

## KOYUNLARDA LAPAROSKOPİK YÖNTEMLE EMBRİO NAKLİ\*

Tevfik TEKELİ<sup>1</sup>

Kenan ÇOYAN<sup>2</sup>

Melih AKSOY<sup>2</sup>

Ahmet SEMACAN<sup>1</sup>

M. Kürşat IŞIK<sup>3</sup>

### Laparoskopische Embryotransfer beim schaf

#### ZUSAMMENFASSUNG:

In der vorliegenden Arbeit wurde beim Schaf die Möglichkeit der laparoskopischen Embryotransfer als alternative Methode zu Laparotomie untersucht. Die Spender und Empfänger Tiere wurden im natürlichen Brunst ausgewählt. Um eine Superovulation auszulösen, wurden, 12. bzw. 13. Tag des Zyklusses 1250 I.U. PMSG verabreicht. Nach Brunsteintritt wurden die Tiere im Abstand von 12 Stunden zweimal belegt. Die Embryogewinnung fand am 6 und 7 Tag nach Bedeckung statt. Bei Laparotomie fand eine antegrade Spültechnik mit Ballonkatheter. Als Spülmedium diente mPBS. Sofort nach der Gewinnung wurde die Embryonen morphologisch beurteilt und anschließend in Minipailletten aufgezogen. Der laparoskopische Transfer erfolgte entsprechend dem Gewinnungstag der Embryonen. Pro Schaf wurden 3 Embryonen übertragen. Nach Transfer von 9 Embryonen auf drei Schafe wurde 1 trächtig und brachte 2 Lämmer zur Welt.

Die Ergebnisse zeigen, dass laparoskopischen Embryotransfer relativ einfach im Vergleich zu chirurgischen Embryotransfer ist. Nach laparoskopischen Embryotransfer wurde keine postoperative Adhäsion und Infektion beobachtet.

SCHLÜSSEL WÖRTER: Schaf, Laparoskopische, Embryotransfer.

#### ÖZET:

Sunulan çalışmada, operatif yöntemle alternatif olarak, laparoskop yardımıyla embrioların taşıyıcı koyunlara nakil imkanlarının araştırılması amaçlandı. Verici ve taşıyıcı koyunlar, doğal östrüs gösterenler arasından seçildi. Süperovulasyon amacıyla, verici koyunlara seksüel siklusun 12-13. gününde 1250 I.U. PMSG, i.m. enjekte edildi. Östrüslerin izlenmesinden sonra, verici koyunlara 12 saat ara ile iki kez doğal aşım yapıldı ve aynı koyunlara aşımı izleyen 6-7. günlerde embrioların elde edilmesi amacıyla laparotomi uygulandı. Uterus, antegrat yıkama tekniğine göre, balon kateter yardımıyla mPBS vasatı ile yıkandı. Elde edilen embriolar, morfolojik olarak kontrol edildikten sonra payetlere çekilerek, laparoskop yardımıyla taşıyıcı koyunların corpus luteumunun bulunduğu cornu uterisine nakledildi. Nakil sırasında, alıcılar ile vericilerin seksüel siklusun aynı günde olmasına özen gösterildi. Taşıyıcı olarak seçilen üç koyundan herbirine, üçer embrio nakledildi ve sonuçta, nakil yapılan üç koyundan biri gebe kalarak, iki adet canlı yavru elde edildi.

Sonuç olarak, laparoskopik yöntemle embrio naklinin post operatif yapıma, bakteriyel enfeksiyon riskinin azaltılması ve uygulama kolaylığı yönünden, cerrahi yöntemle göre daha avantajlı olabileceği kanısına varıldı.

ANAHTAR KELİMELEER : Koyun, Laparoskopi, Embriyo nakli.

### GİRİŞ

Koyun ve keçilerde embrio nakli, ilk olarak 1933 yılında gerçekleştirilmiş, daha sonraki yıllarda, çeşitli araştırmalar yapılarak bu konuda önemli gelişmeler sağlanmıştır (3). Ancak bu gelişmeler, koyunlarda, ineklere göre oldukça sınırlı kalmıştır.

