

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIRLARDA EMBRİYO TRANSFERİNDE CIDR İLE
SENKRONİZE EDİLEN DONÖRLERE ÖSTRUS ÖNCESİ
GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇİFT PGF₂ α
UYGULAMALARININ ELDE EDİLEN EMBRİYOLARIN
KALİTESİ VE SAYISI ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan
Uğur KARA**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Tayfur BEKYÜREK**

**Veteriner Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Eylül 2010
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİĞİRLARDA EMBRİYO TRANSFERİNDE CIDR® İLE
SENKRONİZE EDİLEN DONÖRLERE ÖSTRUS ÖNCESİ
GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇİFT PGF₂ α
UYGULAMALARININ ELDE EDİLEN EMBRİYOLARIN
KALİTESİ VE SAYISI ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan
Uğur KARA**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Tayfur BEKYÜREK**

**Veteriner Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSY-09-909 numaralı
proje ile desteklenmiştir.**

**Eylül 2010
KAYSERİ**

Prof. Dr. Tayfur BEKYÜREK Danışmanlığında Uğur KARA tarafından hazırlanan “Sığırlarda Embriyo Transferinde CIDR® ile Senkronize Edilen Donörlere Östrus Öncesi Gerçekleştirilen Çift PGF₂ α Uygulamalarının Elde Edilen Embriyoların Kalitesi ve Sayısı Üzerine Etkileri” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

16/08/2010

JÜRİ

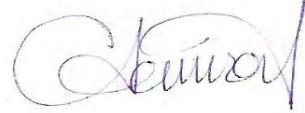
Başkan : Prof. Dr. Tayfur BEKYÜREK (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Kutlay GÜRBULAK

Üye : Doç. Dr. Ömer Orkun DEMİRAL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Esra CANOOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Öznur ASLAN

İmza**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../....

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR**Enstitü Müdürü**

TEŞEKKÜR

Bu tez konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde akademik bilgi ve deneyimleri ile bana yön veren, çalışma süresince bilimsel katkılarını ve önerileri ile her zaman yanımda olan yeni danışman hocam sayın Prof. Dr. Tayfur BEKYÜREK'e, yüksek lisans eğitimim süresince bana her zaman danışman olan bilgi ve önerilerini ayrıca yakın ilgisi ve manevi desteğini hep yanımda hissettiğim eski danışman hocam Dr. Mustafa ÜN'e, bilimsel katkıları ve değerli önerileri ile yanımda olan hocalarım Doç. Dr. Kutlay GÜRBULAK, Doç. Dr. Ö. Orkun DEMİRAL, Yrd. Doç. Dr. Esra CANOOĞLU ve Öğretim Görevlisi Dr. Murat ABAY'a yürekten teşekkür ediyorum.

Çalışmanın yürütülmesi sırasında gerek materyal temini, gerekse de manevi desteklerini esirgemeyen Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü idarecilerine, bana güç ve manevi destekleri yanı sıra araştırma uygulamalarında her zaman yanımda olan Hayvancılık Bölüm Başkanı Dr. Hatice HIZLI'ya, değerli çalışma arkadaşlarım Veteriner Hekimler Aysun ÇAMLIDAĞ, Kurtuluş GÖK, Mansur Seymen SEĞMENOĞLU, Serdal ÇOBAN, Hasan MUTLU ve Ziraat Mühendisleri Emel KARAKOZAK ve Dr. Tugay AYAŞAN'a yürekten teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim sırasında zaman zaman sorumluluklarımı paylaşarak hoşgörü ve sabırla bana yardımcı olan Tufanbeyli İlçe Tarım Müdürü Saffet GİRAY'a, benimle her zaman gurur duyan ve manevi desteğini yüreğimde hissettiğim sevgili babam Selahattin KARA ve sevgili annem Ayşe KARA'ya ayrıca sevgi ve özveri ile bana yardımcı olan eşim Pınar ARIDICI KARA'ya yürekten teşekkür ediyorum.

**SIĞIRLARDA EMBRİYO TRANSFERİNDE CIDR İLE SENKRONİZE EDİLEN
DONÖRLERE ÖSTRUS ÖNCESİ GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇİFT PGF₂α
UYGULAMALARININ ELDE EDİLEN EMBRİYOLARIN KALİTESİ VE SAYISI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

ÖZET

Bu çalışmada, siğirlarda embriyo transferinde östrus öncesi uygulanan çift PGF₂α uygulamalarının elde edilen embriyoların kalitesi ve sayısı üzerine etkileri araştırıldı.

