

# Embriyo Transferi Yapılan Taşıyıcı İneklerde Progesteron Seviyesinin Gebelik Başarısı Üzerine Etkisi

● Selim Alçay<sup>1\*</sup>, ● Ahmet Aktar<sup>1</sup>, ● Hakan Sağırkaya<sup>1</sup>

1 Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa

Received 11-04-2022 Accepted 25-07-2022

## Özet

Bu çalışmada embriyo transferi sırasında taşıyıcı Holstein ırkı ineklerin kan progesteron seviyelerinin gebelik oranları üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, 5 üstün genetik özelliklere sahip donör inek ve 36 taşıyıcı inek hayvan materyali olarak kullanıldı. Donörlerde süperovulasyon östrusun 9. gününde başlayan 12 saat ara ve 4 gün süreyle uygulanan FSH hormonu ile sağlandı. Uterus yıkaması bir hafta sonra gerçekleştirildi. Taşıyıcı hayvanlar 11 gün ara ile iki kez uygulanan prostaglandin enjeksiyonu ile senkronize edildi. Transfer günü taşıyıcı ineklerden kan örnekleri alındı ve kan progesteron seviyelerine göre taşıyıcılar üç gruba (Grup 1 (<4 ng/ml), Grup 2 (4-8 ng/ml), Grup 3 (>8ng/ml)) ayrıldı. Çalışmada sadece birinci kalite blastosist (Grade I) evresindeki embriyolar kullanıldı. Gebelik muayeneleri embriyo transferi sonrası 30. günde ultrasonla yapıldı. Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS programı (SPSS 23, Chicago, IL, USA) kullanıldı. Embriyo transferi zamanında taşıyıcı hayvanların kan progesteron seviyesinin ölçülmesinin gebelik oranlarının geliştirilmesi için önemli olduğu belirlendi (P<0.05). Özellikle >8ng/ml kan progesteron seviyesine sahip olan hayvanlara yapılacak embriyo transferlerinin gebelik oranlarını artıracığı tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Embriyo transferi, taşıyıcı inek, progesteron

## The Effect of Progesterone Level on Pregnancy Success in Embryo Transfer Carrier Cows Abstract

In this study, it was aimed to determine the effect of blood progesterone levels on pregnancy rates of recipient Holstein cows during embryo transfer. For this purpose, 5 donor cows with superior genetic characteristics and 36 recipient cows were used. Superovulation in donors was achieved with FSH, which was administered for 4 days, with an interval of 12 hours, starting on the 9th day of estrus. Flushing was made one week later. Recipients were synchronized with two prostaglandin injections administered 11 days apart. Blood samples were collected from the recipients on the day of transfer and the recipients were divided into three groups (Group 1 (<4 ng/ml), Group 2 (4-8 ng/ml), Group 3 (>8ng/ml)) according to their blood progesterone levels. Blastocyst (Grade I) stage embryos were used in the study. SPSS program (SPSS 23, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The measurements of blood progesterone level of recipients at the time of embryo transfer were found important to improve pregnancy rates (P<0.05). It was determined that transfers of embryos to recipients with a blood progesterone level of >8ng/ml would increase the pregnancy rates.

Keywords: Embryo transfer, recipient cow, progesterone

## Giriş

Ülkemiz sahip olduğu sığır sayısı bakımından (17.975.482 sığır- TÜİK 2020) dünyada üst sıralarda yer almasına rağmen,

damızlık sığır sayısı açısından kendi ihtiyacını maa- lesef karşılayamamaktadır. Bunun en önemli nedeni üstün genetik özelliğe sahip hayvan sayısındaki eksiklik ve bu hayvanlardaki döl verimi kaybıdır.<sup>1,2,3,4</sup> Hayvanlardaki ve-

\* Corresponding Author: Selim Alçay Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa (16059) Tel: +90 224 2941356, e-posta: salcay@uludag.edu.tr

rimliliğin artırılması ve genetiğin iyileştirilmesinde biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması ve yaygınlaştırılması elzemdir.

