

İNEKLERDE SÜPEROVULASYON CEVABINA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

(Derleme)

Bülent BÜLBÜL^{1*}

Şükrü DURSUN¹

Factors effecting superovulation response in cows (A review)

SUMMARY

Feasibility of embryo transfer depends on stimulating follicular growth, ovulation of these developed follicles, fertilization of oocytes, collection and transfer of embryos, establishment of pregnancy and finally obtaining many calves. Superovulation response is very important for this aim. Therefore, superovulation is one of the most critical stage in embryo transfer protocols. For this respect, it is very important to know about the factors effecting superovulation response and elimination of the negative situations.

KEY WORDS: Cow, superovulation response.

ÖZET

İneklerde embriyo transferinin etkili bir biçimde gerçekleştirilebilmesi, çok sayıda follikül gelişiminin uyarılması, gelişen folliküllerin ovule olması, fertilizasyonun sağlanması, şekillenen embriyoların toplanması ve transfer edilmesi, gebeliğin sağlanması ve sonuçta birçok buzağı elde edilmesine bağlıdır. Süperovulasyon cevabının yüksek olması bahsedilen amaca ulaşmada çok önemlidir. Dolayısıyla embriyo transferi uygulamalarında en kritik noktalardan birisi de süperovulasyondur. Bu nedenle, ineklerde yapılan embriyo transferi çalışmalarında süperovulasyon cevabına etki eden faktörlerin bilinerek olumsuz durumların elimine edilmesi büyük önem taşımaktadır.

ANAHTAR KELİMELELER: İnek, süperovulasyon cevabı.

GİRİŞ

Donör olarak kullanılacak inekte, fazla sayıda follikül gelişimi sağlayarak ovulasyon sayısının artırılmasına yönelik yapılan hormon tedavisine süperovulasyon adı verilmektedir (Resim 1 ve 2) (Curtis 1991, Marahall ve Minyard 2006). Süperovulasyon uygulanmayan bir ineğin östrüste tohumlanmasını takip eden 7. veya 8. günde uterus yıkaması yapılarak bir embriyo elde edilebilir (Marahall ve Minyard 2006). Fakat sözü edilen yöntem, yüksek maliyetinden dolayı pratikte uygulama şansına sahip değildir (Arthur ve ark. 1992). Embriyo transferinin maliyetinin azalması ve yaygınlaşması, bir inekten bir seferde alınabilecek kaliteli embriyo sayısıyla çok yakın ilişkilidir (Mikkola

ve ark. 2005). Süperovulasyon uygulamalarının amacı, aynı zamanda yüksek gebelik oranı da sağlayacak maksimum sayıda transfer edilebilir kalitede embriyo üretmektir (Novotný ve ark. 2005). Normal bir östrüs sırasında ancak bir embriyo elde edilebilirken süperovulasyon tekniği kullanılarak bu sayı ortalama 10'a çıkarılabilmekte (Selk 2006) ve bunun yaklaşık %50'sini transfer edilebilir embriyolar oluşturmaktadır (Gordon 2005). Bununla birlikte süperovulasyon uygulamaları sonucunda elde edilen transfer edilebilir embriyo sayısı birçok faktör tarafından etkilenmektedir (Sartori ve ark. 2004, Betteridge 2006). Bu faktörler; kullanılan gonadotrop hormona, donöre ve folliküler gelişim-dalgaya bağlı faktörler ve diğer faktörler olarak özetlenebilir.

1: Bahri DAĞDAŞ UTAE, KONYA.

*E-posta: bulbulent@hotmail.com

Bu makalede; ineklerde süperovulasyon cevabına etki eden faktörler incelenmiş ve konuyla ilgili güncel araştırmaların derlenmesi amaçlanmıştır.

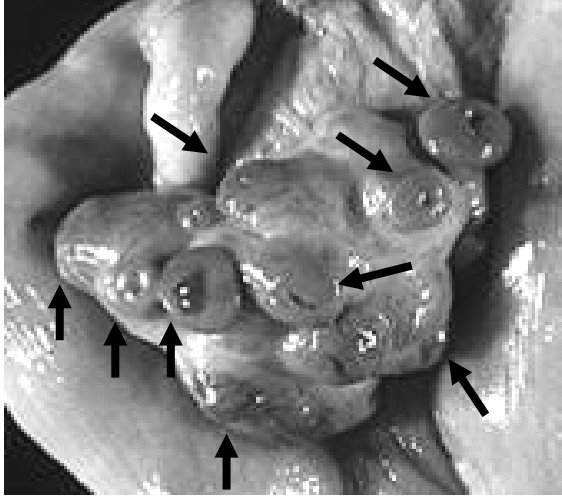
1. Süperovulasyon amacıyla kullanılan gonadotrop hormona bağlı faktörler

İneklerde süperovulasyon amacıyla insan menopozal gonadotropini (hMG) gibi hormonlar kullanılmakla birlikte (Gali ve ark. 2003, Novotný ve ark. 2005) genellikle follikül uyarıcı hormon (FSH) ve gebe kısırak serum gonadotropini (PMSG) uygulamaları yaygın olarak tercih edilmektedir (Žižlavský ve ark. 2002, Gordon 2005, Hasler 2006).