Araştırmada, 5-7 yaşlı Holştayn ırkı, herhangi bir sağlık ve reproduktif problemi bulunmayan, siklusları düzenli 20 baş Holştayn inek iki gruba ayrıldı (n=10). Donörlere süperovulasyon amacıyla östrus siklusunun herhangi bir gününde CIDR uygulandı. Controlled İnternal Drug Release (CIDR) uygulandıktan sonra yedinci gününden başlayarak dört gün süreyle 12 saat aralıklarla azalan dozlarda (80:80 mg, 60:60mg, 40:30 mg, 30:20 mg) toplam 400 mg FSH kas içi uygulandı. Daha sonra corpus luteumu lize etmek amacıyla Grup I'de 5. FSH enjeksiyonuyla birlikte tek doz 500 µg Cloprostenol ve Grup II'de 5. ve 6. FSH enjeksiyonuyla birlikte çift doz toplam 1000 µg kas içi enjekte edildi. Her iki grupta da 6. FSH enjeksiyonuyla birlikte CIDR uzaklaştırıldı. Cloprostenol enjeksiyonundan 24 saat sonra günde üç kez donörlerin östrusları takip edildi ve östrus başlangıcından itibaren 12 saat ara ile 0,25 ml'lik payetlerdeki sperma ile üç kez tohumlandı. Embriyolar tohumlamayı takiben yedinci günün sonunda uterus yıkaması ile toplandı.

Araştırma sonunda, toplam follikül, toplam corpus luteum, toplam embriyo, transfer edilebilir embriyo, 1, 2 ve 3. kalite embriyo ve dejenere embriyo ortalama sayıları değerlendirildiğinde, Grup 1'de sırasıyla 3.00±0.94, 11.90±2.51, 4.40±1.17, 2.70±0.82, 1.90±0.67, 0.90±0.40, 0.60±0.26, ve 1.00±0.39; Grup 2'de sırasıyla 4.60±1.55, 9.30±1.36, 4.70±1.61, 3.60±1.38, 2.80±1.19, 0.80±0.24, 0.90±0.31 ve 0.20±0.13 olarak tespit edildi (P >0,05).

Sonuç olarak, İstatistiki olarak her iki protokol arasında önemli bir fark bulunamamıştır..Ancak donörlere östrustan önce çift prostaglandin uygulamasının embriyo sayısı ve kalitesi üzerine sayısal olarak olumlu etkisinin olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnek, CIDR, Prostaglandin F₂α, Embriyo transferi

THE EFFECT OF DOUBLE PGF₂ α ADMINISTRATIONSTIONS APPLIED TO DONOR BEFORE OESTRUS WITH SYNCHRONIZED CIDR ON THE NUMBER AND QUALITY OF OBTAINED EMBRYOS DURING EMBRYO TRANSFER IN CATTLE

ABSTRACT

In this study, the effect of embryo transfer applications from pre-applied double-PGF₂ α before the oestrus period on the number and quality of the embryos in cattle were investigated.

In the study, 20 Holstein cows who aged 5 to 7 and do not have any health and reproductive problems and had regular cycles were divided into two groups (n = 10). CIDR was performed donors in order to superovulation in anyone day of estrous cycle. Decreasing FSH doses were intramuscularly administered after CIDR application by starting from 7th day with 12-hour intervals for four days (mg / 80:80 mg, 60:60 mg, 40:30 mg, 30:20 mg) which was totally 400 mg. And later, in order to lyses corpus luteum with 5th FSH injections with a single dose 500 μ g Cloprostenol and with 5th and 6th FSH injections with a double dose (500 μ g+500 μ g) Cloprostenol intramuscularly injected to Group I and Group II, respectively. In both Groups, CIDR was removed at the same time with 6th FSH injections. Donors' oestrus were followed after 24 hours of cloprostenol injection three times a day and from the beginning of estrus with a 12-hours intervals three times inseminated with semen which were in 0.25 ml paillette. Embryos were collected following at the end of the 7th day insemination by uterus washing (flush).

At the end of the research, the average number of the total follicle, total corpus luteum, total embryos, transferable embryos, 1st, 2nd and 3rd grade embryos and degenerated embryos were evaluated and numbers were found as 3.00 \pm 0.94, 11.90 \pm 2.51, 4.40 \pm 1.17, 2.70 \pm 0.82, 1.90 \pm 0.67, 0.90 \pm 0.40, 0.60 \pm 0.26 and 1.00 \pm 0.39 in Group I; 4.60 \pm 1.55, 9.30 \pm 1.36, 4.70 \pm 1.61, 3.60 \pm 1.38, 2.80 \pm 1.19, 0.80 \pm 0.24, 0.90 \pm 0.31 and 0.20 \pm 0.13 in Group II, respectively (P>0,05).

