

Donör İneklerde Yaş ile Embriyo Kalitesi Arasındaki İlişkinin Saptanması

Hatice HIZLI * Tugay AYAŞAN *  Kurtuluş GÖK * Uğur KARA *
Numan KILIÇALP * Aysun ÇAMLIDAĞ * Emel KARAKOZAK *
M. Seymen SEĞMENOĞLU * Hasan MUTLU * Ali ASARKAYA *

* Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, TR-01321 Adana - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-3598

Özet

Çalışmada donör ineklerde (n=165), donör yaşı ile embriyo kalitesi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Araştırmada Siyah Alaca donör inekler yaşlarına göre 3 gruba ayrılmıştır. 1. grup yaşları 2-3 yaş arasında değişen 61 inekten oluşurken, 2. grup yaşları 4-5 yaş arasında değişen 28 inekten, 3. grup ta yaşları $x \geq 6$ yaş olan 76 inekten oluşmuştur. Çalışmada donör inek yaşı, transfer edilebilen embriyo sayı ortalaması ile toplam embriyo sayı ortalamasını istatistiki olarak etkilemiş ($P < 0.05$); transfer edilemeyen embriyo sayısı gruplar arasında önemli bulunmamıştır ($P > 0.05$). Çalışmada transfer edilebilen embriyo oranı gruplarda %53.46-63.24 arasında değişim göstermiştir. Denemede donör ineklerde donör yaşı ile transfer edilebilen embriyo arasında ($r=0.142$) yine donör yaşı ile toplam embriyo arasında ($r=-0.138$) önemli bir ilişki saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: İnek, Donör yaşı, Embriyo kalitesi

The Determination of Relationship Between Age and the Quality of Embryo of Donor Cows

Summary

The relationship between donor age in donor cows (n=165) and quality of embryos was examined in this study. According to their donor age, the Holstein donors were divided into three groups. In the first group there were 61 donors between 2-3 years old; in the second group, 28 donors between 4-5 years old; and in the third group, 76 donors between ≥ 6 years old. In the study, donor cow age were affected transferable embryos and total embryo numbers statistically significant ($P < 0.05$); not transferable embryos in groups were not found statistically significant ($P > 0.05$). The transferable embryo rate in groups was found between 53.46-63.24% in the experiment. A significant correlation ($r=0.142$) was recorded, i.e. between donor age and transferable embryos; a significant correlation was recorded ($r=-0.138$), i.e. between donor age and total embryos.

Keywords: Cow, Donor age, Embryo quality

GİRİŞ

Embriyo transferi bir dizi biyoteknolojik işlemler dizisidir. Embriyo transferinde hedef, yüksek genotipik ve fenotipik kapasiteye sahip dişi hayvanlardan (donör) elde edilen yavru miktarını artırarak sürü ıslahında genetik ilerlemenin hızlandırılmasıdır. Bu konuda son yıllarda yapılan çalışmalara rağmen, bu tekniğin sonuçları tahmin edilememektedir¹. Süperovulasyon ve embriyo transfer uygulamalarının birlikte yapılmasına rağmen, bu işlemlerin

maliyetinin yüksek olması nedeniyle sürekli yeni yöntemler denenmekte veya var olan teknikler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden birisi MOET (Çoklu yumurtlatma ve embriyo transferi) yöntemidir²⁻⁴. Türkiye'nin kendi koşullarına ve yetiştiricinin taleplerine uygun, Türkiye'de yetişmiş ve seçilmiş boğalardan elde edilecek spermayı kendi üretecek duruma gelebilmesi bunun da en kısa sürede ve ucuz bir şekilde yapıla-



İletişim (Correspondence)