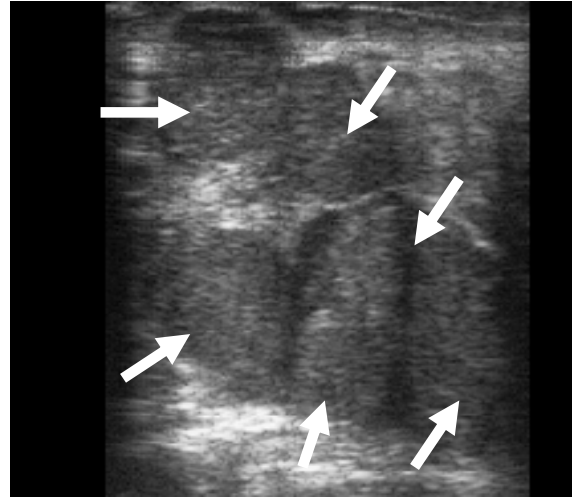
Daha önceki dönemlerde süperovulasyon protokollerinde prostaglandin kullanılmayıp bu amaçla PMSG'nin siklusun 16. gününde enjekte edildiği bildirilmektedir. Bu yöntem korpus luteumun doğal luteolizi esasına dayanmaktadır (Siedel ve Siedel 1991). Östrüsün tespit edildiği gün luteinleştirici hormon (LH) veya insan koryonik gonadotropini (hCG) uygulamasıyla ovulasyonlar uyarılmaktadır (Kanagawa ve ark. 1995). Fakat östrüs başlangıcının tahmin edilememesi, elde edilen embriyo sayısının azlığı ve süperovulasyon cevabının çok değişken olması gibi nedenlerden dolayı anılan yöntemin kullanımı sınırlı olmuştur (Siedel ve Siedel 1991). Günümüzde ise PMSG veya FSH ile birlikte prostaglandinlerin kullanıldığı siklus ortası stimülasyon yöntemi uygulanmaktadır (Tekeli 1997).

birlikte Diaz ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada süperovulasyon amacıyla FSH enjeksiyonuna östrüsten sonraki 8 ya da 12. gün başlamışlardır. Araştırmacılar 8. gün FSH uygulamasına başladıkları grupta ortalama 1.93, 12. gün başladıkları grupta ise 4.93 transfer edilebilir embriyo ele etmişlerdir.

Glikoprotein yapıda olan ve deri altı veya kas içi yolla kullanılan FSH'nın yarılanma ömrü kısa (110 dakika) olduğundan tekrarlanan dozlar halinde uygulanmaktadır (Mori 1999, Mapletoft ve ark. 2002b). Anılan nedenden dolayı yeterli süperovulasyon cevabı elde etmek için bu hormonun 12 saat aralıklarla 8–10 kez enjeksiyonu gerekmektedir (Şekil 1) (Alaçam 1990, Bader ve ark. 2005). Bu konu ile ilgili olarak Kanagawa ve ark. (1995), FSH'nın günde 2 veya 3 kez enjeksiyonu şeklinde uygulanmasının, günde bir veya iki günde bir uygulanmasından daha yüksek cevap gelişmesine neden olduğunu bildirmektedirler. Süperovulasyon uygulamasına verilecek cevap toplam 40 mg'a kadar artmakla birlikte bu doz aşıldığında cevap düşmektedir (Kanitz ve ark. 2002). FSH'nın ilk enjeksiyonundan 48–72 saat sonra luteolitik dozda prostaglandin F2 α (PGF2 α) uygulanmaktadır (Herman ve ark. 1994, Gali ve ark. 2003, Dursun ve ark. 2006). FSH uygulamaları toplam dozun 8 eşit miktarda enjeksiyonu şeklinde yapılabildiği gibi, 5,5,4,4,3,3,2,2 oranında günlük azalan miktarlarda da yapılabilmektedir (Kanagawa ve ark. 1995).



Resim 1. Süperovulasyona tabi tutulmuş inek ovariumu (oklar: korpus luteum).



Resim 2. Süperovulasyona tabi tutulmuş inek ovariumu ultrason görüntüsü (oklar: korpus luteum).

Süperovulasyon prosedürlerinde gonadotropin uygulaması için en uygun zamanın östrüs siklusunun 8–14. günleri arası olduğu ve donörün ovariumunda iyi gelişmiş bir korpus luteum bulunmasının önemi özellikle vurgulanmaktadır (Rajamahendran ve Calder 1993). Bu günlerden daha önce veya sonra başlanması durumunda süperovulasyon cevabının azalacağı bildirilmektedir (Hasler 1992). Bununla

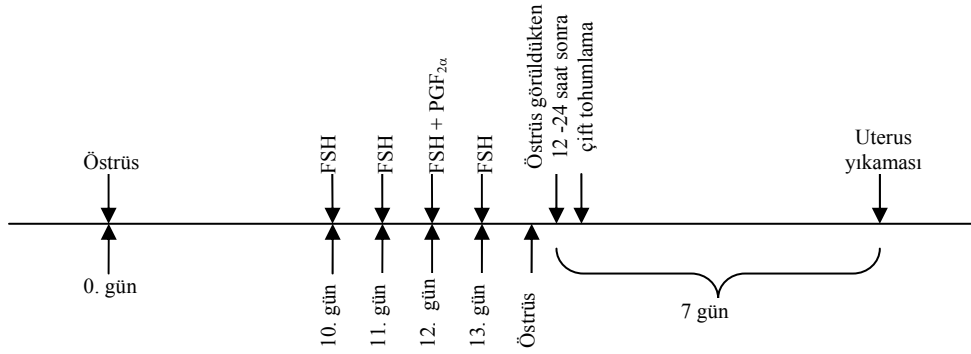
Süperovulasyon amacıyla kullanılan FSH preparatının içerdiği FSH/LH oranı da cevap üzerinde etkilidir (Hasler 1992). Preparat içinde bir miktar LH'nin bulunması gerektiği, yüksek LH oranının ise süperovulasyon cevabı, fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesini olumsuz etkilediği bildirilmektedir (Kanitz ve ark. 2002). Bununla birlikte en uygun FSH/LH oranı ırklar arasında farklılık

gösterebilmektedir (Quaresma ve ark. 2003). Mapletoft ve ark. (2002b) ineklerde yaptıkları çalışmalarında, %100 (standart FSH-P), %32 ve %16 LH içeren ve hiç LH içermeyen FSH preparatları ile süperovulasyon uygulamışlardır. Araştırmacılar gruplarda inek başına ortalama korpus luteum sayısını sırasıyla 10.2, 11.1, 15.6 ve 17.2 ve transfer edilebilir embriyo sayısını ise 4.0, 3.9, 7.7 ve 5.5 olarak saptamışlar ve en uygun LH oranının %16 olduğunu belirtmişlerdir.