In conclusion, any statistically significant differences between the two protocols were not found, but double-prostaglandin applications the donors' before the oestrus, positive impact on the quality and number of embryos were found.

Keywords: Cattle, CIDR, Prostaglandin F₂ α , Embryo transfer

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. EMBRİYO TRANSFERİ	4
2.1.1. Embriyo Transferinin Yararları	6
2.2. SÜPEROVULASYON	8
2.2.1. Süperovulasyonda Kullanılan Hormonlar	10
2.2.1.1. FSH (Folikül Stimulan Hormon)	12
2.2.1.2. Gebe Kısırak Serum Gonadotropini (PMSG, eCG).....	13
2.2.1.3. İnsan Menepozal Gonadotropini (hMG).....	14
2.2.1.4. Human Korionik Gonadotropini (HCG).....	15
2.2.2. Süperovulator Hormonlarla Birlikte Kullanılan Diğer Hormonlar	15
2.2.2.1. Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)	15
2.2.2.2. Prostaglandin F ₂ α	16
2.2.2.3. Luteotropik Hormon (LH)	17
2.2.2.4. Anti- Gebe Kısırak Serum Gonadotropini (PMSG)	17
2.2.2.5. Progesteron	18
2.2.2.6. Östrojen	19
2.3. SUPEROVULASYON TEKNİKLERİ	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. İSTATİSTİK ANALİZ	29
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
6. KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Süperovulasyonda kullanılan hormonlar	11
Tablo 2.2. Süperovulasyonda kullanılan bazı hormonların kimyasal yapıları	11
Tablo 2.3. FSH'nın değişik dönemler halinde uygulanmaları	13
Tablo 2.4. PMSG ve anti-PMSG kullanılan ineklerden alınan sonuçlar	18
Şekil 2.1. Donörlerde PMSG ile süperovulasyon programı	24
Şekil 2.2. FSH ile yapılan süperovulasyon programı.....	24
Şekil 2.3. FSH, LH, progesteron ve östradiol benzoat ile yapılan süperovulasyon protokolü	25
Şekil 2.4. Östrus gözlenmeden yapılan süperovulasyon uygulaması.....	25
Şekil 3.1. Grup I'de uygulanan süperovulasyon protokolü	27
Şekil 3.2. Grup II'de uygulanan süperovulasyon protokolü.....	28
Şekil 3.3. Kalite sınıflarına göre sığır embriyoları.....	29
Tablo 4.1. Her iki grupta elde edilen embriyoların kalitelere göre sayıları	30
Tablo 4.2. Gruplarda yapılan muayenelerde ovaryum bulguları ve elde edilen toplam embriyo sayıları	30
Tablo 4.3. Birinci protokolün toplam follikül, toplam CL, toplam embriyo sayısı ve kaliteleri, transfer edilebilir embriyo sayısı ve kaliteleri ve dejenere embriyolar üzerine tanımlayıcı istatistikleri	31
Tablo 4.4. İkinci protokolün toplam follikül, toplam CL, toplam embriyo sayısı ve kaliteleri, transfer edilebilir embriyo sayısı ve kaliteleri ve dejenere embriyolar üzerine tanımlayıcı istatistikleri	32

KISALTMALAR

CIDR	: Controlled Internal Drug Release
CL	: Corpus Luteum
E	: Östradiol
ET	: Embriyo Transferi
FSH	: Follikül Stumulan Hormon
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormonu
HCG	: Human Chorionik Gonadotropin
hMG	: Human Menapozal Gonadotropin
IU	: İnternasyonel Ünite
LH	: Luteotropik Hormon
PMSG=eCG	: Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PG	: Prostaglandin
P ₄	: Progesteron
UFO	: Unfertilize Ovum

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Embriyo transferi üstün verimli dişi ve erkek materyalin kullanımını temel almaktadır. Günümüzde yüksek verimli hayvan ırklarına sahip gelişmiş ve gelişmekte olan birçok ülkede kullanılmasına rağmen ülkemizde halen saha şartlarında uygulama alanı bulamamıştır. Uygulamanın maliyeti, ülkemizdeki mevcut hayvancılık işletmelerinin aile işletmesi düzeyinde küçük ve orta ölçekli işletmeler olması ve yeterli sayıda büyük sütçü işletmelerin bulunmaması embriyo transferi uygulamasının kullanımını sınırlandırmaktadır.