Embrio naklinin tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanımı, ancak operatif olmayan embrio toplama ve nakil tekniklerinin geliştirilmesine bağlıdır. Koyunlarda, son yıllara kadar embrioların elde edilmesinde ve elde edilen embrioların nakledilmesinde, laparotomi ve bunu takiben uterusun operasyon hattından dışarı alınmasına gerek duyulmaktaydı (5, 7). Operatif yöntem uygulandığı takdirde, operasyonun doğal sonucu olarak dokular travmatize olmakta, bakteriyel enfeksiyon riski artmakta, operasyon yaralarının iyileşmesinde sorunlarla karşılaşabilmekte ve sonradan infertiliteye neden olan, post operatif doku dehidrasyonları ve adezyonlar şekillenebilmektedir. Ayrıca bu yöntemle, alıcı koyunların uzun süreli kullanıma olanağı azalmakta ve nakil esnasında zaman kaybına neden olmaktadır (6, 7, 9). Bu nedenle, koyunlarda embrioların toplanması ve nakli için alternatif bir yöntemle gerek duyulmaktadır.

Koyunlarda embrio nakli için alternatif yöntemlerden biri olan embrioların transcervikal nakli, küçük ruminantlarda, büyük ruminantlarda olduğu kadar pratik bulunmamaktadır. Bu amaçla, en uygun ve başarılı teknik, laparoskopik nakil yöntemidir. Bu yöntem, ayrıca koyunlarda;

ovaryumda şekillenen değişikliklerin gözlenmesi (16), östrüs davranışı-hipofiz ovaryum ilişkisi (1), ovulasyon sayısının belirlenmesi (15), gebelik tanısı, fötüs sayılarının belirlenmesi (11) ve son yıllarda, abdominal intrauterin tohumlama amacıyla başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (8, 14, 24).

Bu çalışmada; embrio nakli amacıyla, kullanılan operatif yöntemin oluşturduğu olumsuz faktörlerin ortadan kaldırılması için alternatif bir yöntem olarak; koyunlarda, abdominal intrauterin tohumlamada kullanılan teknik ve gereçler kullanılarak, payetler içerisine yerleştirilen koyun embriolarının, laparoskop yardımıyla nakledilebilme olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

### MATERYAL VE METOT

Çalışmada; Konya, Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait aşım sezonunda bulunan ve yaşları 4-7 arasında değişen 5 baş Merinos ırkı verici, 3 baş Akkaraman ırkı alıcı ve 1 baş Merinos ırkı koç olmak üzere, toplam 9 baş hayvan kullanılmıştır.

Alıcı ve verici koyunların tamamı, sürü içerisinde doğal östrüs gösteren ve normal doğum yapan hayvanlar arasından seçildiler. Koç ise; 3 yaşlı olup, fertilitesi daha önceden belirlenen ve sun'i tohumlamada kullanılan damızlıklar içerisinde seçildi.

#### Süperovulasyon, Embrioların Elde Edilmesi ve Değerlendirilmesi:

Süperovulasyon amacıyla, verici koyunlara sikluslarının (östrüs = 0) 12-13. gününde 1250 I.U. PMSG® enjekte edildi. Arama koçları

\* : Bu proje, Tarım ve Köyleri Bakanlığına desteklenmiştir.

1: S.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Repr., A.B. Dalı, KONYA.

2: S.Ü. Veteriner Fakültesi, Sun-i Tohumlama A.B. Dalı, KONYA.

3: Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürüğü, KONYA.

ile östrüs gösterenler belirlenerek, 12 saat ara ile 2 kez tabii aşım yaptırıldı. Verici koyunlardan 3'üne aşımı izleyen 6. günde, diğer 2' sine de 7. günde laparotomie uygulanarak, her birinin cornu uterileri ayrı ayrı yıkandı. Bu amaçla; koyunlar, özel olarak, bu iş için Enstitü atölyesinde imal edilmiş olan operasyon masası üzerine, sırt üstü yatırılarak, genel anestezi altında, memelerin hemen önünden başlanarak, median çizgiye paralel olarak 10 cm uzunluğunda ensizyon yapıldı. Uterus, ensizyon hattının dışına alındıktan sonra, cornu uteri üzerinde bifurkasyon noktasından 1-2 cm cranialde, yıkama sırasında cornu uteriye verilecek yıkama vasatının cervix ve diğer cornu uteriye geçmesini önlemek amacıyla, bir barsak pensu uygulandı. Daha sonra, utero-tubal birleşme yerine yakın bölgede cornu uterinin duvarı, ucu küt bir iğne ile delinerek, % 3 fetal buzağı serumu içeren mPBS vasatı ile yıkandı. Cornu uteriye, baş ve işaret parmakları ile hafif masaj uygulayarak, önceden barsak pensinin hemen önüne yerleştirilen Rüşch kateteri yardımıyla, yıkama vasatının büyük boy petri kapları içerisinde toplanması sağlandı. Aynı işlemler diğer cornu uteri için de tekrarlandıktan sonra, uterus normal konumuna getirilerek karın boşluğu kapatıldı.