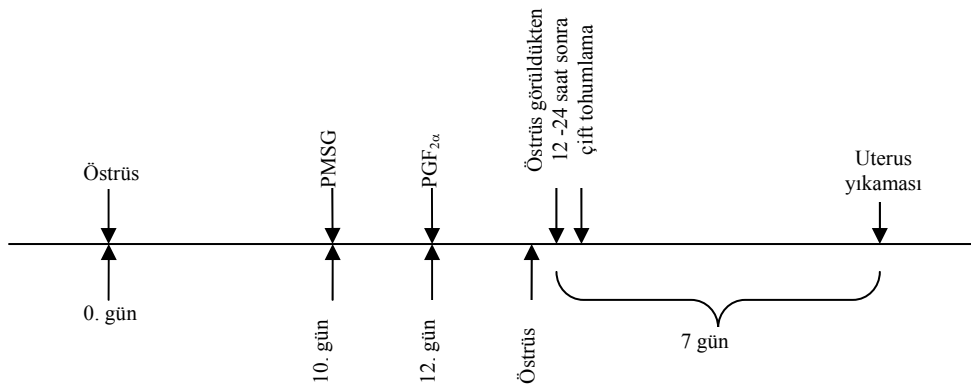
Bakterilerin FSH'nın etkinliğini yok ettiği ve bundan dolayı bu hormon enjektöre çekilirken her zaman steril bir kanül kullanılması gerektiği belirtilmektedir (Curtis 1991).

İneklere süperovulasyon amacıyla kullanılan diğer bir hormon da glikoprotein yapıdaki PMSG olup 1800–3000 IU (genellikle 2000–2500 IU) dozda kas içi enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır (Mori 1999). PGF_{2α} enjeksiyonu bundan 2–3 gün sonra yapılmaktadır (Şekil 2) (Siedel ve Siedel 1991, Akyol

ve ark. 2004). Biyolojik yarılanma ömrü uzun (40–50 saat) olduğundan tek doz uygulanır (Alaçam 1997, Mori 1999). Yarılanma ömrünün uzun olması follikül gelişimi ve ovulasyonların geniş bir zamana yayılmasına ve transfer edilebilir embriyo sayısının olumsuz etkilenmesine neden olur (Mapletoft ve ark. 2002b). Bahsedilen olumsuzlukları önlemek amacıyla PMSG'yi nötralize etmek için östrüs başlangıcından 18–24 saat sonra anti-PMSG uygulaması yapılabilir (Tekeli 1997). Nakajima ve ark. (1992), PMSG kullanarak süperovulasyona tabi tuttıkları ineklere östrüs başlangıcından 12 saat sonra PMSG anti serumu uygulamışlar ve anti serum enjekte ettikleri grupla etmedikleri grup arasında korpus luteum sayısı bakımından bir fark saptamadıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar, anti serum uygulanan grupta embriyo kalitesinin daha iyi olduğunu, bunun ise ovulasyonu takiben östrojen seviyesinin düşmesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.



Şekil 1. FSH ile yapılan süperovulasyon programı (Bader ve ark. 2005).



Şekil 2. PMSG kullanılarak yapılan süperovulasyon programı (Akyol ve ark. 2004).

PMSG uygulamasına verilecek cevap 3000 IU'ye kadar dozun yükseltilmesine bağlı olarak artmakla birlikte dozun daha fazla artırılmasının olumlu bir etkisi olmamaktadır (Kanagawa ve ark. 1995).

PMSG kullanılan süperovulasyon programlarında ovulasyon ve transfer edilebilir embriyo sayıları FSH'nin kullanıldığı programlara göre daha düşük olmaktadır (Tablo 1) (Almeida 1987, Lopes da Costa ve ark. 2001, Akyol ve ark. 2004). Bununla birlikte, daha ucuz ve tek enjeksiyonun yeterli olması ve kolay temin edilebilmesi PMSG'nin avantajlarını oluşturmaktadır (Akyol 2001).

Tablo 1. PMSG ve FSH uygulamasına verilen süperovulasyon cevabı (Almeida 1987).

Uygulanan gonadotropin	PMSG (3000 IU)	FSH (toplam 40 mg)
Korpus luteum/inek	8.7	12.0
Toplam ovum-embriyo/inek	6.7	9.3
Transfer edilebilir embriyo/inek	4.2	5.9

Süperovulasyon amacıyla FSH kullanılması durumunda prostaglandin enjeksiyonundan 48 saat sonra gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) veya eksojen LH uygulamalarının ovulasyonları uyarmada etkisiz kalacağı ve transfer edilebilir embriyo sayısını artırmayacağı belirtilmektedir. Bununla birlikte PMSG kullanıldığı durumlarda östrüste GnRH uygulanmasının bir miktar fazla embriyo sağlayabileceği bildirilmektedir (Siedel ve Siedel 1991). Ayrıca Kanagawa ve ark. (1995), PMSG kullanımından sonra uygulanan hCG'nin

ovulasyonları uyarmada yeterince etkili olmadığını belirtmektedir.

Aynı hormonun farklı lot numaraları arasında da süperovulasyon cevabı yönünden farklılıklar olabilmektedir. Bu olayın, hazırlanan her lotta hormon titresinin farklı olabilmesi ve hatta FSH/LH oranının da değişiklik gösterebilmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Hasler 1992, Kanitz ve ark. 2002).

İki süperovulasyon arası sürenin elde edilecek cevaba etki edeceği bildirilmektedir (Selk 2006). Bu sürenin 15–20 gün olması halinde cevabın azalacağı (Marahall ve Minyard 2006), 45–60 gün olması durumunda ise yeterli cevap alınacağı belirtilmektedir (Akyol ve ark. 2004). Tekrarlanan süperovulasyon girişimlerinin 3–4. uygulamalarında yetersiz sonuçlar alınabileceği vurgulanmaktadır (Siedel ve Siedel 1991). Žižlavský ve ark. (2002), inekleri FSH kullanarak 2–4 ay aralıklarla 6 kez süperovulasyona tabi tutmuşlardır. Uygulama sayısı arttıkça süperovulasyon cevabının düştüğü ve özellikle ilk dört uygulamanın kullanıma elverişli olduğu saptanmıştır (Tablo 2). Ayrıca araştırmacılar çalışmalarında, iki süperovulasyon arası sürenin <55, 56–115 ve >115 gün olduğunda süperovulasyon cevabına etkisini incelemişler ve bu sürenin uzaması halinde süperovulasyon cevabının yükseleceğini ve transfer edilebilir embriyo sayısının artacağını bildirmişlerdir. Bununla birlikte Hasler (2004), yapılan son çalışmalarla, önceden kabul edildiği gibi iki süperovulasyon arasında iki östrüs siklusu geçmesinin gerekli olmadığını, ayrıca aynı donörün FSH kullanılarak 40 gün aralıklarla 1–2 yıl boyunca süperovulasyona tabi tutulabileceğini bildirmektedir.