Embriyo transferinin temel amacı birim zamanda yüksek genetik kapasiteye sahip donörlerden elde edilecek üstün verimli yavruların sayısını artırmaktır. Bu yöntem ile genetik kapasitenin artırılması yetiştiricilerin elindeki sürülerin ekonomik değerlerini, hayvancılık endüstrisinde hayvansal kaliteyi ve kazancı da artırmaktadır.

Genetik ilerlemede en hızlı yol sürüye damızlık değeri yüksek hayvanların doğrudan katılmasıdır. Ülkemizde mevcut populasyonun genetik olarak üstün hale getirilmesi ya da üstün verimli ırkların yetiştirilmesi talebi hayvan ithalatını gündeme getirmiştir. Nakil sırasında oluşacak problemler, yeni çevre koşullarına adaptasyon sırasında yaşanacak olumsuzluklar, iklim ve çevre şartlarındaki değişikliklerden dolayı artan

ölümler, iklim ve çevre şartlarına adaptasyondaki problemlerden dolayı ithal edilen hayvanlardan istenilen verim alınmaması hayvan ithalatının olumsuz yönleri olarak dikkate alınmalıdır. Embriyo transferinde ise hastalık transmisyonu daha düşük olmakta, ayrıca taşıyıcı anneden sağlanan pasif immünite ile yavruda bölgeye uygun bağışıklık oluşmaktadır. Ayrıca sıcaklık stresinin fertilité üzerine olumsuz etkisi bilinmektedir. Sıcaklık stresine maruz kalan hayvanlarda embriyo transferinin fertilité başarısı suni tohumlamadan daha yüksektir. Sperma ithalatı ya da üstün verimli boğaların spermasının suni tohumlama yoluyla kullanılması ile üstün genler yavruya ancak % 50 oranında aktarılabilir.

Hayvan ithalatının olumsuz yönleri ve yukarıda belirtilen husular dikkate alındığında; Embriyo transferi ya da dondurulmuş embriyo üretimi için belirli merkezler oluşturulmalıdır. Pedigri kayıtları bilinen üstün verimli donörlerin dondurulmuş embriyolarının ithal edilmesi ve bunların alıcılara transferi ile elde edilecek mevcut iklim ve çevre şartlarına adaptasyon problemi olmayan dışilerin ülke şartlarında donör olarak kullanılması hem üstün verimli genlerin yaygınlaştırılması hem de elde edilen embriyoların maliyetinin azaltılması nedeniyle embriyo transferinin yaygınlaştırılmasının da daha etkili olacağı görünmektedir.

Ülkemizde süt verim ortalaması geniş aralıklarda dağılım göstermektedir. Bu durumda çok sayıda düşük verimli dışilerin taşıyıcı olarak kullanılması ve üstün verimli dışilerin üstün verimli boğaların spermalarıyla tohumlanmasıyla elde edilen embriyoların alıcılara transfer edilmesi bahsedilen amaca ulaşmada önemli bir husustur.

Embriyo transferi uygulaması için devam etmekte olan en büyük problem donörler arasındaki süperovulasyona cevaptaki bireysel farklılıklardır. Donörlerin süperovulasyon uygulamalarına cevabının yüksek olması söz konusu amaca ulaşmada çok önemlidir.

Süperovulasyon uygulamalarının temel amacı, aynı zamanda maksimum sayıda fertilizasyon ve transfer edilebilir embriyo elde etmektir. Bu amaç doğrultusunda embriyo transferi uygulamasının önemli aşamalarından birisi de süperovulasyondur. Süperovulasyona cevabın önceden tam olarak belirlenememesi bu yöntemin kullanımının yaygınlaştırılmasını sınırlandıran en önemli faktördür. Uygulamanın yaygın bir kullanım alanının olması nedeniyle süperovulasyona yanıtı etkileyen faktörler ve ekzojen gonadotropinlere cevap verme yeteneği, oosit kalitesi, LH

dalgasının oluşumu, ovulasyon oranları, embriyonik gelişim, kullanılabilir embriyo sayısı gibi doğal ve bireysel olarak hayvanlar arasında önemli derecede farklılıklar bulunan birçok parametre üzerinde araştırmalar yapılması gereklidir.

