

İNEKLERDE SÜPEROVULASYON VE EMBRİYO TRANSFERİ ÇALIŞMALARI* (Study of Superovulation and Embryo Transfer in Cattle)

Numan AKYOL¹

S.Hamdi KIZIL¹

P.Barbaros TUNCER¹

¹ Dr. Vet. Hekim. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.

ÖZET

Bu çalışmada; enstitü şartlarında süperovulasyonları yapılan hayvanların embriyo transferleri gerçekleştirilerek, elde edilen embriyoların taze transferleri yapılmış ve gebelik sonuçları incelenmiştir.

Süperovulasyonları yapılan 12 baş inekte gerçekleştirilen 22 uterus yıkaması sonucu 75 embriyo ve ovum bulunmuştur. Bunlardan, 20'si (%26.6) iyi, 10'u (%13.3) vasat, 4'ü (%5.3) zayıf kalitede, 25'i (%33.3) dejenere ve 16'sı (%21.3) döllenmemiş ovum olarak tespit edilmiştir. Taze olarak transferleri yapılan 10 embriyodan 7 (%70) gebelik sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Süperovulasyon, Taze embriyo, PMSG, Transfer.

SUMMARY

In this study, Superovulation and Embryo Transfer was applied under the institute circumstances and results were investigated after fresh embryo transfer into the recipients.

12 donors were superovulated and 22 embryo recovering were done. As a result of this study 75 ova and embryos which 20 (26.6%) good, 10 (13.3%) fair, 4(5.3%) poor quality, 25(33.3%) degenerated and 16 (21.3%) unfertilized ova were found. 7 (70%) pregnancy were provided from 10 fresh embryo transferred.

Key Words : Superovulation, Fresh embryo, PMSG, Transfer.

GİRİŞ

Döl veriminin artırılmasına ve hayvan ıslahının geliştirilmesine yönelik çalışmaların başında suni tohumlama ve embriyo transferi gelmektedir. Normal koşullarda bir inekten hayatı boyunca 5-6 yavru alınırken, embriyo transferi ile yılda 20 yavru alınması mümkün olmaktadır (8).

İneklerde ilk başarılı embriyo transferi (ET) 1951 yılında Willet ve arkadaşları tarafından Amerika'da, Cornell Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiştir. Sugie ise 1965 yılında ineklerde cerrahi olmayan yöntemle dünyada ilk kez embriyo transferi uygulamıştır. 1970'ten sonra Amerika ve Kanada'da ET ticari anlamda düşünölmeye ve 20 farklı merkezde ET çalışmaları yapılmaya başlanmıştır (8). 1979 yılında Kuzey Amerika'da embriyo transferi yoluyla elde edilen buzağı sayısı 17000 iken, 1999 yılında 197886 olmuştur (15, 18). Hollanda'nın embri-

yo transferi ile tanışma yılı olan 1981'de 500 adet embriyo transferi yapıldığı, 1996 yılında bu rakamın 30000 embriyo transferi olarak gerçekleştiği bildirilmektedir (14).

Hayvancılık alanında üretimin ve kalitenin artırılması yönünde yalnızca embriyo transferi değil, bu teknikle bağlantılı bir çok yöntem de (in vitro fertilizasyon, embriyoda cinsiyet tayini vb.) kullanılmaya başlanmıştır.

Türkiye'de embriyo transferi çalışmalarına ilk olarak; 1981 yılında tavşanlar (9) ve 1983 yılında fareler üzerinde (19) araştırma boyutlu olarak başlanmıştır. 1984 yılında koyunlarda (10) ve 1986 yılında da ineklerde cerrahi olmayan yöntemle embriyo transferi çalışmaları devam etmiştir (7). Ancak embriyo transferi tekniğinin sahaya aktarılması konusunda günümüze değin bir ilerleme kaydedilememiştir.

* : Bu Proje T.K.B. (TAGEM-HAYSÜD-09-03-02) tarafından desteklenmiştir.