Tablo 2. Tekrarlanan süperovulasyon uygulamalarında alınan cevaplar (Žižlavský ve ark. 2002)

Süperovulasyon tekrarı	n	Toplanan ovum-embriyo/inek	Transfer edilebilir embriyo/inek
1	82	10.94	6.16
2	82	8.32	5.51
3	59	7.96	5.70
4	40	7.35	5.16
5	21	3.56	2.98
6	8	2.82	2.01
Toplam	-	6.82	4.59

Özellikle PMSG kullanıldığı durumlarda tekrarlanan 2–4 uygulamadan sonra bu hormona karşı gelişen antikör oluşumundan dolayı ovaryum cevabının azaldığı ve bu olumsuz durumun anti-PMSG uygulamaları ile giderilebileceği bildirilmektedir (Kanagawa ve ark. 1995).

Süperovulasyon çalışmalarında kullanılan bir diğer hormon olan hMG'den yeterli sonuç alınmadığı, özellikle ovule olmayan follikül sayısının yüksek olduğu bildirilmektedir (Akyol 2001).

2. Donöre bağlı faktörler

Donör olarak kullanılacak hayvanların sağlıklı, postpartum süreyi sorunsuz geçirmiş, vücut kondüsyonu iyi ve ard arda iki östrüs siklusunun takip edilmiş olması gereklidir (Herman ve ark. 1994). Ancak kızgınlıklar arası sürenin normal (18–24 gün) olduğu ve rektal muayenede ovaryumda iyi gelişmiş bir korpus luteum bulunan inekler süperovulasyon uygulaması için seçilmelidirler (Selk 2006).

Reproduktif açıdan sorunlu, östrüs siklusu düzensiz, endometritis, postpartum anöstrüs, retensiyon sekondinarum ve benzeri problemleri olan inekler donör olarak uygun değildir (Kanagawa ve ark. 1995). İnfertil donörlerin, normal donörlerden daha düşük süperovulasyon cevabı geliştirdikleri önemle vurgulanmaktadır (Siedel ve Siedel 1991).

Doğumdan sonra süperovulasyon uygulaması yapılacak ineklerin 50. gününü doldurmaları beklenmelidir (Selk 2006). Özellikle postpartum 30–40. günlerde süperovulasyona tabi tutulan ineklerde cevabın düşük olduğu bildirilmektedir (Kanagawa ve ark. 1995). Žižlavský ve ark. (2002), postpartum süperovulasyona başlanacak en uygun zamanı 56 ile 115. günler arası olarak belirtmektedir.

İneklerin süperovulasyon sırasında fazla yağlı ve aşırı kilolu olmaları, süperovulasyon cevabını düşürdüğü gibi reproduktif organların manipülasyonunu güçleştirdiğinden dolayı istenmemektedir (Selk 2006). Bununla birlikte bu dönemde donörlerin kilo kaybetmemeleri hatta kilo artışı trendinde olmaları cevabın yüksek olması açısından önemlidir. Canlı ağırlığı 800 kg'dan fazla olan donörlerde FSH dozunun yaklaşık %20 oranında artırılması gerektiği belirtilmektedir (Siedel ve Siedel 1991).

Süperovulasyon uygulamalarına verilen cevap ırklar arasında farklılık gösterir (Žižlavský ve ark. 2002, Akyol ve ark. 2004). FSH'nın uygulanması gereken toplam dozun yaşa ve ırka göre farklılık gösterdiği bildirilmektedir. Örneğin Japon Karası ırkı ineklerde yeterli cevap alınabilmesi için kullanılması

gereken FSH dozu 20 ila 28 mg arasındayken (Kanagawa ve ark. 1995), Brahman ırkı inekler için bu doz 24–28 mg'dır (Curtis 1991). Hereford ve Brahman ırkı ineklerde süperovulasyon cevabının yüksek olduğu belirtilmektedir (Hasler 1992).

Donörün yaşı süperovulasyon cevabını etkilemektedir (Žižlavský ve ark. 2002, Gordon 2005). Genç inekler, yaşlı inek ve düvelere göre daha yüksek süperovulasyon cevabı geliştirmektedir (Siedel ve Siedel 1991). Kanagawa ve ark. (1995), özellikle 10 yaşından daha büyük ineklerde cevabın bariz bir şekilde düştüğünü bildirmektedir. Ayrıca düvelere inekler için uygulanan dozun %25 daha azının kullanılması gerektiği belirtilmektedir (Curtis 1991).

Hasler (2006), laktasyondaki ineklerin kurudaki ineklerden daha fazla sayıda transfer edilebilir embriyo geliştirdiklerini belirtirken, Novotný ve ark. (2005), süperovulasyon uygulamaları sırasında kan progesteron seviyelerinin önemli olduğunu ve bu sırada düşük progesteron seviyesine sahip ineklerde süperovulasyon cevabının diğerlerine göre daha yüksek olduğunu bildirmektedir.

Süperovulasyon uygulamaları sonucunda donör olarak kullanılan ineklerin yaklaşık %20-25'inden hiç transfer edilebilir embriyo elde edilemediği bildirilmektedir (Tablo 3) (Siedel ve Siedel 1991, Quaresma ve ark. 2003, Hasler 2004, Gordon 2005). Gali ve ark. (2003) ise donörlerin ancak yaklaşık üçte birinde yeterli süperovulasyon cevabı geliştirdiğini belirtmektedir.