+90 322 388 45 00/24



tugay_ayasan@yahoo.com

bilmesi için MOET yönteminin kullanışlı bir yöntem olabileceği söylenmiştir ⁵. Donör ineklerden istenilen miktar ve kalitede embriyo elde edilmesi için ırk, yaş, canlı ağırlık, laktasyon sayısı, süt verimi, vücut kondüsyon skoru ve önceki beslenme programları dikkate alınmalıdır ^{6,7}. Geary ⁸, donör yaşının embriyonik kayıplar üzerine etkili olduğunu bildirirken; yapılan bir başka araştırmada donör inek ve düvelerin yaşı ile embriyo kalitesi ve verimi arasındaki ilişki incelenmiş ⁹, genç düvelerin ineklerden daha iyi embriyo ürettikleri ifade edilmiştir. Szabari ve ark.¹⁰ donör yaşının embriyo kalitesi üzerinde etkisinin olduğunu, Silva ve ark.¹¹ ise embriyo transferi yapılacağı zaman dikkate alınması gereken temel faktörün donör hayvanın yaşı olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada laktasyondaki donör ineklerde donör yaşı ile embriyo kalitesi arasındaki ilişki araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Donör hayvanlarda yaş ile embriyo kalitesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı ve Adana Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Hacıali İşletmesinde bulunan büyükbaş hayvancılık tesislerinde gerçekleştirilen bu çalışmada 2008-2010 yılları arasında işletmede yapılan 165 adet embriyo transfer çalışmaları ele alınmıştır. Araştırmada Siyah alaca donör inekler yaşlarına göre 3 gruba ayrılmıştır. 1. grup yaşları 2-3 yaş arasında değişen 61 inekten oluşurken, 2. grup yaşları 4-5 yaş arasında değişen 28, 3. grup ise yaşları $x \geq 6$ yaş olan 76 inekten oluşmuştur. Donör inekler düzenli östrus aktivitesi gösteren, herhangi bir hastalığı olmayan hayvanlar olup (jinekolojik muayeneleri ultrasonla yapılmıştır 5 MHz, Honda HS-101V), tüm hayvanlara kesif yem, silaj, saman ve yonca verilmiştir.

Embriyo kalitesinin saptanması, işletmede bulunan biyoteknoloji laboratuvarı'nda yapılmıştır. Süperovulasyon amacıyla FSH, senkronizasyon amacıyla prostaglandin (0.150 mg Dalmazin, Vetaş, İstanbul), uterus yıkanması için hazır flash solusyonu (%1 CS buzağı serumu-sigma, Fotal Bovine Serum Sigma F 9665 ve 125 mg kanamisin, Kanovet, Vetaş Veteriner ve Tarım İlaçları A.Ş.) embriyoları uterus-tan toplamak amacıyla çift yönlü foley kateteri kullanılmıştır. Süperovulasyon programlarında siklusu sıfırlamak için (öncesinde foliküler gelişimin senkronizasyonu amacıyla) en çok tercih edilen yöntem olan kontrollü ilaç (progesteron) salınımı yapan gereçlerin (CIDR) uygulaması (5 mg östradiol (E)-17 β + 100 mg progesteron) ile bu uygulamayı takiben siklusun 8. gününden itibaren FSH uygulanmaya başlanmış, 4 gün süreyle sabah akşam olmak üzere ikişer kez, azalan (80:80 mg, 60:60 mg, 40:30 mg, 30:20 mg) olmak üzere toplam 400 mg FSH, 4 gün süre ile kas içi uygulanmıştır. Arkasından var olan korpus luteumun, regresyonu ve ovulasyonun sağlanması amacıyla siklusun 10. gününde PGF2 α enjeksiyonu yapılmış, enjeksiyonu takip eden 36-72. saatlerde östrus gösteren hayvanlar tohumlanmış ve tohumlamayı takip eden 7 veya 8. günde uterus yıkaması (flushing) yapılmıştır. Bu

yolla siklusun 8-12. günlerinde süperovulasyona başlanan yöntemlerle embriyo elde edildiği bildirilmektedir ¹².