Yeni doğan bir dişi buzağının ovaryumlarında binlerce ovum taslağı olmasına rağmen hayatı boyunca bunlardan çok azı gelişme şansı bulmakta ve ovule olmaktadır. Süperovulasyon, ovulasyon şansı bulamayan ovumlara bu fırsatı vererek ekonomik potansiyeli artırdığından, embriyo transferiyle birlikte uygulanmaktadır (12). Bu amaçla en yaygın olarak FSH, daha az olarak PMSG hormonları kullanılmaktadır. FSH domuz ve koyun hipofiz bezi ekstraktından, PMSG ise gebe kısırakların serumlarından elde edilmektedir (1, 3).

Süperovulasyonun başarısı; yaş, ırk, mevsim ve kullanılan gonadotropik hormonun çeşidi gibi birçok faktörden etkilenmektedir (6). Süperovulasyon amacıyla kullanılan hormon ne olursa olsun, sonuçta ne kadar embriyo elde edileceği net olarak anlaşılamadığından, özellikle taze transfer yapılacak durumlarda buna bağlı olarak ne kadar sayıda taşıyıcı sinkronize edilmesi gerektiği tam olarak tespit edilememektedir. Dolayısıyla, ortalama bir miktarda taşıyıcı sinkronizasyon için ayrılmakta ve bir kısım hayvana da, boşuna hormon uygulaması yapılmış olmaktadır. Bu sayılanlar günümüzde bile embriyo transferinin en büyük handikaplarını oluşturmaktadır. Uterus yıkaması için Dulbecco'nun modifiye tampon solüsyonu veya laktatlı ringer solüsyonu kullanılmaktadır (8).

Bu çalışmayla, enstitü şartlarında ineklerde süperovulasyonlar yapılarak elde edi-

len embriyolar değerlendirilmiş, taze transferler gerçekleştirilmiş ve gebelik sonuçları incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Bu çalışmada Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü bünyesindeki hayvanlar kullanılmıştır. Donör olarak 3-5 yaşlı 4 baş Esmer, 8 baş Siyah Alaca olmak üzere toplam 12; taşıyıcı olarak 8 baş Siyah Alaca, bir Esmer ve bir melez olmak üzere toplam 10 baş inek araştırmanın materyalini oluşturmuştur.

Süperovulasyon amacıyla PMSG (Syncro-part6000/DİF), sinkronizasyon amacıyla Prostaglandin (Dalmazin/Fatro), uterus irrigasyonu amacıyla %1 CS (Buzağı serumu-Sigma) ve 125 mg Kanamisin (Kanovet/Vetaş) içeren Laktatlı Ringer (Eczacıbaşı) solüsyonu, embriyoları uterustan toplamak amacıyla ise çift yönlü silikon balon kateter kullanılmıştır.

Metot

Seksüel siklusları takibe alınan dişilerden korpus luteum taşıyanlar rektal muayene ile tespit edilip, bunlara PG enjeksiyonu (2 ml/i.m.) yapılmıştır. Kızgınlığı takip eden 10. gün PMSG (2500IU/i.m.) ve 12. gün, PG enjeksiyonu yapılmıştır. Östrus tespiti amacıyla hayvanlar, günde üçer kez 30 dakika gözlenmiştir. Östrus belirtilerini takip eden 12 ve 24. saatlerde dondurulmuş sperma ile tohumlamalar gerçekleştirilmiştir.

