morula (M4), Erken Blastosit (EB5), Blastosit (B6), Expanded Blastosit (ExB7) şeklinde yapıldı. İkinci sınıflandırmada ise embrionun kalitesi gözönünde tutuldu. (Modifikasyon).

Buna göre;

#### **1. Kalite (G1):**

Embriyo dolgun ve küre şeklinde, hücreler simetrik biçim ve ölçülerde, rengi ne çok açık ve ne çok koyu. Stoplazmada granulasyon bulunmayıp, bazen birkaç adet orta büyüklükte vakuol yer almakta. Perivitellin aralığı boş olup, zona pellucida'sı düzgün,

#### **2. Kalite (G2):**

Bunlarda iyi kalite embriolar olmakla beraber hücrelerinde granulasyonlar ve stoplazmalarında vakuoller yer almakta,

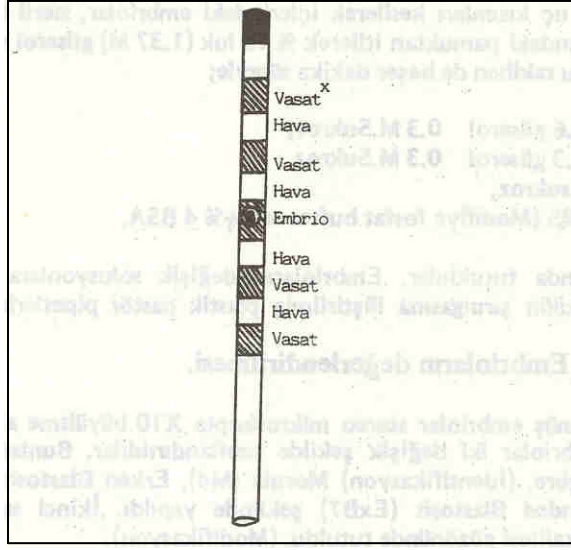
#### **3. Kalite (G3):**

Hücre büyüklükleri farklı ve granüllü bölgeler fazla olup stoplazmalarında çok sayıda vakuoller bulunmakta, şeklinde bir değerlendirme yapıldı.

### **2.4- Embrioların nakli.**

Embrioların değerlendirilmesinden ve tekrar 0.25 ml. lik payetlere teker teker alınmasından sonra, G1 embriolar öncelikle CL 1 olan düvelere ayrılarak, nakledildiler.

Embrioların payetlenmesi\*\* Şekil 1 de şematize edildiği biçimde yapıldı. Daha sonra payetler özel bir tohumlama



Şekil 1. Embrioların payetlenmesi.

pistolesine yerleştirildi. Taşıyıcı düvelere alt epidural anestezi uygulandıktan sonra pistole rekto-vaginal yöntemle cervix uteri'den geçirilerek, corpus luteumun yer aldığı taraftaki cornu uteri'nin ortasına kadar ilerletildi ve embrio bu bölgeye bırakılarak, gereç geriye çekildi.

Düvelere bu işlem dışında mekanik veya kemoterapötik bir uygulama yapılmadı.

## 2.5- Gebelik kontrolleri.

Taşıyıcı düvelerde, nakilleri izleyen 13-15. günlerde östrüs belirtileri ve 45. günlerde ise rektal muayene ile gebelik bulguları araştırıldı.

## BULGULAR

### 1- Taşıyıcı düvelerde seksüel siklusların senkronizasyonu:

Taşıyıcı düvelerin seksüel sikluslarının düzenlenmesi için uygulanan iki prostaglandin enjeksiyonundan sonra östrüslerin 36-72. saatler arasında dağıldığı ve ortalama  $60.47 \pm 9.73$  saatte şekillendiği belirlendi. Östrüslerin görüldüğü saatler Tablo 1 de sunulmuştur.

\*\* Payetleme sırasında vasat olarak MPBS kullanılmıştır.