Uterus yıkanmasında 1000 ml'lik laktatlı-ringer solusyonu (Ringer-Fleks, Eczacıbaşı-Baxter Hastane Ürünleri, İstanbul) kullanılmıştır. Stereo mikroskop altında embriyoların tespiti yapılarak %20 CS + %0.4 BSA (Sığır serum albumini) içeren PBS solusyonu içerisine aktarılmıştır. Uterus yıkamaları, ilk tohumlamayı izleyen 7. günde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Uterus yıkamasına başlamadan önce 4-6 ml lokal anestezi (Adokain, SANOVEL ilaç San. ve Tic. A.Ş. Maslak/İstanbul) solusyonu kullanılarak üst epidural anestezi yapılmıştır. Yıkama amacıyla 37°C sıcaklıkta su banyosu ve içerisinde hazır solusyonu bulunan şişe, balon kateter(folley kateteri), uterusun bifurkasyon noktasından yaklaşık olarak 5 cm ileride 15-20 ml hava ile şişirilerek, yıkama solusyonu önce küçük hacimler (50-70 ml) şeklinde uterusu verilmiştir. Arkasından sıvı akışının kendiliğinden olması 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 μ m genişliğinde gözenekleri olan filtreler kullanılmış, her yıkantı 3 adet petri içerisine alınmış, bulunan embriyolar kültür medyumuna aktararak, oda sıcaklığında tutulmuştur. Bulunan embriyolar kalite ve gelişim safhalarına göre sınıflandırılmıştır ¹³. Embriyoların kalitelerine göre sınıflandırmasında International Embryo Transfer Society (IETS) kriterlerine göre kaliteleri ve gelişme evreleri belirlenmiştir ^{14,15}. Belirlemede şu kriterlere uyulmuştur: Çok İyi (birinci kalite): Embriyo küre şeklinde büyüklüğü rengi ve yapısı tek düze hücrelere sahip. İyi (ikinci kalite): Birkaç vezikül, düzensiz şekil ve dışarıya doğru birkaç çıkıntı gibi önemsiz birkaç kusurlara sahip embriyo. Orta (üçüncü kalite): Kusurları belirgin ancak fazla değil, blastomerler dışarıya çıkıntı yapmış, vezikülasyon ve birkaç adet dejenere hücre bulunur. Zayıf (dejenere): Kusurlar çok bariz. Çok sayıda çıkıntı yapan blastomerler, dejenere olmuş hücreler, çok sayıda büyük veziküller bulunan canlı görünümlü embriyo kümesi. Kalite 1, 2 ve 3 embriyolar transfer edilebilir embriyo olarak tanımlanmıştır.

İstatistiksel Analizler

Denemede elde edilen verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak SPSS ¹⁶ istatistiksel paket programında analizleri yapılmıştır. Donör ineklerde yaş ile toplam embriyo sayısı ve transfer edilebilir embriyo sayısı arasındaki ilişki regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmıştır.

