

## Süperovulasyon Uygulamasına Farklı Irkların Verdikleri Cevapların Araştırılması

### Investigation of the Response of Different Breeds to the Superovulation Treatment

#### Özet

Bu çalışma, süperovulasyon programı uygulanan 3 farklı sığır ırkının (Simental, Siyah-Alaca ve Esmer) süperovulasyon uygulamasına verdikleri cevapların ve elde edilen embriyo kalitelerinin karşılaştırılması amacıyla yapıldı. Çalışmada her ırktan en az bir doğum yapmış aynı yaş ve kondisyonlara sahip inekler kullanıldı. Her ineğe östrus siklusunun herhangi bir döneminde 1.38 g progesteron içeren intravaginal CIDR (Pfizer Inc., New York, USA) 9 gün süreyle uygulandı. Her ineğe progesteron uygulamasının 7. gününden başlamak üzere günde 2 defa, 4 gün boyunca toplam 400 mg i.m. FSH (PLUSET/Laboratorios Calier) uygulaması yapıldı. Bütün hayvanlara 5. FSH uygulaması ile birlikte 150 µg. d-choprostenol (Dalmazin/Vetaş) yapıldı ve 6. FSH uygulaması ile birlikte CIDR uzaklaştırıldı. Son FSH uygulamasının ardından östrus belirtilerinin 12. ve 24. saatlerinde suni tohumlama yapıldı. İlk suni tohumlamadan 7 (yedi) gün sonra non-surgical yöntemle uterus yıkaması yapılarak embriyolar toplandı. Elde edilen sonuçlara göre Simental ırkı ineklerin süperovulasyon uygulamasına olan cevabının diğer ırklardan daha iyi olduğu gözlemlendi.

**Anahtar kelimeler:** Süperovulasyon, Embriyo, Simental, Siyah Alaca, Esmer

#### Abstract

This study was carried out to compare three different breeds (Simmental, Holstein and Brown Swiss) for the response to the superovulation program and embryo quality. Cows from each breed which have given at least one birth and which are at the same age and conditions were used. Regardless of the period of the oestrus cycle, intravaginal CIDR (Pfizer Inc., New York, USA) implant including 1.38 g progesteron was applied to each cow and kept 9 days long. A total of 400 mg i.m. FSH (PLUSET/Laboratorios Calier) was injected twice a day during 4 days from 7th day after implantation of CIDR to cows. All animals were injected 150 µg d-choprostenol (Dalmazin/Vetaş) together with 5th FSH injection, and right after 6th FSH injection CIDR was removed. After the last FSH injection, in the 12th and 24th hours from the beginning of oestrus, cows were inseminated. Seven days after first insemination, embryos were collected via non-surgical uterine flushing. According to the results, superovulation response was better in Simmental cows than the others. The best response for superovulation in FSH hormone was also observed in Simmental breed cows.

**Key Words:** Superovulation, Embryo, Simmental, Holstein, Brown Swiss

**Tahir KARASAĞIN<sup>1</sup>,**  
Sedat Hamdi KIZIL<sup>2</sup>,  
Muharrem SATILMIŞ<sup>2</sup>,  
Numan AKYOL<sup>3</sup>,  
Şükrü DURSUN<sup>4</sup>,  
Mesut KIRBAŞ<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Aksaray Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi, Fizyoloji  
Anabilim Dalı, Aksaray-Türkiye

<sup>2</sup> Uluslararası Hayvancılık  
Araştırma Ve Eğitim Merkezi  
Müdürlüğü, Ankara-Türkiye

<sup>3</sup> Kırıkkale Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi, Dölerme ve  
Sunı Tohumlama Anabilim  
Dalı, Kırıkkale-Türkiye

<sup>4</sup> Aksaray Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi, Doğum ve  
Jinekoloji Anabilim Dalı,  
Aksaray-Türkiye

<sup>5</sup> Bahri Dağdaş Uluslararası  
Tarımsal Araştırma Enstitüsü  
Müdürlüğü, Konya-Türkiye