Tablo 1- Senkronize düvelerde östrüslerin görüldüğü saatler

	İkinci PG Enjeksiyonunu İzleyen Saatler				Ort.
	36 Saat	48 Saat	55 Saat	72 Saat	
Düve Sayısı	1	8	30	25	60.47 ± 9.73
%	1.56	12.50	46.87	39.06	

Östrüsleri izleyen 7. günlerde yapılan rektal muayenelerde, ovulasyon sonucu şekillenen corpus luteum'lardan 25 tanesi CL 1 (+) ve 39 tanesi de CL 2 (++) olarak değerlendirildi.

### 2- Embrioların değerlendirilmesi.

Embrioların stereo mikroskopta yapılan değerlendirilmesinde 43 tanesinin Morola, 9 tanesinin Erken blastosit, 11 tanesinin Blastosit ve 1 tanesininde Expanded Blastosit aşamasında olduğu belirlendi. Bu embrioların kalite kontrolunda ise Tablo 2 deki bulgular elde edildi.

Tablo 2- Çözülen embrioların değerlendirilme sonuçları.

Embrionun gelişme aşaması	Embriyo Sayısı	Embrionun Kalitesi		
		G1	G2	G3
M4	43	12	26	5
EB5	9	7	2	-
B6	11	7	4	-
ExB7	1	1	-	-

### 3- Embrio nakli sonuçları:

Altmış dört adet düveye yapılan nakiller sonucunda % 32.81 oranında gebelik sağlanmıştır. Embrioların gelişme aşamasına ve kalitesine göre başarı oranları Tablo 3 te sunulmuştur.

Tablo 3 -Embriyo Nakil Sonuçları

Embrionun		45. Gün Rektal Palpasyon			Gebe Kalma Oranları %
Gelişme Aşaması	Kalitesi	Bulguları			
		N	Gebe	G. Değil	
M4	G1	12	3	9	25.00
	G2	26	6	20	23.07
	G3	5	2	3	40.00
EB5	G1	7	3	4	42.85
	G2	2	1	1	50.00
B6	G1	8	5	3	62.50
	G2	3	1	2	33.33
ExB7	G1	1	-	1	-
Genel Sonuç		64	21	43	32.81

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Brangus ırkı, 7 günlük inek embriolarının, prostaglandin hormonu enjeksiyonları ile seksüel siklusları kontrol altına alınan düvelere nakilleri sonucunda ortalama % 32.81 oranında bir gebelik elde edilmiştir.

Taşıyıcı düvelere 11 gün ara ile uygulanan çift prostaglandin enjeksiyonundan sonra östrüsler 36. saatten başlayarak izlenmiş, 48-55, saatlerde yoğunlaşarak 72. saate kadar deney hayvanlarının tamamında östrüs belirtileri gözlenmiştir. Taze embriolar ile yapılan nakillerde embrionun yaşı ile taşıyıcıların senkronizasyonu arasında 24 saatlik bir farklılık normal hudutlar içinde kabul edilirken, dondurulmuş embriyo ile yapılan çalışmalarda bu farklılığın 12 saati geçmemesi önerilmektedir. Bu nedenle çalışma sırasında nakiller östrüs belirtilerinin gözlemlenmesini izleyen 7. günlerde yapılmıştır. Bu konuda düzenli kan-süt progesteron hormonu düzeyleri tespit edilerek daha da sağlıklı bir zamanlama yapılabileceği kanısına varılmıştır. Konunun bu yönü ile ilgili diğer bir çalışma ise sürdürülmektedir.

Kennedy ve ark.(8) ve Niemann ve ark. (12) yaptıkları çalışmalarda 7. günde, erken gelişme aşamalarındaki (Geç Morula, Erken Blastosit, Blastosit) embrioların daha fazla yaşama şanslarının olduğunu ve bunlardan daha yüksek gebelik elde ettiklerini bildirmektedirler. Sunulan çalışmada da gebelik şansı yönünden en iyi sonuçlar Erken Blastosit (% 50) ve Blastosit (% 62.50) aşamasındaki embriolar ile elde edilmiştir.