Tablo 3. Elde edilen transfer edilebilir embriyoların donör hayvanlara dağılımı (Siedel ve Siedel 1991).

Donör cevabı	Embriyo sayısı	Donör oranı (%)	Elde edilen embriyoların oranı (%)
Cevap yok	0	25	0
Zayıf	1–2	15	5
Vasat	3–5	18	15
İyi	6–9	20	25
Mükemmel	10–20	20	45
Uç değerler	21–50+	2	10

3. Folliküler gelişim-dalga

Folliküler dalga; bir grup (4–6 adet) follikülün senkronize bir şekilde gelişmeye başlamasıdır (Fortune 1993, Mapletoft ve ark. 1994). Gelişen folliküllerin çapı 4–5 mm'ye ulaştığında, içlerinden bir tanesi dominant follikül olarak gelişmesine devam ederken diğer folliküller atreziye olmaktadır (Garcia ve ark. 1999). İnek ve düveler bir östrüs siklusu içinde daha çok 2 veya 3, daha az olarak da 1 veya 4 folliküler dalgaya sahiptir (Çoyan 2002, Bülbül ve Ataman 2003). Yapılan çalışmalarda 1, 2, 3 ve 4 dalgalı sikluslarda folliküler dalgaların ilk ortaya çıkışlarının sırasıyla siklusun 1; 0–4 ve 9–11; 0–4, 9–

12 ve 16; 2, 8, 14 ve 17. günlerinde olduğu tespit edilmiştir (Savio ve ark. 1988, Sirois ve Fortune 1988, Ginther ve ark. 1989).

İneklerde süperovulasyon uygulamasına östrüs siklusunun 8–12. günleri arasında başlanması gerektiği ultrasonografi tekniğinin kullanıma girmesinden önce geçerli olan genel bir kanıdır (Mapletoft ve Bó 2004). Fakat 2. folliküler dalganın ortaya çıkışı için bildirilen bu günlerin her zaman kesin olmadığı ortaya konmuştur (Webb ve Armstrong 1998). Genel olarak 2. folliküler dalganın başlangıç zamanı bireyler arasında farklılıklar göstermekte ve 2 dalgalı sikluslarda 3 dalgalı sikluslara göre 1–2 gün daha erken başlamaktadır

(Sirois ve Fortune 1988). Bu bilgiler ışığı altında, gonadotropin uygulamalarına folliküler dalganın ortaya çıkışına en yakın zamanda başlanması gerektiği aksi takdirde süperovulasyon cevabının olumsuz etkileneceği bildirilmektedir (Merton ve ark. 2003). Mapletoft ve ark. (2002b), süperovulasyon uygulamasının folliküler dalganın ortaya çıktığı gün ya da bir gün önce başlaması halinde cevabın artacağını belirtmektedir.

Östrüs siklusunun ancak yaklaşık %20'sinin süperovulasyon uygulamasına başlamak için uygun olduğu, %80'inin ise yeterli cevap almak için uygun olmadığı tespit edilmiştir (Bó ve ark. 2002). Bahsedilen olumsuzluğu aşmak için son yıllarda folliküler dalganın da senkronize edildiği süperovulasyon programları tercih edilmektedir (Sartori ve ark. 2004, Gordon 2005, Mapletoft ve Hasler 2005).

Folliküler gelişimi senkronize etmenin yollarından birisi ovaryumda bulunan ≥ 5 mm çapındaki bütün

folliküllerin transvaginal ultrason eşliğinde uzaklaştırılması ve bunu takiben 1 gün sonra FSH uygulamasına başlanmasıdır (Kanitz ve ark. 2002, Bó ve ark. 2002, Mapletoft ve Bó 2004). Folliküler gelişimin senkronizasyonunda kullanılan bir başka yol da süperovulasyondan önce porcine LH (pLH) veya GnRH uygulamasıdır. Fakat bu yöntemin her zaman iyi sonuç vermediği bildirilmektedir (Mapletoft ve Bó 2004).

Süperovulasyon programları öncesinde folliküler gelişimin senkronizasyonu amacıyla en çok tercih edilen yöntem ise kontrollü ilaç (progesteron) salınımı yapan gereçlerin (CIDR) uygulaması ile birlikte 5 mg östradiol (E)-17 β + 100 mg progesteron enjeksiyonunu takiben 4 gün sonra FSH uygulamaya başlanmasıdır. Östrüs siklusunun herhangi bir döneminde başlanabilen bu yöntem ile siklusun 8–12. günlerinde süperovulasyona başlanan yöntemler kadar embriyo elde edilebildiği bildirilmektedir (Tablo 4) (Bó ve ark. 2002, Andrade ve ark. 2003).

Tablo 4. İneklerin, östrüsten sonraki 9–12. günlerde (standart protokol, Grup I) ve östrüs siklusunun 0 (Grup II), 2–6 (Grup III), 7–12 (Grup IV), 13–16 (Grup V) ve 17–20. (Grup VI) günlerinde 5 mg östradiol (E)-17 β + 100 mg progesteron enjeksiyonu + CIDR uygulandıktan sonraki 4. günde başlanan süperovulasyon uygulamasına verdikleri cevaplar ve elde edilen gebelik oranları (Andrade ve ark. 2003).

	Toplam ovum-embriyo/inek	Transfer edilebilir embriyo/inek	Gebelik oranı (%)
Grup I	14.2	7.4	67
Grup II	13.3	7.1	61
Grup III	13.5	8.1	63
Grup IV	17.4	9.4	64
Grup V	16.9	9.8	72
Grup VI	13.0	7.2	61

Folliküler gelişimin senkronizasyonu sayesinde östrüs siklusunun evresine bakılmaksızın süperovulasyona başlanabilmekle birlikte, siklusun 8–12. günlerini beklemeye ve östrüs ve ovulasyon takibine gerek kalmamaktadır (Şekil 3) (Mapletoft ve ark. 2002a,b).