Bazı araştırmacılar süperovulasyon sırasında birinci PGF₂ α uygulamasından 12-24 saat sonra uygulanan ikinci PGF₂ α uygulamasının embriyo sayısını artırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada amaç, ülke şartlarında embriyo transferi uygulamasının ve saha şartlarında kullanılabilecek dondurulmuş embriyo üretiminin yaygınlaştırılması, süperovulasyon uygulamalarında maksimum sayıda fertilizasyon ve transfer edilebilir embriyo elde edilmesi için süperovulasyona etki eden faktörler ve önem düzeylerinin belirlenmesi, süperovulasyon yöntemleri araştırılarak embriyo sayısı ve kalitesi yönünden en uygun tekniğin geliştirilmesi doğrultusunda donörlere östrus öncesi gerçekleştirilen çift PGF₂ α uygulamalarının elde edilen embriyoların kalitesi ve sayısı üzerine etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EMBRİYO TRANSFERİ

Döl veriminin arttırılmasına ve hayvan ıslahının geliştirilmesine yönelik çalışmaların başında suni tohumlama ve embriyo transferi (ET) gelmektedir (1).

Hayvancılık alanında modern teknolojiler yardımıyla verimi arttırmak, kısa sürede istenen zamanda ve sayıda yüksek genetik kapasiteye sahip yavrular elde edebilmek için, suni tohumlama, seksüel siklus senkronizasyonu, ikizlik oranının artırılması, ET ve embriyoların dondurulması, mikro manüplasyonu, invitro fertilizasyon, embriyo ya da spermada cinsiyet tayini gibi bir takım yöntemlerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaya başlamıştır. Birim hayvan başına verimi arttırmak ya da mevcut hayvanların verimlerinin sürekliliğini sağlamak amacıyla kullanılan bu biyolojik yöntemlerin temel hedefi üstün erkek ya da dişi genotiplerin yaygınlaştırılmasıdır (2).

Embriyo transferi; verici dişi hayvanlarda ekzojen hormon uygulanarak oluşturulan süperovulasyon sonrasında doğal aşım ya da suni tohumlama yoluyla fertilizasyonları sağlanan ovumların implantasyonları şekillenmeden uterusun toplanarak doğuma kadar yaşamlarını sürdürecekleri önceden senkronize edilerek hazırlanmış aynı türden alıcı dişilerin uterusuna nakledilmesi olarak tanımlanır (2).

Bir başka deyişle donör dişilerin süperovulasyonunun başlatılması, embriyoların geri kazanımı ve onların alıcı dişilerin uterusuna transferini içeren bir üreme biyoteknolojisidir (3).

Dünyada ilk (ET) çalışması 1890 yılında Walter Heape tarafından, Cambridge de angora tavşanı ile yapılan çalışmadır (4, 5).

Uzun yıllar önce uygulandığına dair kayıtlar ve çalışmalar bilinmesine rağmen çiftliklerde bu yeni hayvan yetiştirme tekniğinin ciddi olarak kullanılması için uzun bir süreç gerekiyordu (4).

Bu yöntem sığırlarda ticari olarak uygulanmaya başladığı zamanlardan beri genetik ilerlemede gittikçe artan önemli bir rol oynadı. II. Dünya Savaşından sonra sütçü sığırlarda genetik ilerlemede ucuz ve etkili bir yol olduğu için suni tohumlamanın kullanımının yaygınlığı giderek artmasına rağmen, bilim adamları damızlık sığır yetiştiriciliğinde ET kullanımını olasılığını ciddi şekilde düşünmeye başladı (4).

Suni tohumlama tamamen genetik olarak üstün erkek materyalin kullanımını temel alan bir yöntem iken, ET'de hem çok üstün verimli dişi hem de erkek materyalin kullanılmasını temel alan bir yöntemdir (4).

Pincus ve Chang'ın A.B.D.'de, Dowling'in Cambridge'de uygun alıcı kullanarak yapmış oldukları çalışmalarda embriyo gelişmesi, çiftlik hayvanlarında özellikle sığırlarda ET uygulaması konusundaki umutları artırmıştır (4).

Embriyo transferinin uygulamaya başlandığı ilk yıllarda embriyoların toplanması donöre genel anestezi altında median hattın uygulanmasıyla bir cerrahi yöntemle yapılmaktaydı. Sütçü ineklerin memeleri median hattın reproduktif kanala erişimi engellemesi, cerrahi işlem sonrası adhezyonların oluşumu ve bunların bazı zamanlar fertilité bozukluğu ya da kaybına neden olmasından dolayı bu dönemde ET yaygın olarak kullanılmamıştır (6).