Embrionun kalitesi yönünden yapılan çalışmalarda ise; Shea ve ark. (16) kötü kaliteli embrioların yaşama şansının az olduğunu ve donma -çözülmeye iyi kaliteli olanlar kadar dayanmadığını ileri sürmektedirler. Araştırmacılar iyi kalite embrioların dondurulmasını, eğer gerekli ise daha düşük kalitede olanların taze olarak nakillerini önermektedirler.

Kennedy ve ark. (8) embrioları mükemmel, iyi ve orta olarak tasnif etmişler ve invitro yaşama şanslarını sırasıyla % 91.50 ve 29 olarak belirlemişlerdir. Wrigt (22) mükemmel kalitedeki embrioların, gelişme aşamasına bağlı olarak gebelik oranları yönünden bir farklılık göstermediklerini bildirmektedirler. Sunulan çalışmada da genel bir değerlendirme yapılırsa, Morula, Erken Blastosit ve Blastosit aşamasındaki embriolardan, G3 ler az sayıda olduğu için değerlendirme dışı bırakılırsa, G1 lerde % 39.28, G2 lerde ise % 25.80 bir gebelik oranı görülmektedir.

Dondurulmuş inek embrioları ile yapılan saha çalışmalarında; Chupin ve ark. (2) % 41.4, Elsdén ve ark. (3) % 50, Seidel ve ark. (15) embrionun kalitesine göre % 12-40, Schneider ve ark. (14) % 34 oranında gebelik elde ettiklerini bildirmektedirler. Sunulan çalışmada ise, G1, G2 ve G3 kalitede embrioların tamamı değerlendirildiğinde % 32.81 oranında gebelik sağlanmıştır.

Greve ve Jensen (6) embrio nakillerinden sonra HCG hormonu enjekte edilen ineklerde aksesör corpus luteum'ların şekillendiğini ve kan progesteron hormonu düzeylerinin diğerlerine kıyasla yüksek olduğunu, böylece gebelik şansının bu yolla arttırılabileceğini ileri sürmektedirler. Veledez ve ark. (19) ise HCG nin sadece düvelerdeki progesteron düzeyini yükselttiğini, ineklerde ise önemli bir etkisi olmadığını iddia etmektedirler. Bu çalışmada ise nakil yapılan düvelere herhangi bir hormon uygulaması yapılmamıştır.

Massip ve ark. (11) embrioları pyrex ampullerde ve plastik payetlerde dondurmuşlar, payetlerin embrionun gelişmesi ve gebelik oranı yönünden daha uygun olduğunu belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada da 0.25 ml.lik payetlerde dondurulmuş embriolar kullanılmıştır.

Bondurant ve ark.(1) iki ayrı teknisyen kullanarak yaptıkları embrio nakillerinde alınan sonuçlar arasında önemli farklılıklar olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada nakiller 4 ayrı Veteriner Hekim tarafından yapılmış olup, diğer bazı faktörleri elemine etmek mümkün olmadığından uygulayıcılar arasında bir mukayese imkanı olmamıştır. Ancak bu konuda deneyimin önemli rolü olduğu bir gerçektir.

Sonuç olarak, iyi kalitede ve erken gelişme aşamasındaki embriolar kullanılarak, taşıyıcı olarak kullanılan düvelerin döl sağlıkları devamlı kontrol altında tutularak ve embrio nakli ile ilgili çeşitli işlemlerde deneyim kazanılarak gebelik oranlarının daha da yükseltilebileceği kanısına varılmıştır.