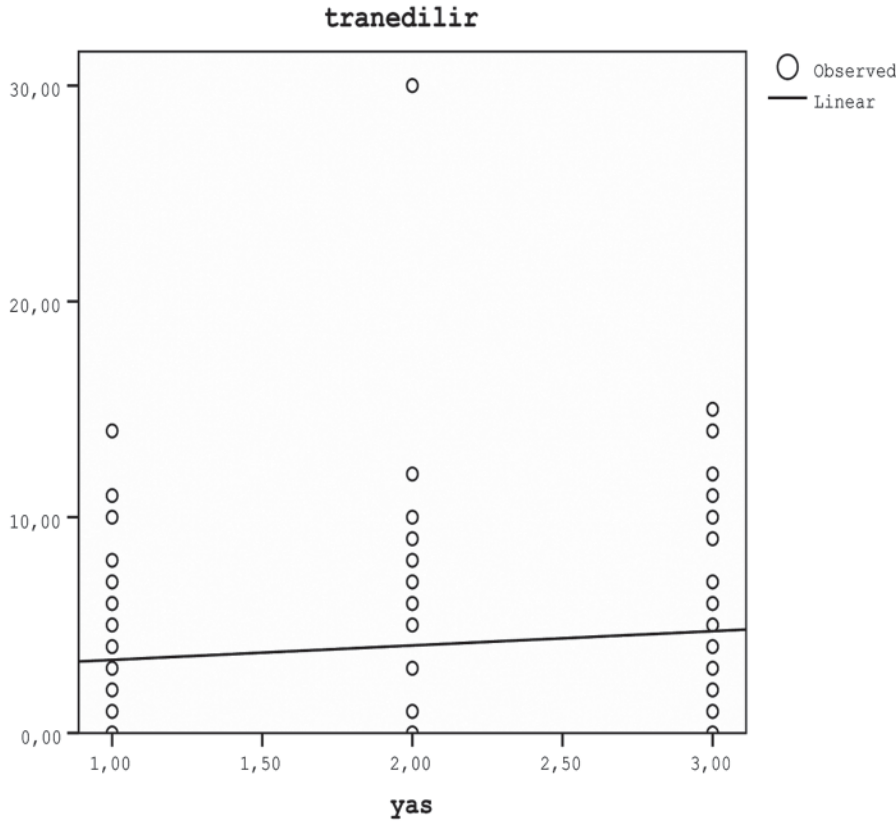
BULGULAR

Çalışmada, donör inek yaşı ile ilgili parametrelerin olduğu *Tablo 1* incelendiğinde donör yaşının transfer edilebilir embriyo sayısına olan etkisinin istatistik yönden

Tablo 1. Donör yaşının embriyo kalite ölçütlerine etkisi**Table 1.** The effect of donor age on embryo quality characteristics

| Gruplar | Donör Yaşı | Transfer Edilebilen Embriyo Sayı Ortalaması $\bar{X} \pm S_x$ | Transfer Edilemeyen Embriyo Sayı Ortalaması $\bar{X} \pm S_x$ | Toplam Embriyo Sayı Ortalaması $\bar{X} \pm S_x$ | Transfer Edilebilen Embriyo Oranı, % | Transfer Edilemeyen Embriyo Oranı, % |
|----------------|------------|---|---|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Grup | 2-3 | 3.08±0.38* | 2.49±0.35** | 5.57±0.50* | 53.46** | 46.54** |
| 2. Grup | 4-5 | 5.39±1.15 | 3.89±0.67 | 9.28±1.35 | 55.85 | 44.15 |
| 3. Grup | $x \geq 6$ | 4.47±0.48 | 2.79±0.37 | 7.26±0.57 | 63.24 | 36.76 |
| Genel Ortalama | | 4.31±0.33 | 3.06±0.24 | 7.37±0.41 | 57.51 | 42.49 |

* İstatistik olarak önemlidir ($P < 0.05$), ** İstatistik olarak önemsizdir ($P > 0.05$)



Şekil 1. Yaş ile transfer edilebilen embriyo arasındaki ilişki ve regresyon denklemi ($r = 0.142$, $P = 0.068$; $y_{ij} = 2.724 + 0.666 x_i + e_{ij}$)

Fig 1. Correlation coefficient and regression equation between age and transferable embryos ($r = 0.142$, $P = 0.068$; $y_{ij} = 2.724 + 0.666 x_i + e_{ij}$)