Östrus	PMSG	PG	1.ST	2.ST	Uterus Yıkaması	
0	10	12	14	15	22	gün

Donörlerin süperovulasyon programı

Uterus irrigasyonu, laktatlı ringer solüsyonuyla gerçekleştirilmiş ve stereo mikroskop altında embriyoların izolasyonu yapılarak %20 CS + %0.4 BSA (Sığır Serum

Albumini) içeren PBS solüsyonu içerisine aktarılmıştır. Uterus yıkamaları, ilk tohumlamayı izleyen 7. günde gerçekleştirilmiştir. Cerrahi olmayan metotla kornu uteriler

300-500 ml laktatlı ringer kullanılarak ayrı ayrı yıkanmıştır. Yıkama amacıyla 37°C sıcaklıkta ve içerisinde laktatlı ringer solusyonu bulunan şişe, hayvanın sakrumundan yaklaşık 1 metre kadar yukarı asılarak, yıkamanın yerçekimi yardımıyla yapılması sağlanmıştır. Balon kateter, uterusun bifurkasyo noktasından yaklaşık olarak 5 cm ileride 15-20 ml hava ile şişirilerek, irrigatör solusyon önce küçük hacimler (50 – 70 ml) şeklinde uterusu verilmemiş, arkasından sıvı akışının kendiliğinden kesilmesi beklenmiştir. Uterus kornusuna dolan sıvıyı boşaltmak amacıyla öncelikle uterus pelvis çatısı üzerine çekilerek uygun boşalma pozisyonuna getirilmiş, sonra klips açılıp, kornulara masaj yapılarak sıvının kolaylıkla boşaltılması temin edilmiştir. Filtrasyon amacıyla 70 µm genişliğinde gözenekleri olan filtreler (EMCON filtre) kullanılmış ve her yıkantı 3 adet petri içerisine alınmıştır. Bulunan embriyolar kültür mediumuna aktarılmış ve oda sıcaklığında tutulmuştur. Bulunan embriyolar kalite ve gelişim safhalarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (11);

A. Kalitelerine göre

1. Transfer edilebilir embriyolar

a- İyi kalite embriyolar (A) : Normal gelişim gösteren, dejenerasyon bölgesi bulunmayan veya %10'un altında olan ya da birkaç vezikül içeren, zonası sağlam, homojen dağılımlı, küresel embriyolar.

b- Vasat kalite embriyolar (B) : İyi embriyo vasıflarından biraz sapma gösterenler, vezikül sayısı artmış, dejenere bölgeleri % 10-30 arasında olan embriyolar

2. Transfer için uygun olmayan embriyolar

a- Zayıf kalite embriyolar (C) : %30-50 arasında dejenerasyon bölgesi olan, blastomer kopmaları ve homojen olmayan hücre yığınları bulunan embriyolar

b- Dejenere embriyolar (D) : Dejenere bölgeleri % 50 den fazla olan embriyolar.

c- Unfertilize ovum (UFO): Döllenmemiş ovum.

B. Gelişim safhalarına göre

a- *Kompakt Morula* : Blastomerleri sıkı sıkıya birleşerek yığın halini almış ve perivitellin boşluğun yaklaşık % 70'ini doldurmuş embriyolar

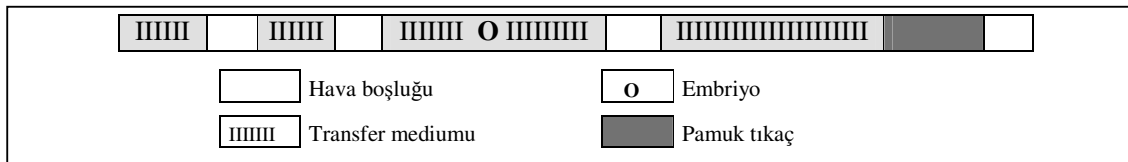
b- *Erken Blastosist* : Blastosel meydana gelmiş

ve perivitellin boşluğun yaklaşık % 80'ini doldurmuş embriyolar

c- *Blastosist* : Blastosel ile dolmuş halde, perivitellin boşluk kalmamış ve "inner cell mass" belirgin hale gelmiş embriyolar.

Taze olarak transfer edilecek embriyolar, 0.25 ml'lik steril payetlere kültür mediumu (%20 CS + %0.4 BSA + PBS) içerisine alınarak transfer gerçekleştirilmiştir. Taze embriyo transferinden önce, rektal muayene ile korpus luteum (CL) yerleri tespit edilmiştir.