Ovaryum fonksiyonları normal olmayan inekler fonksiyonel bir korpus luteuma sahip olamayabileceğinden süperovulasyon uygulamaları başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, norgestomet içeren ve kulak derisi altına yerleştirilen implantların yapay korpus luteum etkisi oluşturarak ve ayrıca enjekte edilen östradiol valerate'ın da yeni bir folliküler gelişimi uyararak böyle problemliliklerden yeterli cevabın alınmasına olanak sağladığı bildirilmektedir (Mapletoft ve Bó 2004).

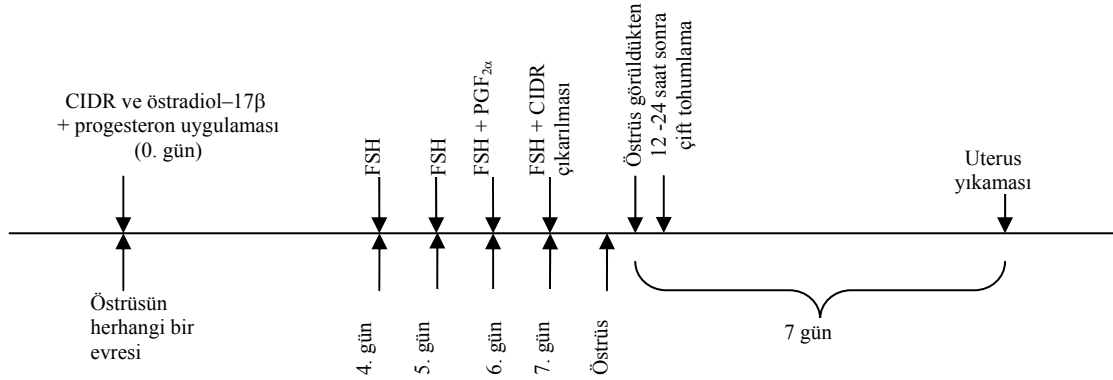
Ovaryumda bulunan küçük follikül sayısının süperovulasyon cevabı üzerine etkili olduğu ve küçük folliküllerin ultrason yardımıyla sayılmasıyla gelişecek cevap hakkında bilgi edinilebileceği bildirilmektedir (Hasler 1992). Donörün ovaryumlarının küçük olması da süperovulasyon uygulamasına yanıt verecek follikül sayısının yeterli olmadığını gösterdiği için istenmeyen bir özelliktir (Kanagawa ve ark. 1995).

Cushman ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, ineğin ovaryumunda bulunan primordial havuz ve tersiyer follikül havuzu ne kadar büyükse süperovulasyon cevabının da o ölçüde fazla olacağını tespit etmişlerdir.

Bazı araştırmacılar siklus ortasında FSH uygulamasına başlandığı sırada ovaryumda dominant bir follikülün bulunmasının süperovulasyon cevabını azalttığını (Rajamahendran ve Calder 1993, Merton ve ark. 2003), süperovulasyon uygulamasına başlandığı sırada dominant follikülün uzaklaştırılmasının elde edilecek embriyo sayısını artırabileceğini (Gali ve ark. 2003, Hasler 2004) belirtmektedir. Bunun yanında Kim ve ark. (2001), östrüsün 8. gününde ineklerin ovaryumunda bulunan dominant follikül aspire etmişler ve bundan 2 gün sonra FSH enjeksiyonuna başlamışlardır. Araştırmacılar uygulamadan 48 saat önce dominant follikülün uzaklaştırılmasının folliküler gelişimi uyardığını ve süperovulasyon cevabını artırdığını vurgulamaktadır. Bununla birlikte bu uygulamaya verilecek cevabın değişken olabileceği ve gelişecek folliküllerin atreziye uğrayabilecekleri veya kistik yapı kazanabilecekleri belirtilmektedir (Liu ve Sirois 1998).

Diaz ve ark. (2001) ise, süperovulasyon uygulaması sırasında ovaryumda bulunan dominant follikülün süperovulasyon cevabına etkisini araştırdıkları çalışmalarında, çalışma grubundaki ineklerde

dominant follikülü aspire ederek uzaklaştırmışlardır. Araştırmacılar süperovulasyon sırasında ovaryumda dominant follikül bulunmasının süperovulasyon cevabını etkilemediğini bildirmişlerdir.



Şekil 3. Östrüs gözlenmeden yapılan süperovulasyon uygulaması (Mapletoft ve ark. 2002b).

4. Diğer faktörler

Süperovulasyon cevabı üzerine sürü yönetimi, hastalıkların kontrolü, çevresel faktörler ve hava şartlarının da etkili olduğu vurgulanmaktadır (Žižlavský ve ark. 2002). Embriyo transferi çalışmalarının fertilitenin düşük olduğu mevsimde yapılması, cevabı önemli ölçüde etkilemektedir (Siedel ve Siedel 1991).

İnekler bütün bir yıl boyunca östrüs göstermektedir (White ve ark. 2002). Bununla birlikte mevsim, gün ışığı ve çevre ısısı ineklerde reproduktif faaliyetler üzerinde etkin role sahiptir (Willard ve ark. 2003, Sönmez ve ark. 2005). Sıcak stresi kuru madde alımını azaltır ve oluşan negatif enerji dengesi insülin, insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) ve glikozun plazma konsantrasyonunu düşürür. İnsülin, IGF-I ve glikoz follikül gelişiminde

önemli role sahiptir. Ayrıca glikozun plazma konsantrasyonunun azalması LH salınımını baskılayarak oosit kalitesini azaltmaktadır. Yaz aylarında folliküler gelişim üzerine baskılayıcı etkiye sahip olan prolaktinin konsantrasyonu artmaktadır (DeRensis ve Scaramuzzi 2003). Al-Katanani ve ark. (2002), yazın toplanan ovariumlardan elde edilen oositlerin invitro fertilizasyon sonrası bölünme oranının kışın elde edilenlere göre daha az olduğunu vurgulamaktadır.

Benyei ve ark. (2003), sıcak stresinin neden olduğu hiperterminin oosit kalitesini düşürdüğünü ve embriyo üretimini azalttığını bildirmektedir. Hansen ve ark. (2001) ise, sıcak stresinin özellikle sütçü ineklerde süperovulasyon cevabını olumsuz etkilediğini, etçi ineklerin ise bu duruma daha dayanıklı olduğunu vurgulamaktadırlar (Tablo 5).