#### Sorumlu yazar

Doç. Dr. Tahir KARASAĞIN

Aksaray Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi Fizyoloji Anabilim  
Dalı Adana Yolu Üzeri E-90  
Karayolu 7. Km, 68100  
Aksaray / TÜRKİYE

[tahirkarasahin@gmail.com](mailto:tahirkarasahin@gmail.com)

Copyright © 2016 JAVST

## Giriş

Embriyo transfer (ET) teknolojisi genetik ilerlemeyi hızlandırmak ve yüksek genetik kapasiteye sahip donörlerden elde edilen yavru sayısını artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Baruselli vd, 2006; Bülbül vd, 2010; Mapletoft vd, 2002). Sığırlarda genetik ilerleme ve yetiştirme için uzun süreçlere ihtiyaç vardır. Embriyo transferi teknolojisi genetik ilerlemenin süresinin kısaltılması açısından önemlidir (Nilchuen vd, 2011; Barati vd, 2006). Embriyo transferinin en önemli ve vazgeçilmez unsurlarından biri de süperovulasyondur. Süperovulasyonun amacı, fazla sayıda follükülleri baskı altına alarak onları ovulasyon için hazır hale getirmektir (Akyol vd, 2014). Sığırlarda embriyo üretim çalışmaları yaygın olarak yapılmaktadır (Quaresma vd, 2003). Süperovulasyon ve embriyo toplamak için birçok farklı protokol olmasına rağmen, bu protokoller son derece değişken sonuçları ortaya koymaktadır (Silva vd, 2009). Bos Taurus'larda süperovulasyon başına ortalama 5-6 adet transfer edilebilir embriyo elde edildiği bildirilmektedir (Hasler, 1992). İneklerden bireysel olarak embriyo elde etme oranlarında çok geniş değişikliklerin olması süperovulasyon uygulamasının doğal olmayan prosedüründen kaynaklanabilmektedir (Stroud ve Hasler, 2006). Donör sığırlardan elde edilen embriyo kalitesine, iç ve dış faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Silva vd, 2009). İç faktörler arasında ırk, yetiştirme, gonadotropinlere karşı bireysel duyarlılık, yaş, beslenme alışkanlıkları ve sağlık durumu etkili olmaktadır (Akyol vd, 2014; Silva vd, 2009). Dış faktörler arasında FSH'nın değişik ticari preparatlarının kullanılması, dozu, uygulama şekli ve mevsim sayılabilir (Kafı ve McGowan, 1997).

Bu çalışmada; Simental, Holsteyn ve İsviçre Esmeri ırkların süperovulasyon uygulamalarına verdikleri cevaplarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Her bir ırktan en az bir doğum yapmış üçer baş donör inek embriyo elde etmek amacıyla kullanıldı. Çalışmada kullanılan donörler farklı zamanlarda birden fazla defa kullanılmıştır. Siyah Alaca ırkında (H grubu) 11, Esmer ırkta (E grubu) 9 ve Simental ırkında (S grubu) 12 uterus yıkama işlemi gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan hayvanların yaşama ve verim payları hesaplandı. Tüm hayvanlara kuru yonca otu, kuru çayır otu ve arpa samanı ile birlikte konsantre yem ile günde iki defa beslendi. Su ise ad libitum olarak verildi. Hayvanlar yarı açık serbest sistem ahırlarda barındırıldılar. Bütün hayvanlara östrus siklusunun dönemine bakılmaksızın 9 gün süreyle 1.38 g progesteron içeren intravaginal CIDR (Pfizer Inc., New York, USA) uygulandı ve bu uygulama zamanı sıfırinci (0) gün olarak kabul edildi. Sığırlara CIDR takılmasını takip eden 7. günden itibaren dört gün boyunca günde iki kez azalan dozlarda sabah akşam (80:80 mg, 60:60 mg, 40:40 mg, 20:20 mg) olacak şekilde toplam 400 mg/i.m. FSH (Folltropin-V-Bioniche, Belleville, Ontario Canada) uygulandı. Bütün hayvanlara 5. FSH enjeksiyonu ile birlikte 150 µg. d-kloprostenol (Dalmazin/Vetaş) uygulandı ve 6. FSH enjeksiyonu ile birlikte CIDR uzaklaştırıldı. Son FSH uygulamasının 12. ve 24. saatlerinde inekler 2 kez tohumlandı. Suni tohumlamadan sonraki 7. günde %1 buzağı serumu (CS) (N4762, SİGMA) ve antibiyotik (125 mg/l Kanamisin) içeren laktatlı ringer solüsyonu (Eczacıbaşı) ile uterus yıkama işlemi yapılarak embriyolar toplandı. Uterus yıkamasını takiben elde edilen süzöntü laboratuvarında mikroskop altında tarandı. Bulunan embriyolar Phosfat Buffer Solüsyonu (PBS) + %20 CS + %04 Bovine Serum Albümine (BSA) (A9647) solüsyonu içerisine aktarılarak stereo mikroskop altında değerlendirilip kalite ve gelişim safhalarına göre sınıflandırıldı. Elde edilen embriyolar