Büyük petri kaplarında bulunan yıkantılar, embrioların dibe çökmelerini sağlamak amacıyla, oda ısısında 30 dakika süre ile bekletildi. Yıkantılar, daha sonra stereo mikroskop altında kontrol edildi. Bulunan embriolar, bir ağız pipeti yardımıyla daha küçük olan steril petri kaplarında toplanarak, gelişme aşamaları belirlendi.

Daha sonra, embriolar suni tohumlamada kullanılan payetler içerisine, her bir payet içerisinde 3 adet embrio olacak şekilde yerleştirilerek, nakil için hazır hale getirildi.

#### Embrioların Taşıyıcı Koyunlara Nakli:

Taşıyıcılar; vericilerden 24 saat sonra östrüs gösteren, Akkaraman ırkı koyunlar arasından seçildi. Siklusun 6. gününde bulunan taşıyıcılar, sırt üstü yatırıldı ve paramedian bölge traş edildi. Memelerin 5 cm kadar önünde, median hattın sağında ve solunda iki noktaya % 2 Lidocain HCL+Epinefrin (Jetocain®) ile lokal infiltrasyon anestezisi uygulandı.

Anesteziyi takiben, bölge dezenfekte edildikten sonra masaya 45° lik eğim verilerek, karın organlarının cranialde doğru yer değiştirmeleri sağlandı. Deri gerdirildikten sonra, laparoskopun geçeceği trokar, sol memenin 5 cm altından, kateterin gireceği trokar ise sağ memenin 5 cm altındaki lokal infiltrasyon anestezisi uygulanan noktalardan, karın boşluğuna yerleştirildi. Daha sonra, trokarların kanülleri çıkarılarak, laparoskop ve ucu yuvarlak stile ile girilerek, uterus ve ovaryumlar bulundu. Corpus luteumun gözlenmesini takiben, stile dışarı çekildi.

Embrioların bulunduğu payet, katetere yerleştirildi. Stilenin dışarı alındığı trokardan, ucunda enjeksiyon kanülü bulunan kateter ile karın boşluğuna girildi. Enjeksiyon kanülü, laparoskopun objektifinden gözlenerek, corpus luteumun bulunduğu taraftaki cornu uteriye yönlendirildi. Daha sonra, lümene girilerek payet içerisinde bulunan embriolar, vasat ile birlikte nakledildi. Embrioların naklinden sonra, taşıyıcı koyunlara koruyucu olarak kas içi 1 ml antibiyotik (Baytril®) enjekte edildi. Taşıyıcı olarak seçilen 3 baş Akkaraman koyuna, 3'er adet embrio nakledildi.

Embrioların naklini izleyen 2 siklus süresince; arama koçu yardımıyla, taşıyıcı koyunların östrüsleri takip edildi ve embrio naklinden 60 gün sonra da, laparoskop yardımıyla, gebelik tanısı yapıldı.

#### BULGULAR

Çalışmada, verici olarak kullanılan 5 baş Merinos ırkı koyunun, süperovulasyon sonucu ovaryumlarındaki corpus luteum sayısı, cornu uterilerinin yıkanmaları sonrası, her bir cornu uteriden elde edilen embrio sayısı ile embrio elde etme oranlarına ilişkin bulgular Tablo 1'de ve nakil sonuçları da Tablo 2'de sunulmuştur.

Laparoskopik yöntemle embrio nakli yapılan koyunların hiç birisinde, post operatif komplikasyon gözlenmedi.

Tablo 1. Verici Koyunların Ovaryumlarındaki Corpus Luteum Sayıları, Uterustan Elde Edilen Embrio ve Döllenenmiş Ovum Sayıları ve Embrio Elde Etme Oranları.

Verici Koyunlar	Corpus Luteum Sayısı		Embrio ve Ovum Sayısı		Emb. ve Ovum Elde Etme oranı (%)	Transfer Edilebilir Embrio Sayısı ve %'si
	Sol ov.	Sağ ov.	Sol cor.	Sağ cor.		
A	2	4	1(boş)	2	50	2 (66.7)
B	2	2	1(boş)	2	75	2 (66.7)
C	4	4	2	1	37.5	3 (100.0)
D	3	5	3	3	75	6 (100.0)
E	0	2	0	0	0.0	0 (0.0)

Tablo 2: Embrio Nakil Sonuçları.