Sığır yetiştiriciliğinde embriyo transferi, yüksek verim yeteneğine sahip damızlık ineklerden bir yılda birden fazla yavru alınarak çekirdek damızlık sürüde yüksek verim yeteneğine sahip damızlık sayısının artırılmasıyla genetik ilerlemenin hızlandırılmasına katkıda bulunan en önemli ıslah metodudur.<sup>1</sup> Bu amaçla donörlerde süperovulasyon işlemi kullanılarak çok sayıda embriyo elde edilmeye çalışılır ve bu embriyolar taşıyıcılara nakledilerek çok sayıda yavru alınması amaçlanır.<sup>2</sup> Fakat son yıllarda süt sığırcılığı endüstrisinde üreme fizyolojisindeki değişiklikler nedeniyle süt verimi artarken gebelik oranları gerek suni tohumlamada gerekse embriyo transferinde düşmektedir.<sup>5</sup> Buzağı verimi ve laktasyon sayısının düşmesi ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle gebelik oranlarını artırmak ve ekonomik kayıplarının önüne geçebilmek amacıyla yeni yöntemlerin ve uygulamaların geliştirilmesi gerekmektedir.

Sığırlarda embriyonik ölümlerin etiyolojisindeki en önemli faktörlerden birinin progesteron hormonunun düzeyinin düşüklüğü ile sonuçlanan luteal yetmezlik olduğu bilinmektedir.<sup>6,7</sup> Tohumlama sonrası erken dönemdeki progesteron düzeyi ve profilinin, embriyonal yaşama gücü açısından geç döneme göre daha önemli ve pozitif bir ilişki taşıdığı bilinmektedir.<sup>8,9,20</sup> Özellikle ovulasyon sonrası progesteron konsantrasyonunun erken embriyonik ölümlerle (fertilizasyon sonrası 8-16. Gün) ilişkili olduğu bildirilmektedir.<sup>9,10,11</sup>

Kan progesteron düzeyi üreme döngüsü ve gebelik esnasında farklı seviyelerde bulunmaktadır. Süt sığırlarında kan progesteron seviyesinin kızgınlıkta en düşük (0.21 ng/ml) olduğu, 7. günde arttığı (1.5 ng/ml) ve 14. günde en yüksek seviyede olduğu (2.21 ng/ml) ve daha sonra 21. günde düştüğü (0.38 ng/ml) belirtilmektedir.<sup>12</sup> Bu nedenle embriyo transferi yapılacak gündeki kan progesteron seviyesinin gebelik başarısını etkileyeceği düşünülmektedir. Sunulan çalışmada, embriyo transferi sırasında taşıyıcı ineklerin kan progesteron seviyesinin gebelik oranları üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## Materials and Methods

### Hayvan Materyali

Bu çalışmada 5 adet üstün genetik özelliklere sahip donör inek ve 36 adet taşıyıcı inek hayvan materyali olarak kullanılmıştır. Donör inekler; 600-650 kg ağırlığında, 5 yaşlı, vücut kondisyon skoru 3.5, üçüncü laktasyonda olan, düzenli östrus aktivitesi gösteren ve klinik yönden sağlıklı hayvanlardan seçildi. Taşıyıcı inekler ise düzenli östrus gösteren, 3-4 yaşlı, sağlıklı ve daha önce tohumlanmamış

hayvanlar arasından seçilmiş ve gruplar arası eşit dağılım sağlanmıştır (Etik Kurul No:2022/02-03).

### Donör ve Taşıyıcı Hayvanlara Uygulanan Süperovulasyon ve Senkronizasyon Protokolü

Günler	DONÖR HAYVANLAR		TAŞIYICI HAYVANLAR
	Uygulama	Uygulama Dozu	Uygulama
-3			PGF
0	CIDR + GnRH	2,5 ml	
7	FSH	Sabah	2 ml
		Akşam	2 ml
8	FSH	Sabah	1,5 ml
		Akşam	1,5 ml
9	FSH+PGF	Sabah	1 ml
	FSH+CIDR Uzaklaştır	Akşam	1 ml
10	FSH	Sabah	0,5 ml
		Akşam	0,5 ml
11	Östrusta 12 saat ara ile en az 2 kez suni tohumlama		Östrusların taranması
18	Üterus yıkama		Embriyo transferi