IETS'nin (Wright JM (1998), belirlediği kriterlere göre kalite sınıflandırması yapıldı.

### Bulgular

Çalışma sonucunda süperovulasyon uygulamasına ırklar bazında elde edilen bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Bu çalışmada H grubunda 11, E grubunda 9 ve S grubunda 12 uterus yıkama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen korpus luteum sayıları, ovum-embriyo kazanma, transfer edilebilir embriyo, dejenere embriyo ve fertilize olmamış oosit değerleri; H grubunda sırasıyla  $8.36 \pm 2.37$ ,  $70.65$  (65/92),  $3.27 \pm 2.05$ ,  $1.45 \pm 0.92$ ,  $1.18 \pm 1.28$ , E grubunda,  $10.22 \pm 2.62$ ,  $95.65$  (88/92),  $3.66 \pm 2.67$ ,  $1.56 \pm 1.01$ ,  $4.33 \pm 1.14$ , S grubunda,  $15.92 \pm 2.27$ ,  $83.24$  (159/191),  $6.83 \pm 1.96$ ,  $3.33 \pm 0.88$ ,  $3.08 \pm 1.22$  olarak tespit edildi. Irklar arasında CL sayısı ve embriyo kazanma oranı bakımından gruplar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Transfer edilebilir embriyo ve transfer edilemeyen embriyo bakımından gruplar arası istatistik olarak fark gözlenmemiştir ( $P > 0.05$ ). Hesaplamalarda one way anova kullanılmıştır. S grubunda hayvan başına  $15.92 \pm 2.27$  olan CL ortalaması, H grubundan elde edilen sonuçlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Geri kazanma oranları bakımından Esmer ırkın süperovulasyonu sonucunda tespit edilen korpus luteumlara ait hücrelerin büyük bir çoğunluğunun elde edildiği (% 95.65) ve bu oranın diğer 2 ırka ait geri kazanımdan yüksek olduğu görülmüştür ( $P < 0.05$ ).

### Tartışma

Bu çalışma 3 farklı sığır ırkına uygulanan (Siyah Alaca, Esmer ve Simental) süperovulasyon programının elde edilen embriyo sayı ve kalitesi üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla gerçekleştirildi. Sığırlarda süperovulasyon programını etkileyen çok çeşitli

faktörler vardır. Bu faktörler arasında en önemlileri; hayvanların ırkı ve yetiştirildiği çevredir (Mapletoft vd, 2002). Çevresel faktörler arasında; beslenme durumu, üreme geçmişi, sezon, yetiştirme tarzı ve ovaryumların uygulama sırasındaki durumları süperovulasyonu etkileyen faktörlerdendir (Mapletoft vd, 2002). Embriyo üretimini sınırlayan temel faktörlerden biri, ticari olarak süperovulasyon amacıyla kullanılan gonadotropinlerin ovaryumlar üzerindeki etkisi ve yeterli sayıda oosit ovulasyonu sağlamasıdır (Kelly vd, 1997).