Nakledilen Embrio Sayısı	Taşıyıcı Koyun Sayısı	Doğum Yapan Koyun Sayısı ve %'si	Doğan Kuzu Sayısı
9	3	1 (% 33)	2

#### TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada, verici ve taşıyıcı hayvan seçiminin aşım sezonu içerisinde yapılması ve sürünün yeterince kalabalık olması nedeniyle verici ve taşıyıcıların senkronizasyonu için herhangi bir program uygulanmayıp, hayvanlar doğal östrüslerinde seçilmiştir.

Koyunlarda süperovulasyon amacıyla PMSG, FSH ve HMG' nin başarıyla kullanıldığı bildirilmektedir (2, 3, 17, 23, 25). Verici koyunlarda, PMSG enjeksiyonları ile yapılan süperovulasyon tedavisi sonuçları, literatür verilerine paralellik göstermekle beraber (1, 5, 7, 9), Moebis (17)'in bildirdiği orandan yüksek, ancak; Bode (3) 'nin, ASB x Finlandiya melezlerinden elde ettiği 11.1'lik ovulasyon oranından düşük bulunmuştur.

Bode (3), süperovulasyon sonuçlarının, koyunlar arasında farklılık göstermesini bireysel ovaryum reaksiyonlarına, kullanılan hormona, dozuna, verilme şekline, hayvanın yaşına ve besi durumuna bağlı olduğunu bildirmektedir. Merinos koyunlarda, süperovulasyon sonuçlarının benzerlik göstermesi ve ikizlik oranı yüksek olan koyunlarda, süperovulasyon cevabında yüksek olması; süperovulasyon oranlarına, ırk faktörünün de etkili olduğu görüşünü doğrulamaktadır.

Embrioların elde edilmesi amacıyla, uterusun yıkanması için koyunlarda değişik yöntemler önerilmektedir (4, 5, 6, 9, 12, 15, 19, 20, 21). Uterusun transcervical yıkanması sonucu Grupp (9) %32-60; Barry (2) %65 oranında embrio elde ettiklerini bildirmektedirler. Laparoskopik yöntem ile Mc Kelvey ve ark (13, 15) %35-76; Mylne ve ark (20) %45-74; Legendre ve ark (12) % 35-79 oranlarında, embrio elde etmişlerdir. Cerrahi yöntem ile Bode (3) ve Bouabid (5), sırasıyla %45-71 oranında embrio elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada, tesbit edilen % 66.7 'lik embrio elde etme oranı, literatür verileri ile benzerlik göstermektedir. Cervix dilatatörlerinin pahalı olması nedeniyle, transcervical yıkama yöntemi koyunlarda ekonomik değildir. Laparoskopik yardımıyla embrioların elde edilmesi ise; laparotomie'ye göre, daha avantajlı görünmekle birlikte; embrioların elde edilme oranı, daha düşük bulunmaktadır.

Koyunlarda cerrahi yöntem ile yapılan embrio nakillerinde, elde edilen gebelik oranı % 16-75 arasında değişmektedir (10, 17, 18, 23). Laparoskopik yöntem ile elde edilen gebelik oranı ise % 40.7-50 arasındadır