Çalışmada tohumlamadan sonraki 7. günde, embriyolar uterusun cerrahi gerektirmeyen yöntem ile yıkanmasıyla toplandı. Bu amaçla öncelikle epidural anestezi 4 ml lido-kain uygulandı. Sonrasında foley katateri serviksten geçirilip kornu uteri içinde balonu şişirilerek sabitlendi. Yıkama solüsyonu olarak %1,5 oranında fetal buzağı serumu (FCS) ilave edilmiş 1 litrelik laktatlı ringer solüsyonu kullanıldı. Yıkama solüsyonu ilk olarak kornunun 2/3'ü dolacak miktarda aktarıldıktan sonra, tekrar filtre sistemine bağlı yoldan geri alındı. Aynı işlem 4-5 kez kornu uteri tam doldurulup boşaltılarak tekrarlandı. Aynı uygulama diğer kornu uteride de yapıldı.<sup>2</sup>

### Yıkama Sonrasında Embriyoların Aranması

Yıkama sonrası filtrede tutulmuş olan embriyolar, filtrenin kapağı çıkarıldıktan sonra alt kısmında bulunan yıkantı solüsyonunun stereo mikroskop altında incelenmesiyle tespit edildi. Tespit edilen embriyolar zaman kaybetmeden içerisinde TL- HEPES bulunan petri kaplarına aktarıldı.<sup>2</sup> Embriyolar IETS (International Embryo Transfer Society) tarafından tanımlanan kalite değerlendirme kriterlerine göre değerlendirildi. Blastosist aşamasında olan 1. kalitedeki embriyolar 0,25 ml'lik payetler içerisine çekildi. Gruplar arası eşit dağılım sağlandı.

### Taşıyıcı Hayvanların Hazırlanması ve Embriyoların Taşıyıcılara Transferi

Senkronize edilen taşıyıcı ineklerde transfer günü ultrason yardımıyla ovaryum muayeneleri yapıldı. Korpus luteumların hangi ovaryumlar üzerinde yer aldığı belirlendi. İçerisine embriyo aktarılmış payet embriyo transfer kataterine yerleştirildi. Katater üzerine geçirilen naylon kılıf serviks girişinde yırtıldı ve serviks geçildi. Katater corpus luteumun bulunduğu taraftaki kornu içerisine ilerletildi ve pistole itilerek embriyo transfer işlemi tamamlandı.<sup>2</sup> Embriyo transferi yapılan hayvanlara flunixin meglumin uygulaması yapılmıştır.<sup>15,16</sup>

## Taşıyıcı hayvanların kan progesteron seviyelerinin belirlenmesi

Kan progesteron düzeyini belirlemek amacıyla taşıyıcı ineklerden embriyo transfer günü Na-EDTA içeren vakumlu tüplere kuyruk venasından kan örnekleri toplandı. Alınan kan örnekleri bekletilmeden 5000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazma örneklerinde progesteron düzeyleri (ng/ml) Access Beckmann Coulter (USA) cihazında Access Progesterone kiti kullanılarak Radioimmunoassay (RIA) yöntemi ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlarına göre gruplar belirlendi.

## Taşıyıcı Hayvanlarda Gebeliklerin Belirlenmesi

Taşıyıcı hayvanlarda embriyo transferi sonrası 32. günde ultrason yardımıyla gebelik muayeneleri gerçekleştirilmiştir.

## İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS (Windows için SPSS 23.0; SPSS, Chicago SPSS 23) programından yararlanılmıştır. Gruplar arasındaki gebelikler Ki-kare (Chi-square) testi kullanılarak karşılaştırıldı.

## Bulgular

Çalışmada grupların ortalama P4 seviyeleri (mean  $\pm$  SD) Grup 1'de 3.21 $\pm$ 1.12, Grup 2'de 6.13 $\pm$ 1.08 ve Grup 3'te 10.02 $\pm$ 1.42 elde edilmiştir. Tablo 1'de elde edilen gebelik oranları belirtilmiştir.