Demczuk vd, (1998) Simental ırkı ineklerde yaptıkları çalışmada ortalama 9.8 adet transfer edilebilir embriyo elde ettiklerini belirtmişlerdir. Simental ırkı ineklerin süperovulasyonu amacıyla iki farklı FSH preparatının kullanıldığı bir çalışmada Pluset kullanılan grupta 7.56, Pluset ve Folltropin birlikte kullanıldığı grupta ise ortalama 10.44 transfer edilebilir embriyo elde edilmiştir (Nascimento, 2004). Bizim yaptığımız çalışmada FSH preparatı olarak Folltropin kullanılmış olup elde edilen transfer edilebilir embriyo sayısının bu çalışmalardan düşük olduğu görülmüştür. Bülbül vd, (2010) İsviçre Esmeri sığırlarda yaptıkları çalışmalarında ortalama 9.2 adet Cl ve 4.5 adet transfer edilebilir embriyo elde edildiğini bildirmişlerdir. Tarafımızdan yapılan çalışmada, bu çalışmaya yakın sonuçlar elde edilmiştir. Detterer vd, (1997) 2 veya daha fazla doğum yapmış Siyah Alaca ırkı ineklerde yaptıkları çalışmalarında elde ettikleri ortalama 9.23 adet embriyodan ortalama 4.46, adedinin, Viera vd, (2014) Siyah Alaca ırkı ineklerde 10.6 hücreden 7.5, Hasler vd, (1981) 3-6 yaş arası Siyah Alaca ineklerde ortalama 10.7 adet hücreden 7.1 adedinin nakledilebilir nitelikte olduğunu belirtmişlerdir. Bizim yaptığımız araştırmada ise gerek ovaryum üzerindeki Cl sayısı ve gerekse transfer edilebilir kaliteli embriyo sayısı bakımından ilgili yazarlardan daha az bulunmuştur.

Düşük olmasının en önemli sebebinin yetiştirme şartları ve beslemenin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Siyah Alaca ırkı sığırlarda yapılan bir başka çalışmada süperovulasyon başına ortalama 4.15 transfer edilebilir embriyo, 2.12 transfer edilemez embriyo elde edildiği bildirilmiştir (Hızlı vd, 2012). Multiple ovulasyon ve embriyo transfer (MOET) kapsamında Mısır'da yapılan çalışmada İsveç Esmer'i ineklerin süperovulasyon programına cevabının Siyah Alaca ineklerden daha iyi olduğu belirtilmiştir (Hüseyin vd, 2014). Yine Amerikan Embriyo Transfer Birliğinin verilerine göre süperovulasyon sonucu, etçi ırklarda ortalama 6.6, sütçü ırklarda ise 5.7 kaliteli embriyo elde

edildiği bildirilmektedir (Hasler, 2010). Sunulan çalışmada etçi özelliği ağır basan kombine ırklardan Simental ırkı ineklerden süperovulasyon sonrası elde edilen sonuçların diğer iki ırktan daha iyi olduğu görülmektedir. Özellikle ortalama CL ve transfer edilebilir embriyo sayıları bakımından daha iyi sonuçlar alınmıştır. Süperovulasyon sonrası elde edilen hücre ve embriyoların geri kazanım oranı ise Esmer ırkta %95.65 gibi oldukça yüksek bir oranda çıkmıştır. Bu durumun en büyük sebebi olarak Esmer ırk ineklerin uteruslarının anatomik yapısının manüplasyonlarda kolaylık sağlamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

**Tablo 1:** Süperovulasyon uygulaması sonucu elde edilen veriler.  
**Table 1:** The data obtained from superovulated application.