Embriyo transferi sığırlarda Willet ve ark. (1951) tarafından ilk defa başarılı transferinden sonra hızlı bir gelişme göstermiş ve ticari olarak da sahaya aktarılmıştır. Dünyada ilk kez ineklerde cerrahi olmayan yöntemle embriyo transferi Sugie tarafından (1965) uygulanmıştır. Amerika ve Kanada'da ET 1970'ten sonra ticari anlamda düşünölmeye ve 20 farklı merkezde ET çalışmaları yapılmaya başlanmıştır (1).

Ancak 1976 yılında birkaç araştırmacı grup foley kateterinin kullanıldığı nontravmatik, nonşirürjikal etkili bir tekniği bildirdi. Nonşirürjikal flushing tekniğinin tanıtılmasını takiben süt sığırı yetiştiriciliğinde ET uygulaması hızlı bir şekilde yaygınlaşmaya başlamıştır (7).

Kuzey Amerika'da ET yoluyla elde edilen buzağı sayısı 1979 yılında 17000 iken, 1999 yılında 197.886 olmuştur (8, 9). Hollanda'nın ET ile tanışma yılı olan 1981'de 500 adet ET yapıldığı, 1996 yılında bu rakamın 30000 ET olarak gerçekleştiği bildirilmektedir (10).

Türkiye'de ET çalışmalarına ilk olarak; 1981 yılında tavşanlar (11) ve 1983 yılında fareler üzerinde araştırma boyutlu olarak başlanmıştır (12). Koyunlarda ET 1984 yılında (13) ve 1986 yılında da ineklerde cerrahi olmayan yöntemle ET çalışmalarıyla devam etmiştir (14). Fakat ET uygulamasının sahaya aktarılması konusunda günümüze değin bir ilerleme kaydedilememiştir (15).

2.1.1. Embriyo Transferinin Yararları

- a) Normal koşullarda bir inekten hayatı boyunca 5-6 yavru alınırken, embriyo transferi ile yılda 20 yavru alınmasının mümkün olması (1),
- b) Sığırlarda generasyon aralığının diğer türlere göre daha uzun ve döl veriminin düşük olması gibi nedenlerle ET teknolojisi ile yüksek genetik kapasiteli donörlerden elde edilen yavruların sayısının artırılması (16),
- c) Bazı infertil hayvanlardan yavru elde edilmesi (2),
- d) İkizlik oranının artırılması ya da sütçü hayvanlardan etçi yavru alınabilmesi (2),
- e) Embriyoların dondurularak uzun yıllar saklanabilmesi ya da kolaylıkla taşınabilmesi (2),
- f) Araştırma amacıyla identikal yavru elde edilmesi (2),
- g) Doğumdan sonra taşıyıcı analardan lokal immünitinin kazanılması şansı (2),
- h) Arzu edilen genlerin, genetik ilerlemenin, değerli damızlıkların yaygınlaştırılması (17, 18),
- ı) Ayrıca nesli tükenmekte olan türlerin ve ırkların genetik korunması için önemli bir araçtır (19),

Sığırlarda ET çalışmalarında uygulanan temel prosedürler (süperovulasyon, embriyo toplama, stoklama/dondurma ve transferi) belirlenmiş olmasına rağmen bu teknolojinin kullanımının yaygınlaştırılması için daha birçok bilimsel araştırmaya ihtiyaç vardır. Hasler tarafından 1992 yılında yapıldığı bildirilen bir gözleme göre standart süperovulasyon uygulamasına yanıtta belirgin bir değişiklik ve geçen 10-15 sene içerisinde süperovulasyon tekniğinde küçük bir ilerleme kaydedilmiştir (4).

Embriyo transferi Türkiye’de hayvancılık alanında kullanılan biyoteknolojik yöntemler arasında uygulama açısından en geride kalmış uygulamalardan biri olarak önümüze çıkmaktadır (20).

Dünyada suni tohumlama uygulamasına başlayan ikinci ülke olmamıza rağmen; kat ettiğimiz mesafe ve uygulamanın başarısı bu alanda da memnun edici düzeye ulaşamamıştır (20).

Ancak, ülke geneline bakıldığında özellikle süt sığırcılığı açısından önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Son zamanlarda kurulan kapasitesi yüksek modern çiftliklerin artması bu durumu desteklemektedir. Suni tohumlama yolu ile sağlayamadığımız genetik ilerlemeyi, özellikle damızlık üretim yapacak işletmelerde ET uygulayarak, kısa zaman içerisinde sağlayabiliriz. Bilindiği üzere suni tohumlama yoluyla boğadan aktarılacak genetik ilerleme %50 düzeyinde kalacaktır. Oysa pedigrî kayıtları çok iyi bilinen bir ineğin dünyadaki en iyi sperma ile tohumlanması sonucunda elde edilecek embriyolar çok daha üstün verimli olacaktır (20).