Tablo 5. Sütçü ve etçi ineklerde çevre sıcaklığının süperovulasyon cevabına etkisi (Hansen ve ark. 2001).

		Çevre sıcaklığı (°C)		
		<27	27–32	32–40
Sütçü ırk	Toplam ova/inek	9.0	9.5	1.3
	Transfer edilebilir embriyo/inek	6.5	4.3	0.3
Etçi ırk	Toplam ova/inek	12.7	11.8	12.2
	Transfer edilebilir embriyo/inek	7.2	7.5	7.1

Beslenmenin elde edilecek embriyo sayısı ve kalitesi üzerine etkili olduğu bildirilmektedir (Boland ve ark. 2001). Kanagawa ve ark. (1995), süperovulasyon amacıyla gonadotropin uygulanmasının ardından ineğin beslenme

yetersizliğine maruz kalmasının süperovulasyon cevabını azalttığını belirtmektedir.

Konsantre yem tüketiminin artması süperovulasyon cevabını düşürmektedir. Özellikle uzun süre fazla miktarda konsantre yemle beslenen

ineklerden daha az sayıda kaliteli embriyo elde edilmektedir (Yaakub ve ark. 1999a). Mikkola ve ark. (2005), kuru maddede %14 veya %18 ham protein içeren rasyonla besledikleri ineklerde süperovulasyon cevabının farklılık arz etmediğini bildirmektedir. Donörlerin tükettikleri yem çeşidinin de cevap üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (Bader ve ark. 2005). Yaakub ve ark. (1999b) yaptıkları çalışmada inekleri %80 arpa veya %18 mısır+%31.5

turunç posası+%31 pancar posası karışımı içeren rasyonlarla 116 gün boyunca günde 3 kg veya adlibitum olarak beslemişlerdir. Araştırmacılar süre sonunda yaptıkları süperovulasyon çalışmalarında 3 kg yemle beslemenin adlibitum beslemeye göre daha fazla süperovulasyon cevabı sağladığını ve ayrıca mısır/turunç/pancar karışımı ile besleme sonucunda daha fazla sayıda transfer edilebilir embriyo elde edildiğini bildirmektedirler (Tablo 6).

Tablo 6. Beslenme şeklinin süperovulasyon cevabına etkisi (Yaakub ve ark. 1999b).

Beslenme şekli	3 kg	Adlibitum
Korpus luteum	15.5	12.3
Toplam ovum/embriyo	9.5	6.5
Transfer edilebilir embriyo	4.8	2.8

Beslenme şekli	Arpa	Mısır/Turunç/Pancar
Korpus luteum	13.4	14.4
Toplam ovum/embriyo	7.9	8.1
Transfer edilebilir embriyo	2.9	4.8

Donörlerin süperovulasyon uygulaması döneminde uzun süren yolculuklardan kaçınılması gerektiği, bununla birlikte 3–4 saatlik yolculukların cevabı olumsuz etkilemediği bildirilmektedir (Siedel ve Siedel 1991).

SONUÇ

Sonuç olarak, gelişmekte olan ve zaman içerisinde ülkemizde de uygulama alanı bularak yaygınlaşması kaçınılmaz olan embriyo transferinin en önemli aşamalarından birisi süperovulasyondur. Bu kritik aşamada elde edilecek embriyo sayı ve kalitesi birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bahsedilen faktörlerin iyi anlaşılması olumsuz durumların elimine edilmesi, ülkemiz şartlarında embriyo transferinin uygulanabilirliği açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Akyol N (2001) Sığır embriyo transferinde hormon kullanımı. *Lalahan Hay Arşt Derg*; 41 (1): 95–104.
- Akyol N, Kızıl SH, Tuncer PB (2004) İneklerde süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmaları. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*; 44 (1): 1–5.
- Alaçam E (1990) Embriyo nakli. In "Therigenoloji". Ed. E Alaçam. Nurol Matbaacılık. Konya.
- Alaçam E (1997) Embriyo nakli. In "Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite". Ed. E Alaçam. Medisan. Ankara.
- Al-Katanani YM, Paula-Lopez FF, Hansen PJ (2002) Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci*; 85: 390–396.

- Almeida AP (1987) Superovulation in cattle: a combined treatment using synchromate B with either PMSG or FSH. *Therigenology*; 27 (1): 203.
- Andrade JC, Oliveira MA, Lima PF, Guido SI, Bartolomeu CC, Teorio Filho F, Pina VM, Lunes-Souza TC, Paula NR, Freitas JC (2003) The use of steroid hormones in superovulation of Neloro donors at different stages of estrous cycle. *Anim Reprod Sci*; 77 (1–2): 117–125.
- Arthur GH, Noakes DE, Pearson H (1992) *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 6th edition. Baillière Tindall. London.
- Bader JF, Kojima FN, Wehrman ME, Lindsey BR, Kerley MS, Patterson DJ (2005) Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows. *Anim Reprod Sci*; 85: 61–70.
- Benyei B, Gaspard A, Cseh S (2003) Effect of the El Nino phenomenon on the ovarian responsiveness and embryo production of donor cows. *Acta Vet Hung*; 51 (2): 209–218.
- Betteridge KJ (2006) Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives. *Therigenology*; 65 (5): 905–913.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ (2002) The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Therigenology*; 57: 53–72.
- Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D (2001) Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Therigenology*; 55: 1323–1340.