Tablo 1: Progesteron (P4) seviyelerine göre taşıyıcı hayvanların gebelik oranları

Gruplar	n	Gebelik (+)	Gebelik (-)	Gebelik oranı (%)
Grup 1 (<4 ng/ml)	11	3	8	27.27 <sup>a</sup>
Grup 2 (4-8 ng/ml)	13	5	8	38.46 <sup>ab</sup>
Grup 3 (>8ng/ml)	12	9	3	75 <sup>b</sup>

## Tartışma Sonuç

Sığırlarda embriyo transferi, üstün genetik özelliklere sahip donör hayvanlardan alınan embriyoların sağlıklı taşıyıcı hayvanlara transfer edilmesiyle sonuçlanan biyoteknolojik bir yöntemdir.<sup>13</sup> Yetiştiricilik açısından önemli avantajlar sağlamasına rağmen gebelik başına ekonomik maliyeti nedeniyle sadece üstün genetik özelliğe sahip hayvanlarda kullanılmalı ve taşıyıcılarda gebelik oranlarının yükseltilmesi amaçlanmalıdır. Çalışmamızda sürü içerisinde genetik kapasitesi üst seviyede olan donör hayvanlardan alınan embriyolar progesteron seviyelerine göre gruplara ayrılmış taşıyıcı hayvanlara nakledilmiştir.

Transfer edilebilir kalitede bir embriyonun transferi sonrası elde edilecek gebelik oranını etkileyen en önemli faktör, taşıyıcının reproduktif bakımdan uygunluğudur. Taşıyıcı hayvanların östruslarının doğru tespiti, siklus yaşının izlenebilmesi ve kan progesteron seviyesinin doğru belirle-

nebilmesi elde edilecek gebelik oranı açısından çok önemlidir.<sup>14,15</sup> Çalışmamızda taşıyıcı ineklerin embriyo transfer günü kan progesteron seviyelerinin gebelik oranları üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Embriyo transferi uygulamalarında taşıyıcılara yapılan östrüs senkronizasyonunun amacı östrüslerin kısa bir zaman aralığında toplulaştırılması yanında taşıyıcının siklusunun senkronize edilerek embriyo transferi için uygun zamanın tespitine yönelik bir ön hazırlık yapmaktır. Embriyo transferi, embriyonun corpus luteumun (CL) bulunduğu ovaryum tarafındaki uterus kornusuna bırakılması ile gerçekleştirilmektedir. Sunulan çalışmada birinci kalitede olan blastosist aşamasındaki taze embriyolar ultrason yardımıyla tespit edilen CL'nin bulunduğu kornu uterilere transfer edilmiştir. Ancak, transfer sırasındaki manipülasyonun PGF2 $\alpha$  salınımına neden olarak embriyonun gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceği ve gebelik oranını düşürebileceği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmektedir.<sup>16,17,18</sup> Bu nedenle taşıyıcı hayvanlarda embriyo transfer günü güçlü bir non-steroidal anti-inflamatuar madde (NSAID) olan flunixin meglumin (FM) uygulaması yapılarak endometriumdan PGF2 $\alpha$  salgılanmasının baskılanması,<sup>15,16</sup> bu sayede de gruplar arası manipülasyona bağlı oluşabilecek embriyonik ölümlerin önüne geçilmesi hedeflenmiştir.

İneklerde gebeliğin devamlılığı açısından progesteron konsantrasyonunun büyük öneme sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir.<sup>6,7,19</sup> Özellikle tohumlama sonrası yedinci gün düşük progesteron seviyesinin embriyonik ölüm oranını arttırdığı bildirilmiştir.<sup>20,21</sup> Çalışmamızda da düşük progesteron seviyesine sahip olan hayvanlarda gebelik başarısı yüksek progesteron seviyesine sahip hayvanlara göre daha düşük bulunmuştur (p<0.05).

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; embriyo transferi zamanında taşıyıcı hayvanların kan progesteron seviyelerinin ölçülmesinin gebelik oranlarının geliştirilmesi açısından önemli olduğu görülmüştür. Özellikle >8ng/ml kan progesteron seviyesine sahip olan hayvanlarda yapılacak transferlerin olumlu katkı sağlayacağı belirlenmiştir. Sonraki çalışmalarda transfer sayılarının arttırılmasına ve başarıyı arttıracak faktörlerin geliştirilmesine odaklanılacaktır.