(22, 26). Çalışmada, elde edilen %33.3'lük gebelik oranı, laparoskopik yöntem ile elde edilen gebelik oranlarından düşük, cerrahi yöntem ile elde edilen %16'lık (22), gebelik oranından yüksek, Armstrong ve Evans'ın (1), elde ettiği %31.5'lik gebelik oranına yakın bulunmuştur. Sonuç olarak; laparoskopik yöntemle embrio naklinin post operatif, yapışma ve bakteriyel enfeksiyon riskini azaltması, manipulasyonların daha kısa sürmesi ve uygulama kolaylığı yönünden, cerrahi yöntemle göre daha avantajlı olabileceği kanısına varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Armstrong DT, Evans G (1984) Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19, 31-32
2. Barry DM, Van Niekerk CH, Coetzer WA, Robertson MS (1988) Superovulatory response and the time of ovulation in sheep treated with FSH-p or PMSG followed by GnRH or hCG. *Theriogenology*, 29 (1) 217.
3. Bode GW (1984) Superovulation und Eigewinnung bei schafen mit unterschiedlicher Fortpflanzungsleistung nach stimulation mit PMSG und FSH. *Vet.Med.Diss., Berlin*.
4. BonDurant RH, Skirrow S, Anderson GB, Hanson F, Rogers WH (1984) Nonsurgical collection of blastocysts from dairy goats. *Theriogenology*, 22 (4) 423-431.
5. Bouabid C (1988) Untersuchungen über süperovulation, Embryogewinnung und Embryokultivierung sowie Tiefgefrierkonservierung von Embryonen beim schaf. *Vet.Med. Diss., München*.
6. Coonrod SA, Coren BR, McBride BL, Bowen MJ, Kraemer DC (1986) Successful non-surgical collection of ovine embryos. *Theriogenology*, 25 (1) 149.
7. Cysouw CY, Hanstede H, Hoogenkamp H, Schaub MF (1981) Embryo-tranplantatie bij het schaap onder praktijkomstandigheden. *Tijdschr. Diergeneesk. deel.*, 106 (10) 515-518.
8. Çoyan K, Aksoy M, Tekeli T, Ayar A, Ataman M (1992) Laparoskopik yöntemi ile koyunların donmuş sperma kullanılarak intrauterin tohumlanması. *Hay. Arař. Derg.*, 2 (1)15-17.
9. Grupp T (1991) Untersuchungen zur Zervixdilatation und transzervikalen Embryonengewinnung, *Vet.Med.Diss., Münih*.
10. Kılıçoğlu Ç, Alaçam E, İzgür H, Tekeli T (1984) Koyunlarda Embrio Nakli Üzerinde Çalışmalar, TÜBİTAK, VHAG-584, Ankara.
11. Kleeman DO, Cutten IN (1979) Evaluation of laparoscopy in early pregnancy as a means of estimating the number of lambs born in different breed types of ewe. *Agricultural Record*, 6, 8-10.
12. Legendre X, Bousseau S, Koyundjiew S (1988) Embryo collection from ewes by laparoscopy using a 3-way rigid catheter. *Theriogenology*, 29 (1) 269.
13. McKelvey WAC, Robinson JJ (1986) Repeated recoveries of ovine ova by laparoscopy. *Theriogenology*, 25 (1) 171.
14. McKelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP (1985) The evaluation of a laparoskopik insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24 (5) 519-535.
15. McKelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS (1986) Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology*, 25 (6) 855-865.
16. Meinecke-Tillmann S, Meinecke B (1986) Einsatz Laparoskopischer Techniken im Rahmen des Embryotransfers bei schaf und Ziege. *Zuchthygiene*, 21, 169.
17. Moebious A, Braun J, Leidl W (1986) Superovulation und Embryogewinnung beim Schaf: Einfluss von Rasse und PMSG-Dosis. *Zuchthygiene*, 21, 169.
18. Mutiga ER, Baker AA (1984) Transfer of sheep embryos through a laparoscope. *Veterinary Record*, 114, 401-402.
19. Mutiga ER, Baker AA, Jillella D (1983) Limitations of intrauterine balloon catheters for ova collection in sheep. *Theriogenology*, 20 (2) 213-220.
20. Mylne MJA, McKelvey WAC, Fernie K, Matthews K (1992) Use of a transervical technique for embryo recovery in sheep. *The Veterinary Record*, 130, 450-451.
21. Nagashima H, Matsui K, Sawasaki T, Kano Y (1987) Nonsurgical collection of embryos in shiba goats. *Exp.Anim.*, 36 (1) 51-56.
22. Schiewe MC, Bush M, Stuart LS, Wildt DE (1984) Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: A preliminary study. *Theriogenology*, 22 (6) 675-682.
23. Schiewe MC, Howard JG, Stuart LS, Goodrowe KL, Wildt DE (1985) Human menopausal (hMG) for superovulation of sheep. *Theriogenology*, 23 (1) 227.
24. Scudamore CL, Robinson JJ, Aitken RP (1991) The effect of timing of laparoscopic insemination in superovulated ewes, with or without sedation, on the recovery of embryos, their stage of development and subsequent viability. *Theriogenology*, 35 (5) 907-914.
25. Torres S, Cognie Y, Colas G (1987) Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-p. *Theriogenology*, 27 (2) 407-419.
26. Walker SK, Wames GM, Quinn P, Seamark RF, Smith DE (1985) Laparoscopic technique for the transfer of sheep embryos. *Aust.Vet.J.*, 62, 105-106.