### KAYNAKLAR

1. BONDURANT, R.H., ANDERSON, G.B., BOLAND, M.P., CUPPS, P.T., HUGHES, M.A. (1982): Preliminary studies on bovine embryo survival following short-thenn storage at 4 C, *Theriogenology* , 17, 2, 223-230.
2. CHUPIN, D., FLORIN, B., PROCUERUR, R. (1984): Comparison of two methods for one-step in-straw thawing and direrct transfer of cattle blastocysis, *Theriogenology*, 21, 3, 455-459.
3. ELSDEN, R.P., SEIDEL, G.E., TAKEDA, T., FARRAND, G.D. (1982): Field experiments with frozen thawed bovine embryos transferred nonsurgically, *Theriogenology* , 17, 1, 1-9.
4. FRANKS, G.C., COLEY, S.L., BETTERBED, B., PAGE, R.R. (1986): The effects of cryo protective agents, dilution rates, freezing rates and freezing units on the survival of bovine embryos, *Theriogenology*, 26, 2, 135-143.
5. GARCIA, M.A., FAHNING, M.L., GRAHAM, E.F. (1986): Invitro culture, freezing, thawing and transfer of bovine embryos versus transfer of fresh embryos from the same collection: Preliminary results, *Theriogenology*, 26, 6, 803-812.
6. GREVE, T., JENSEN, H.L. (1982): The effect of HCG administration on pregnancy rate following non-surgical transfer of viable bovine embryos, *Theriogenology*, 17, 1, 91.
7. HUBBERT, K.G., HOPKINS, S.M. (1984): Bovine embryo transfer-Present and Future, *Iowa State Veterinarian*, 46, 2, 113-116.
8. KENNEDY, L.G., BOLAND, M.P., GORDON, I. (1983): The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos, *Theriogenology*, 19, 6, 823-831.
9. LEIBO, S.P. (1984): A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos, *Theriogenology*, 21, 5, 767-790.
10. MAPLETOFT, R.J. (1986): Embryo transfer and genetic engineering: Introduction, "As guated", Morrow, D.A. (Editor) *Current Therapy in Therlogenology*, W.B. Saunders, 51-53, London.
11. MASSIP, A., ZWALMEN, V.P., ECTORS, F., COSTER, R.D., LETEREN, C.D., HANZEN, C. (1979): Deep freezing of cattle embryos in glass ampules or french straws, *Theriogenology*, 12, 2, 79-84.
12. NIEMANN, H., LAMPETER, W.W., SACHER, B., KRUFF, B. (1982): Comparison of survival rates of day 7 and day 8 bovine embryos after fast freezing and thawing, *Theriogenology*, 18, 4, 445-452.

13. RENARD, J.P., OZIL, J.P., HEYMAN, Y. (1981): Cervical transfer of deep frozen cattle embryos, *Theriogenology*, 15, 3, 311-320.
14. SCHNEIDER, H.J., CASTLEBERRY, R.S., GRIFFIN, J.L. (1980): Commercial aspects of bovine embryo transfer, *Theriogenology*, 13, 1, 73-85.
15. SEIDEL, G.E., ELSDEN, R.P., TAKEDA, T., FARRAND, G.D. (1983): Field trials with cryopreserved bovine embryos, "As guated", Beier, H.M. and Linder, H.R. (Editors) *Fertilization of the Human Egg In vitro*, Springer-Verlag, 343-352, Berlin.
16. BPEA, B.F., JANZEN, R.E., MCALISTER, R.J., MCDERMAND, D.P. (1983): Freezing of bovine embryos: Effects of embryo quality, time from thawing to transfer and number frozen per vial, *Theriogenology*, 20, 2, 205-212.
17. SREENAN, J.M. (1988): Embryo transfer: Its uses and recent developments, *Vet. Rec.*, 122, 624-629.
18. STRINGFELLOW, D.A., THOMSON, M.S., RIDDELL, K.P. (1987): Morphological characteristics and quality assessment of transfer-stage bovine embryos, *Auburn Veterinarian*, 42, 2, 6-10.
19. VALADEZ, S.S., SEIDEL, G.E., ELSDEN, R.P. (1982): Effect of HCG on pregnancy rates in bovine embryo transfer recipients, *Theriogenology*, 17, 1, 85.
20. VALEDEZ, S.S., TERVIT, H.R., ELSDEN, R.P., SEIDEL, G.E. (1981): Transport of frozen cattle embryos from USA to Mexico, *Theriogenology*, 15, 1, 123.
21. WILMUT, I., ROWSON, L.E.A. (1973): Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos, *Vet. Rec.*, 92, 686-690.
22. WRIGHT, J.M. (1985): Commercial freezing of bovine embryos in straws, *Theriogenology*, 23, 1, 17-30.