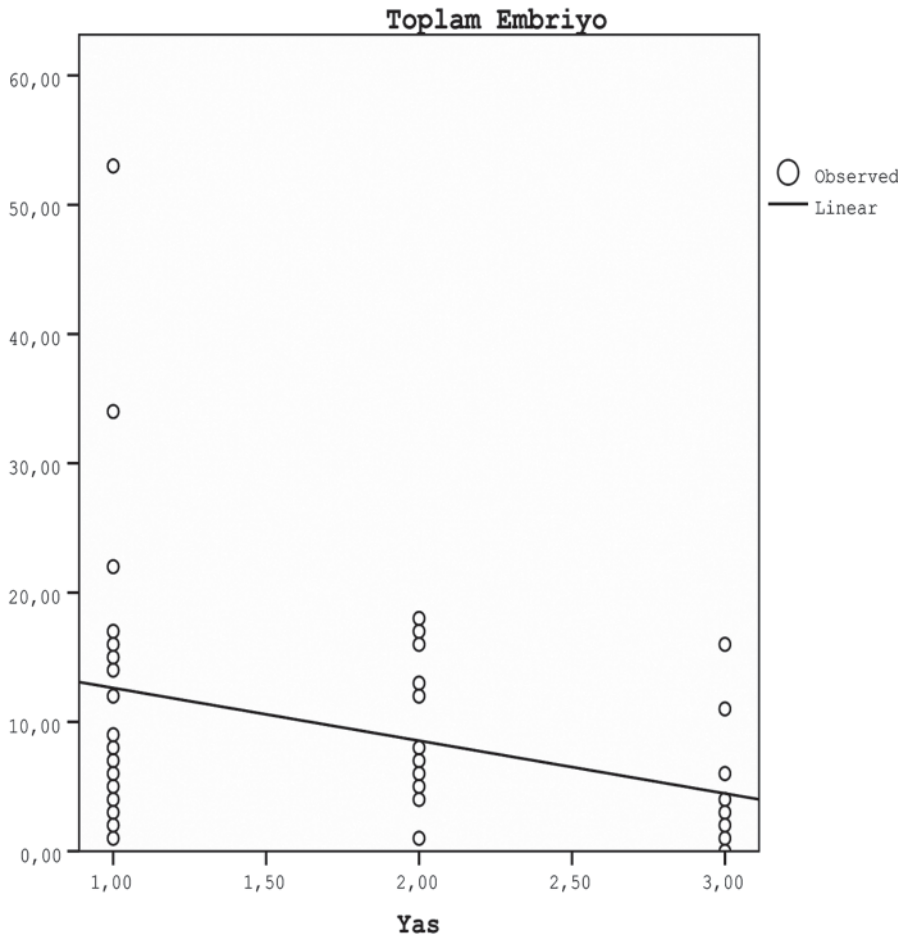
farklı olduğu görülmüştür ($P < 0.05$). Denemede 2-3 yaşında olan 1. grubun, hayvan başına 3.08 olan transfer edilebilen embriyo sayısı ortalamasının, 2. grupta 5.39, 3. grupta da 4.47 olduğu saptanmıştır. Transfer edilemeyen embriyo sayısı ortalaması gruplarda istatistik bir farklılık oluşturmamış ($P > 0.05$); buna karşılık toplam embriyo sayısı gruplarda istatistik bir farklılık yaratmıştır ($P < 0.05$). Transfer edilebilen embriyo oranı, 1. grupta %53.46, 2. grupta %55.85, 3. grupta da %63.24 olarak bulunmuş; transfer edilemeyen embriyo oranı da gruplarda herhangi bir farklılık yaratmamıştır (Tablo 1).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Donör ineklerde donör yaşına bağlı olarak transfer edilebilen embriyo sayısı, transfer edilemeyen embriyo sayısı ile toplam embriyo sayısına ait veriler Tablo 1'de göste-

rilmıştır. Transfer edilebilen embriyo sayısı ortalaması 2-3 yaşındaki donör ineklerde 3.08±0.38 olarak bulunurken; 4-5 yaşları arasındaki yaş grubunda bulunan ineklerde 5.39±1.15 ve $x \geq 6$ yaş grubundaki ineklerde de 4.47±0.48 olarak bulunmuştur. Oliviera ve ark.¹⁷, yaşlı ineklerin embriyo üretimlerinin genç ineklerinkine göre daha az olduğunu bildirirken; Silva ve ark.¹¹ $x > 14$ yaşındaki ineklerde; Malhi ve ark.¹⁸ da 13-16 yaş aralığındaki yaşlı ineklerde embriyo üretimlerinin genç olanlara göre daha az olduğunu tespit etmişlerdir.