	Siyah Alaca	Esmer	Simental
N	11	9	12
Toplam CL	92	92	191
Ortalama CL	8.36±2.37 <sup>b</sup>	10.22±2.62 <sup>ab</sup>	15.92±2.27 <sup>a</sup>
Transfer edilebilir embriyo	36	33	82
Ortalama transfer edilebilir embriyo	3.27±2.05	3.66±2.67	6.83±1.96
Dejenere embriyo	16	14	40
Ortalama dejenere embriyo	1.45±0.92	1.56±1.01	3.33±0.88
UFO	13	39	37
Ortalama UFO	1.18±1.28	4.33±1.14	3.08±1.22
Toplam oosit ve embriyo	65	88	159
Geri kazanım oranı (%)	70.65 <sup>c</sup>	95.65 <sup>a</sup>	83.24 <sup>b</sup>
Folikül bulunma oranı (%)	27.27	11.11	8.33

(P<0.05)

### Sonuç

Sonuç olarak her üç ırkın embriyo transferi amacıyla süperovulasyonda kullanılabileceği kanaati oluşmuştur.

### Kaynaklar

Akyol N, Kızıl SH, Satılmış M, Karaşahin T, Erat S (2014): The results of consecutive superovulations in cows by induction with various exogenous progesterone routes. Turk J Vet Anim Sci 38: 157-160.

Barati F, Niasari\_Naslaji A, Bolourchi M., Sarhaddi F, Razavi K, Naghzali E, Thatcher WW (2006): Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. Theriogenology 66: 1149-1155.

Baruselli PS, Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bo GA (2006): Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. Theriogenology 65: 77-88.

- 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 Univ Vet Fak Derg* 16(3): 463-468.
- Demczuk E, Kozicki LE, Pontelli ES, Salles JO (1998):** Embryo transfer in Simmental cows in northwest Paraná and South of Mato Grosso do Sul. *Braz J Vet Res Anim Sci* 35(4): 174-177.
- Detterer J, Schmidt T, Harlizius B (1997):** Factors influencing the variability in superovulation results in German Holstein cattle. *Theriogenology* 47(1): 169, Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society.
- Hasler JF, Brooke GP, McCauley AD (1981):** The relationship between age and response to superovulation in holstein cows and heifers. *Theriogenology*, 15(1): 109.
- Hasler JF (1992):** Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 75: 2857-2879.
- Hasler JF (2010):** Bovine embryo transfer: are efficiencies improving? Applied Reproductive Strategies Conference Proceedings August 5th & 6th, Nashville, TN. 265-282.
- Hızlı H, Ayaşan T, Kılıçalp N, Kara U, Karakozak E, Özcan BD, Gök K, Çamlıdağ A, Çoban S, Mutlu H, Seğmenoğlu MS (2012):** Verici inek ve düvelerde tekrarlanan süperovulasyonların embriyo kalitesi üzerine etkisi. *Van Vet J*, 23(1): 11-14.
- Hussein MM, Abdel Aziz RL, Abdel-Wahab A, El-Said H (2014):** Preliminary study of factors affecting the superovulatory response of high producing dairy cows superstimulated regardless of the stage of estrous cycle in Egypt. *Beni-Seuf Univ J Appl Sci* 3: 286-292.
- Kafi M, McGowan MR (1997):** Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci* 48:137-157.
- 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. *Anim Reprod Sci* 46:1-14.
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP (2002):** Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 42: 601-611.
- Nascimento AB, Seneda MM, da Silveira EC, Pansard H (2004):** Gonadotrophin association in super-ovulation of embryo donor cows. *Cienc anim bras* 14(2): 89-94.
- Nilchuen P, Rattanatabtimtong S, Chomchai S (2011):** Superovulation with different doses of follicle stimulating hormone in Kamphaeng Saen beef cattle. *Songklanakarın J Sci Technol* 33(6): 679-683.
- Quaresma MA, Costa LL, Silva JR (2003):** Superovulation of Mertolenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLTROPIN). *Rev Port Cien Vet* 98(546): 81-84.
- Silva JCC, Alvarez RH, Zanenga CA, Pereira GT (2009):** Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. *Anim Repro* 6:440-445.
- Stroud B, Hasler JF (2006):** Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* 65: 65-76.
- Vieira LM, Rodrigues CA, Mendanha MF, Sá Filho MF, Sales JNS, Souza AH, Santos JEP, Baruselli PS (2014):** Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology* 82: 204-212.
- Wright JM (1998):** Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In, Stringfellow DA, Seidel SM (Eds): *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3rd ed., pp. 167-170, Savoy, Illinois.