Yukarıda bahsedilen büyük çaplı işletme sayısının artmasının yanı sıra, bu türden işletmelerin hastalıklardan arı sürüler kurma istekleri de göze çarpmaktadır. Hastalık taraması göz önünde bulundurulduğunda, verim açısından istenilen düzeyde hayvan bulmakta büyük güçlük yaşanmaktadır. Embriyo transferi uygulamalarında ise taşıyıcı ineğin verim özelliklerinin çok iyi olması önem taşımamaktadır. Taşıyıcılar için aranan en önemli nitelik taşıyıcının gebe kalmasını ve gebeliğini sürdürebilmesini önleyecek herhangi bir reproduktif sorununun bulunmamasıdır (20).

Ülkemizde 15 litreden 80 ve üstü litrelerde süt veren ineklere rastlamak mümkün olmaktadır. Bu durumda düşük süt verimine sahip ineklerin taşıyıcı olarak kullanılmaları daha mantıklıdır. Ülkemizde genetik ilerlemeyi kısa zaman içerisinde sağlayabilmek amacıyla, ilk olarak ithal edilen anne ve baba kayıtları iyi olan

embriyoların kullanılması daha akılcı bir yol olarak görülmektedir. Böylece birinci kuşaktan yurt dışı kayıtları bilinen ve anneden kazanılan bağışıklık ile ülkemiz şartlarına adapte olmuş çekirdek bir sürü kurulabilir. Sonraki aşamada ise, elde edilen dişiler kendi ülkemizde donör olarak kullanılabilir ve böylece maliyetler minimize edilebilir (20).

Ülkemiz açısından ET uygulamasının gelişen süt sığırcılık işletmeleri ve bu işletmelerde en iyi verimi alabilmek için genetik ilerlemenin iyileştirilmesi amacıyla yakın gelecekte uygulama şansı bulacağı öngörüsü ağırlık kazanmaktadır. Saha şartlarında bu tür uygulamaları yapabilecek düzeyde eğitilmiş ve deneyimli veteriner hekimlere olan talebin artacağı gerçeği, sahada büyükbaş çalışan ya da çalışmayı planlayan veteriner hekimlerce değerlendirilmesi gereken önemli bir konu olarak akılda tutulmalıdır (20).

Sığırcılık endüstrisinde ET teknolojisi genetik ilerleme için etkili bir yöntem ve bu yöntem ile genetik kapasitenin artırılmasından dolayı yetiştiricilerin elindeki sürülerin ekonomik değerlerinde de bir artış elde edilebilir (21). Yüksek genotipik ve fenotipik kapasiteye sahip dişi hayvanlardan (donör) elde edilen yavru miktarının artırılması hayvancılık endüstrisinde hayvansal kalite ve kazancı artırmaktadır (22).

2.2. SÜPEROVULASYON

Donör olarak kullanılan dişi hayvanlara ekzojen hormon uygulanarak ovaryumlarında çok sayıda follikül gelişiminin sağlanması ve ovulasyon oluşturulması şeklinde tanımlanan süperovulasyon embriyo transferinin önemli aşamalarından biri olup (2), genetik olarak değerli dişilerden yavru elde etmek için etkili bir tekniktir (23).

Süperovulasyon ineklerde ilk kez 1940 yılında Casida ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (2, 22). Yetiştiricilik ve ET endüstrisi için değerli sığır embriyosu üretiminde hala yaygın olarak kullanılmaktadır (24, 25).

Sığırlarda herhangi bir ticari ET programında açık ve temel düşünce tahmin edilebilir yüksek kaliteli embriyoların teminini sağlayan güvenilir yöntemler olmalıdır. Embriyoları elde etmede iki yaklaşım kullanılmaktadır; ilki pos-pubertal düvelerde ve ineklerde bazen buzağılarda süperovulasyonun hormonal uyarımını içermektedir, ikincisinde direk olarak ovaryumdan alınan oositin toplanması, fertilizasyonu ve maturasyonunu içermektedir. İlk metod günümüze kadar ticari sığır ET uygulayıcıları

tarafından neredeyse tek yöntem olarak kullanılmıştır fakat ikinci yaklaşımın kullanımı giderek artmaktadır (4).

İneklerde süperovulasyon uygulamalarının amaçları, aynı zamanda maksimum sayıda fertilizasyon ve transfer edilebilir embriyo ile yüksek gebelik oranı elde etmektir (26).