Toplam embriyo sayısı ortalaması gruplarda 5.57-9.28 arasında değerler almış, istatistik olarak gruplarda farklılık göstermiştir ($P < 0.05$). Ortalama embriyo sayısı da 7.37 olarak tespit edilmiş, genç donörlerde 5.57 olan toplam embriyo sayısının, orta yaşlı ineklerde 9.28, yaşlı ineklerde de 7.26 olduğu saptanmıştır. Szabari ve ark.¹⁹ donör yaşının farklı süperovulasyon uygulamalarından etkilendiğini,



Şekil 2. Yaş ile toplam embriyo sayısı arasındaki ilişki ve regresyon denklemi

$$(r = -0.138, P = 0.078; y_{ij} = 5.328 + 0.791 x_i + e_{ij})$$

Fig 2. Correlation coefficient and regression equation between age and total embryo number

$$(r = -0.138, P = 0.078; y_{ij} = 5.328 + 0.791 x_i + e_{ij})$$

standart superovulasyon uygulamasında yaşlı olan hayvanların embriyo sayısının (7.7), genç hayvanların embriyo sayısından (6.33) fazla olduğunu ifade etmişlerdir. Peixoto ve ark.²⁰, maksimum yaşayabilir embriyo sayısının 8 yaşlı donörlerden elde edildiğini, bu üstünlüğün sebebinin ise yumurtalığın olgunlaşması olduğunu söylemişlerdir. Bu çalışmada, transfer edilebilen embriyo oranı gruplarda istatistiksel bir farklılık yaratmamış (*Tablo 1*), 1. grupta %53.46, 2. grupta %55.85, 3. grupta da %63.24 olarak bulunmuştur. Buna paralel olarak transfer edilemeyen embriyo oranı da, gruplar arasında istatistiksel bir farklılık yaratmamış, transfer edilemeyen embriyo oranı ortalama %42.49 olarak tespit edilmiştir (*Tablo 1*). Hasler ve ark.²¹, 3-6 yaş aralığındaki donör ineklerin transfer edilebilen embriyo oranını %64.15 olarak bulurken; 7-10 yaş arasında %65.10; 11-14 yaş arasında %54.64; 15 yaş ve sonraki aralıkta da %46.43 olarak tespit etmişlerdir.

Donör ineklerde donör yaşı ile transfer edilebilen embriyo arasındaki ilişki,

$$\hat{y}_{ij} = 2.724 + 0.666x_i + e_{ij}$$

regresyon denklemi ile tahmin edilmiş (*Şekil 1*) ve donör yaşı ile transfer edilebilen embriyo arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur ($r = 0.142, P = 0.068$). Bu konuda araştırma yapan Lerner ve ark.²², yaşı artması sonucu transfer edi-

lebilen embriyo sayısında azalmanın olduğunu, istatistiksel bir farklılaşmanın olduğunu bildirmiştir. Donör ineklerde donör yaşı ile toplam embriyo sayısı arasındaki ilişki,

$$\hat{y}_{ij} = 5.328 + 0.791x_i + e_{ij}$$

regresyon denklemi ile tahmin edilmiş (*Şekil 2*) ve donör yaşı ile toplam embriyo sayısı arasında önemli bir ilişki bulunmuştur ($r = -0.138; P = 0.078$). Bu konuda yapılan bir çalışmada donör yaşı ile toplam embriyo sayısı ($y = 14.24 - 0.38x^2, r = -0.39$) ve embriyo kalitesi ($y = 7.66 - 0.25x^2, r = -0.25$) arasında da kuadratik bir etkinin olduğu tespit edilmiştir¹¹.