## Kaynaklar

1. Yüceer B, Özbeyaz C. Süt Sığırlarının Islahında Çekirdek Sürü – Moet Tekniğinin Kullanımı. Lalahan Hayvansal Araştırma Enstitüsü Dergisi. 2007; 47(2): 23-30.
2. Sağırkaya H. Sığırlarda Embriyo Transfer Uygulaması ve Türkiye Açısından Önemi. Uludağ Üniversitesi J.

- Fac. Vet. Med. 2009; 28: 11-19.
3. Kardeşahin T. Türkiye İçin Sığırlarda Embriyo Transferi Gerekli Mi? Journal of Advances in VetBio Science and Techniques. 2017; 2(2): 30-33.
  4. Tapkı N, Kaya A, Tapkı İ, Dağistan E, Çimrin Ç, Selvi MH. Türkiye'de Büyükbaş Hayvancılığın Durumu ve Yıllara Göre Değişimi. Journal of Agricultural Faculty of Mustafa Kemal University. 2018; 23: 324-339.
  5. Güvenç M, Cellat M, Ürer EK, Gökçek İK. Repeat Breeder İneklerde Oksidatif Stres ve Çeşitli Biyokimyasal Parametreler. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi. 2017; 31(3): 243-247.
  6. Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. Reproduction in Domestic Animals. 2008; 43: 260-267.
  7. Mann GE, Lamming GE. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. Reproduction in Domestic Animals. 2009; 34: 269-274.
  8. Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. Animal Reproduction Science. 2006; 3-4: 297-311.
  9. McNeill RE, Diskin MG, Sreenan JM, Morris DG. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. Theriogenology. 2006; 65: 1435-1441.
  10. Starbuck GR, Gutierrez CG, Peters AR, Mann GE. Timing of follicular phase events and the postovulatory progesterone rise following synchronisation of oestrus in cows. The Veterinary Journal. 2006; 172: 103-108.
  11. Stronge AJH, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. Theriogenology. 2005; 64: 1212-1224.
  12. Ezhilarasan C, Murugavel K, Antoine D. Progesterone level in cows at spontaneous estrus and its influence on ovulation and pregnancy rates. Indian Veterinary Journal. 2018; 95(5): 21-23.
  13. Mebratu B, Fesseha H, Goa E. Embryo transfer in cattle production and its principle and applications. Int. J. Phar. & Biomed. Res. 2020; 7(1): 40-54.
  14. Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. Anim. Reprod. 2009; 6: 114-124.
  15. Köse M, Bülbül B, Kırbaş M, Dursun Ş, Çolak M. Dondurulmuş Sığır Embriyolarının Transferinden Elde Edilen Gebelik Oranı Üzerine Taşıyıcı Senkronizasyon Protokolünün Etkisi. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimler Dergisi. 2012; 7(3): 185-192.
  16. Weems CW, Weems YS, Randel RD. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. Vet J. 2006; 171: 206-228.
  17. Scenna FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Rohrbach NR, Wehrman ME, Schrick FN. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2005; 78: 38-45.
  18. Bülbül B, Dursun Ş, Kırbaş M, Köse M, Ümütlü S. Dövelerde embriyo transferi öncesi flunixin meglumin uygulamasının gebelik oranı üzerine etkisi. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2010; 16: 105-109.
  19. Mann GE, Fray MD, Lamming GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- $\tau$  production in the cow. The Veterinary Journal. 2006; 171: 500-503.
  20. Santos RM, Demetrio CGB, Vasconcelos JLM. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. J Dairy Sci. 2007; 90: 5073-5082.
  21. Aslan S, Wesenauer G. İneklerde gebelik, embriyonik-föetal ölümler, ovaryum fonksiyonlard ve uterus çapından ultrasonografi ile saptanması. Tr J Vet Anim Sci. 1999; 23(Ek Sayd 3): 623-631.