Transfer amacıyla hayvana üst epidural anestezi (%2 Lidokain hidroklorür) yapılarak uterusun gevşemesi sağlanmış ve transferler ipsilateral olarak yapılmıştır. Embriyo transferlerinden 8-10 hafta sonra rektal muayene ile gebelikler kontrol edilmiştir. Sinkronizasyon farklılıkları ile gebelik arasındaki ilişki "t" testi ile analiz edilmiştir.



Embriyo ve mediumun payet içerisindeki konumları

BULGULAR

Donorlerde yapılan toplam 22 uterus irrigasyonu sonucu 75 adet embriyo toplanmış ve bunlardan 30 adedinin transfer edilebilir embriyo olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen embriyoların, 20'si (%26.6) iyi, 10'u (%13.3) vasat ve 4'ü (%5.3) zayıf kalitede bulunmuştur (Tablo 1).

Yapılan taze nakillerde sinkronizasyon farklılıkları Tablo 2'de gösterilmiştir. Sinkronizasyon farklılıkları, gebe kalan hayvanlarda ortalama 8.57 ± 1.21 saat, gebe kalmayanlarda ise 20.00 ± 4.00 saat olarak tespit edilmiştir. Bu iki gruba ait sinkronizasyon ortalamaları arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Tablo 1. Elde edilen embriyoların gelişim safhaları ve kalitelerine göre durumları

	Kompakt Morula	Erken Blastosist	Blastosist	Toplam
İyi	3	7	10	20
Vasat	4	3	3	10
Zayıf	-	1	3	4
Toplam	7	11	16	34

Tablo 2. Taze nakillerde donör ve taşıyıcı sinkronizasyon farkları ve taşıyıcı CL durumları

Nakiller		1.i	2.i	3.i	4.i	5.i	6.i	7.i	8.i	9.i	10.i	Ortalama	Önemlilik
Gebe	Sink. Farkı (Saat)	+12	-6	+12	+6		+12			+6	+6	8.57 ± 1.21	*
Gebe Değil	Sink. Farkı (Saat)					+24		+24	+12			20.00 ± 4.00	

i: inek *: $p < 0.05$

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada; 12 vericiden toplam 22 uterus yıkaması gerçekleştirilerek 75 adet embriyo ve ovum elde edilmiştir. Bu embriyolardan 30'u transfer edilebilir (iyi/vasat) özellikte bulunmuştur. Transfer edilebilir özellikteki embriyolardan 10'u taze olarak taşıyıcılara transfer edilmiş ve taze transferlerden 7 (%70) gebelik sağlanmıştır. Taze transferlerde elde edilen gebelik sonuçları, yapılan çalışmaların bazılarıyla uyumlu bulunmuş (2, 14), bazı çalışmalara göre de yüksek değer elde edilmiştir (5, 16).

Süperovulasyon uygulamalarında donörlerin cevabı çok değişken olmaktadır (4). Süperovulasyonlar arasında 45-60 günlük bir süre bırakılması gerekmekte, aksi halde elde edilen embriyo sayı ve kalitesi olumsuz yönde etkilenmektedir (8, 13). Bu çalışmada süperovulasyonlar arası belirtilen süreye uyul-

muş olmasına rağmen donör başına elde edilen embriyo sayı ve kalitesi bazı çalışmalara göre düşük bulunmuştur (17, 18). Kullanılan hormon farklılığı, donörlere ek besleme programı uygulanmayışı ve kişisel tecrübeyle ilgili olarak bu düşüklüğün ortaya çıktığı düşünülmektedir.

PMSG'nin elde edilen embriyo sayı ve kalitesi üzerindeki olumsuz etkisi bilinmekte ve elde edilen dejenere embriyo sayısı yüksek bulunmaktadır (3, 13). Bu çalışmada, dejenere embriyo sayısının diğer çalışmalara göre yüksek çıkmasının nedeninin, kullanılan PMSG preparatıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Zira PMSG ile yapılan diğer çalışmalarda daha düşük sayıda dejenere embriyo elde edilmiştir (2, 12).