Sonuç olarak, donör yaşının transfer edilebilen embriyo sayısı ile toplam embriyo sayısına olan etkisinin önemli olduğu ($P < 0.05$), donör yaşı ile transfer edilemeyen embriyo sayısı arasındaki ilişkinin önemsiz olduğu ($P > 0.05$) saptanmıştır. Çalışmada 4-5 yaş aralığındaki ineklerden elde edilen transfer edilebilen embriyo sayısı ile toplam embriyo sayısının diğer yaş aralığındaki gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüş olup, erken yaşlardaki toplam embriyo sayısının daha az olduğu tespit edilmiştir. Transfer edilebilen embriyo oranı $x \geq 6$ yaş grubundaki ineklerde %63.24 bulunurken; transfer edilemeyen embriyo oranı 2-3 yaş aralığındaki ineklerde %46.54 olarak tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Mollo A, Lora M, Faustini M, Romagnoli S, Cairoli F:** Some factors affecting embryo transfer success in dairy cows. *J Anim Vet Adv*, 6 (4): 496-499, 2007.
2. **Bari F, Khalid M, Haresign W, Murray A, Merrell B:** Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*, 59, 1265-1275, 2003.
3. **Kosgey IS, Kahi AK, Arendonk JAMV:** Evaluation of closed adult nucleus multiple ovulation and embryo transfer and conventional progeny testing breeding schemes for milk production in tropical cross-bred cattle. *J Dairy Sci*, 88, 1582-1594, 2005.
4. **Loneragan P:** State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Soc Reprod Fertil*, 64, 315-325, 2007.
5. **Yüceer B, Özbeyaz C:** Süt sığırlarının ıslahında çekirdek sürü-MOET tekniğinin kullanımı. *Lalahan Hay Araş Ens Derg*, 47 (2): 23-30, 2007.
6. **Ayaşan T, Karakozak E:** Donör ineklerin beslenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (3): 523-530, 2010.
7. **Looney CR:** Donor nutrition. *Ovagenix*, LP College, 2005.
8. **Geary T:** Management strategies to reduce embryonic loss. *Anim Sci Department Range Beef Cow Symp*, 6-8 December, Rapid City, South Dakota, 2005.
9. **Leroy JL, Opsomer G, De Vlieghe S, Van Hoder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PE, De Kruif A, Van Soom A:** Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, 64, 2022-2036, 2005.
10. **Szabari M, Pinney SZ, Boros N, Sebestyén J, Retter Z:** Az embrió minőségének hatása az embrió-átültetés eredményességére üzemi körülmények között. *Acta Agraria Kaposvárensis*, 3, 69-74, 2007.
11. **Silva JCC, Alvarez RH, Zanenga CA, Pereira GT:** Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. *Anim Reprod*, 6 (3): 440-445, Jul/Sept, 2009.
12. **Andrade JC, Oliveira MA, Lima PF, Guido SI, Bartolomeu CC, Teorio Filho F, Pina VM, Iunes-Souza TC, Paula NR, Freitas JC:** The use of steroid hormones in superovulation of Nelore donors at different stages of estrous cycle. *Anim Reprod Sci*, 77 (1-2): 117-125, 2003.
13. **Akyol N, Kızıl SH, Tuncer PB:** İneklerde süperovulasyon ve embryo transferi çalışmaları. *Lalahan Hay Araş Derg*, 44 (1): 1-5, 2004.
14. **Wright JM:** 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, 1998.
15. **Kara U:** Sığırlarda embriyo transferinde CIDR ile senkronize edilen donörlere östrus öncesi gerçekleştirilen çift PGF_{2α} uygulamalarının elde edilen embriyoların kalitesi ve sayısı üzerine etkileri. *Yüksek Lisans Tezi*, Erciyes Üniv. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji AbD, Kayseri, 2010.
16. **SPSS, Statistical Package Social Science:** SPSS 10.0, SPSS Inc, 1999.
17. **Oliveira MAL, Andrade JCO, Lima PF, Santos Filho AS, Guido SI, Cavalcanti Neto CC, Tenório Filho F, Oliveira LRS:** Influência da idade sobre a resposta superovulatória de doadoras Nelore. Resultados preliminares. *Rev Bras Reprod Anim*, 26, 246-248, 2002.
18. **Malhi PS, Adams GP, Mapletoft RJ, Singh J:** Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *Reprod*, 134, 233-239, 2007.
19. **Szabari M, Pinney SZ, Boros N, Sebestyén J, Retter Z, Bakos G, Bokor A, Stefler J:** Some factors affect of embryo-flushing in dairy cattle. *Acta Agraria Kaposvárensis*, 12 (1): 113-120, 2008.
20. **Peixoto, MGCD, Bergmann JAG, Fonseca CG, Penna VM, Pereira CS:** Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 58 (4): 567-574, 2006.
21. **Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote RH:** Superovulatory response of Holstein cows. *Theriogenology*, 19, 83-99, 1983.
22. **Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskeep EK, Dailey RA, Lewis PE, Butcher RL:** Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J Anim Sci*, 63, 176-183, 1986.