- Bülbül B, Ataman MB (2003) İnek ve düvelerde folliküler gelişim ve fertiliteye etkisi. *Türk Vet Hek Derg*; 15 (2): 56–63.
- Curtis JL (1991) Cattle embryo transfer procedure. Academic Press Limited. London.
- Cushman RA, DeSouza JC, Hedgpeth VS, Britt JH (1999) Superovulatory response of one ovary is related to the micro and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol Reprod*; 60: 349–354.
- Çoyan K (2002) Reprodüktif fizyoloji. In “Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Sun’i Tohumlama”. Ed. K Çoyan. S. Ü. V. F. Yayın Ünitesi. Konya.
- De Rensis F, Scaramuzzi RJ (2003) Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology*; 60: 1139–1151.
- Diaz T, Pancarci SM, Drost M, Schmitt EJ, Ambrose JD, Fredrikson WE, Thatcher WW (2001) Effects of the persistent dominant follicle on the ability of follicle stimulating hormone to induce follicle development and ovulatory responses. *J Dairy Sci*; 84: 88–99.
- Diaz C, Quintela LA, Peña AI, Becerra JJ, Herradón PG (1999) Influencia del día de inicio del tratamiento en los resultados de superovulación en vacas lecheras. *Arch Zootec*; 48: 43–50.
- Dursun Ş, Bülbül B, Kırbaş M, Köse M, Çolak M (2006) İsviçre Esmeri inek ve düvelerde süperovulasyon cevabının karşılaştırılması. II. Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 2–5 Kasım, Antalya.
- Fortune JE (1993) Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? *Anim Reprod Sci*; 33: 111–125.
- Gali C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2003) Bovine embryo technologies. *Theriogenology*; 59: 599–616.
- Garcia A, Van Der Veijden GC, Colenbrander B, Bevers M (1999) Monitoring follicular development in cattle by real-time ultrasonography: A review. *Vet Rec*; 145: 334–340.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil*; 87: 223–230.
- Gordon IR (2005) Reproductive technologies in farm animals, CAB International, Cambridge.
- Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Krininger CE, Chase CC (2001) Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*; 55: 91–103.
- Hasler JF (1992) Current status and potential of embryo transfer and reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci*; 75: 2857–2879.
- Hasler JF (2004) Factors influencing the success of embryo transfer in cattle. 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada, July 11-16.
- Hasler JF (2006) The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology*; 65: 4–16.
- Herman HA, Mitchell JR, Doak GA (1994) The artificial insemination and embryo transfer of dairy cattle. Interstate Publishers, Illinois.
- Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N (1995) Manual of bovine embryo transfer. National Livestock Breeding Center MAFF, JICA, Japan.
- Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner HP, Pöhland R (2002) Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev*; 42: 587–599.
- Kim IH, Son DS, Yeon SH, Choi SH, Park SB, Ryu IS, Suh GH, Lee DW, Lee CS, Lee HJ, Yoon JT (2001) Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*; 55: 937–945.
- Liu J, Sirois J (1998) Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biol Reprod*; 58: 1527–1532.
- Lopes da Costa L, Chagas e Silva J, Robalo Silva J (2001) Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*; 56 (1): 65–77.
- Mapletoft RJ, Bó GA (2004) The control of ovarian function for embryo transfer: superstimulation of cows with normal or abnormal ovarian function. 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada, July 11–16.
- Mapletoft RJ, Bo GA, Pierson RA (1994) Recruitment of follicles for superovulation. *Continuing Education*; 16: 127–141.
- Mapletoft RJ, Hasler JF (2005) Assisted reproductive Technologies in cattle: a review. *Rev sci tech Off int Epiz*; 24 (1): 393–403.
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP (2002a) Recent advances in superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev*; 42 (6): 601–611.
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP (2002b) Superovulation in perspective. Bioniche Animal Health Customer Service.
- Marshall DM, Minyard JA (2006) Embryo transfer in beef cattle. <http://agbiopubs.sdstate.edu/articles/ExEx2001.pdf>.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ (2003) Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo Technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*; 59 (2): 651–674.
- Mikkola M, Mäntysaari P, Tammiranta N, Peippo J, Taponen J (2005) Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Anim Reprod Sci*; 87: 193–202.
- Mori J (1999) Textbook on advances farm animal embryo transfer hormone research. JICA, Japan.

- Nakajima A, Hiraizumi S, Onodera K, Suzuki H, Kudo Y, Domeki I (1992) The use of bovine anti-PMSG serum in beef cattle after PMSG-superovulation. *J Vet Med Sci*; 54 (1): 95–98.
- Novotný F, Hajurka J, Macák V (2005) Relationship between blood serum progesterone levels in cattle donors and the yield and quality of embryos. *Bull Vet Inst Pulawy*; 49: 49–52.
- Quaresma MA, Lopes da Costa L, Robalo Silva J (2003) Superovulation of Mortelenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLTROPIN). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*; 98: 81–84.
- Rajamahendran R, Calder MD (1993) Superovulatory responses in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave. *Theriogenology*; 40: 99–109.
- Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC (2004) Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod*; 1 (1): 86–90.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF (1988) Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *J Reprod Fertil*; 83: 663–671.
- Selk G (2006) Embryo transfer in cattle. <http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3158web.pdf>.
- Siedel GE, Siedel SM (1991) Training manual for embryo transfer in cattle. *FAO Animal Production and Health Paper 77*. Rome.
- Sirois J, Fortune JE (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by Real-Time ultrasonography. *Biol Reprod*; 39: 308–317.
- Sönmez M, Demirci E, Türk G, Gür S (2005) Effect of season on some fertility parameters of dairy and beef cows in Elazığ province. *Turk J Vet Anim Sci*; 29: 821–828.
- Tekeli T (1997) Embriyo Nakli. In “Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite”. Ed. E Alaçam, Medisan, Ankara.
- Webb R, Armstrong DG (1998) Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Prod Sci*; 53: 95–112.
- White JF, Wettemann RP, Looper ML, Prado TM, Morgan GL (2002) Seasonal effects on estrous behavior and time of ovulation in nonlactating beef cows. *J Anim Sci*; 80: 3053–3059.
- Willard S, Gandy S, Bowers S, Graves K, Elias A, Whisnant C (2003) The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology*; 59: 1799–1810.
- Yaakub H, O’Callaghan D, Boland MP (1999a) Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and in vitro fertilisation and development of oocytes recovered from beef heifers. *Anim Reprod Sci*; 55: 1–12.
- Yaakub H, O’Callaghan D, Boland MP (1999b) Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*; 51: 1259–1266.
- Žižlavský J, Říha J, Urban F, Máchal L, Štípková M (2002) Production of embryos from repeated superovulations of cows during one calving interval. *Czech J Anim Sci*; 47 (3): 92–97.