Dünyada ıslah çalışmalarında önemli bir yer tutan embriyo transferinin, Türkiye'de

yerleşmesi ve yaygınlaşması için yetişmiş eleman ihtiyacı karşılanarak fiziki altyapının geliştirilmesi gerekmektedir. Sunulan çalışma da, bu amaca hizmet etmiş ve başarılı bir uygulama olmuştur.



Resim 1. ET buzağları



Resim 2. Taşıyıcı anne ve ET buzağı

LİTERATÜR LİSTESİ

1. **Akyol N (2001)**. Siğir Embriyo Transferinde Hormon Kullanımı. Lalahan Hay. Arş. Derg. 41; 1, 95-104.
2. **Armas R-de, Solano R, Caral J (1986)**. Non-surgical E.T. in Cattle by means of a transcervical method. Revista-Cubana de Repr. Anim. 12; 2, Abstr.
3. **Boland MP, Goulding D, Roche JF (1991)**. Alternative Gonadotrophins for Superovulation in Cattle. Theriogenology, 35; 1, 5-17.
4. **Callesen H, Liboriussen, Greve T (1996)**. Practical Aspects of Multiple Ovulation - Superovulation in Cattle. Animal Repr. Sci. 42; 215-226.
5. **Chava J (1988)**. Work of the E.T. association. Simmentaler fleckvien. CAB Abstr. No: 8
6. **Donaldson LE (1984)**. Embryo Production in Superovulated Cows: Transferable Embryos Correlated with Total Embryos. Theriogenology, 21; 4, 517-523.
7. **İleri İK, Sayın T (1986)**. Siğirlerde Embriyo Transfer Çalışmaları. İst. Üniv. Vet. Fak. Derg. 12; 1, 23-35.
8. **Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N (1995)**. Manual of Bovine Embryo Transfer. JLTA, Shirakawa, Japan.
9. **Kılıçoğlu Ç, Tekeli T (1981)**. Tavşanlarda Embriyo Transferi. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 28, 1-4: 23-35.
10. **Kılıçoğlu Ç (1984)**. Koyunlarda Embriyo Nakli Üzerinde Çalışmalar. Doğa Bilim Derg. Seri:D1 8; 3, 257-270.
11. **Lindner GM, Wright RW Jr (1983)**. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20; 4, 407-416.
12. **Mori J (1999)**. Advances in Farm Animal Embryo Transfer Hormone Research. Textbook, NLBC-JICA. Japan.
13. **Reichen F (1986)**. From the Report of the Society for E.T. Simmentaler fleckvien.No: 8 Abstr.
14. **Rodewijk H (1997)**. Embryo Transfer in the Dairy Herd. Veepro Magazine, 29; 12-14.
15. **Seidel GE Jr (1981)**. Superovulation and Embryo Transfer in Cattle. Science, 211; 351-357.
16. **Sönmez MEC, Özkoca A ve İleri İK (1992)**. Siğirlerde Embriyo Transferi tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanaklarının Araştırılması. İst. Üniv.Vet. Fak. Derg: 18:2, 45-62
17. **Sungur H, Kinet H, Eroğlu A, Tulgar N (1991)**. Siğirlerde Süperovulasyon ve Embriyo Transferi Üzerine Çalışmalar. Türk Vet. Hek. Derg. 1: 11, 16-19.
18. **Thibier M (2000)**. The IETS Statistics of Embryo Transfers in Livestock in the World for the year 1999: A new Record for Bovine in vivo-Derived Embryos Transferred. Embryo Transfer Newsletter, 18; 4, 24-28.
19. **Ünal EF (1983)**. Farelerde Embriyo Transferi. (Doktora Tezi). A. Ü. Veteriner Fakültesi, Ankara.