İneklerde süperovulasyon ve ET'nin verimli olabilmesi, çok sayıda follikül gelişiminin uyarılması, gelişen folliküllerin yüksek ovulasyon ve fertilizasyon oranı ile aynı zamanda reproduktif kanalda embriyonal gelişim için normal fizyolojik çevrenin temin edilmesi, oluşan embriyoların toplanması, transferi, ve alıcılarda gebeliğin sağlanması sonucu birçok buzağı elde edilmesine bağlıdır. Fakat süperovulasyona cevabın önceden tam olarak belirlenememesi bu yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılmasını sınırlandıran en önemli faktördür ve donörlerin süperovulasyon uygulamalarına cevabının yüksek olması söz konusu amaca ulaşmada çok önemlidir (27, 28).

Ayrıca Embriyo transferinin kullanımını süperovulasyondan sonra geri kazanılan embriyo sayısının düşük olması ve kryoprezervasyon için uygun olmayan ileri aşamadaki embriyoların geri alınması güçleştirmektedir (29). Yeni doğan bir dişi buzağının ovaryumlarında binlerce ovum taslağı olmasına rağmen hayatı boyunca bunlardan çok azı gelişme şansı bulmakta ve ovule olmaktadır. Süperovulasyon, ovulasyon şansı bulamayan ovumlara bu fırsatı vererek (30), normal bir östrüs sırasında ancak bir embriyo elde edilebilirken bu sayı ortalama 10'a çıkarılabilmekte (31) ve bunun yaklaşık %50'sini transfer edilebilir embriyolar oluşturmaktadır (32). Dolayısıyla ET uygulamalarında en kritik noktalardan birisi de süperovulasyondur (28).

Süperovulasyon cevabındaki farklılıklar; yaş, ırk, mevsim, gonadotropik hormonun çeşidi, dozu, uygulama sayısı, beslenme, sürü yönetimi, hastalıkların kontrolü, östrus siklusunun ve laktasyonun dönemi, çevresel faktörler, iklim ve mevsim, ovaryumların mevcut durumu (2, 25, 30, 33, 34), özellikle de uygulamanın başlangıç zamanında ovaryumdaki folliküler dalganın aşaması gibi birçok faktörden etkilenmektedir (35, 36).

Fertilitenin düşük olduğu mevsimlerde yapılan çalışmaların süperovulasyon cevabını olumsuz etkilediği (16), sıcaklık stresi nedeniyle kuru madde alımının azalması sonucu oluşan negatif enerji dengesi nedeniyle insülin, insülin benzeri büyütme faktörü (IGF-I) ve plazma glukoz konsantrasyonlarının azalması sonucu oosit kalitesi azalmaktadır. Ayrıca yaz aylarında follikül gelişimi üzerine baskılayıcı etkisi olan prolaktin konsantrasyonu artmaktadır (37). Elde edilecek embriyo sayısı ve kalitesi üzerine etkili

faktörlerden biriside beslenme (38). Beslenme yetersizliğinde ve konsantre yem tüketiminin artmasında süperovulasyona verilen cevap düşmektedir. Uzun süren fazla miktarda konsantre yem alımlarında embriyo sayısı ve kalitesi düşmektedir (39).

Son 50 yıldır birçok araştırmada amaç sığırlarda süperovulasyonun uyarılmasıdır. Süperovulasyon üzerine son zamanlarda yapılan araştırmaların çoğu ise süperovulator yanıtta Follikül stimulan hormon (FSH) uygulamasının basitleştirilmesi ve dominant follikülün regresyonunun etkisi ile ilgilidir. Bu teknik sığırlarda kabul edilebilir ET teknolojisinin gelişmesinde her zaman önemli bir faktör olmuştur (4).

2.2.1. Süperovulasyonda Kullanılan Hormonlar

Süperovulasyon amacıyla yapılan hormon uygulamalarına ovaryumun cevabının tam ve güvenilir olmaması nedeniyle süperovulasyon bugün dahi ET teknolojisinin büyük sorunlarından birini oluşturmaktadır (1, 25, 29, 30). Ayrıca türlerin süperovulasyon uygulamalarına cevapları da oldukça farklıdır. Örneğin atların bahsi geçen hormon uygulamasına cevabı oldukça düşükken, inekler iyi sayılacak bir oranda cevap geliştirirler (22).

Genellikle ineklerin süperovulasyonun da iki hormon kullanılır. Bunlar FSH veya Gebe Kısrak Serum Gonadotropini (PMSG)`dir. Daha az olarak da Human Menepozal Gonadotropin (hMG) kullanılmaktadır (22, 40, 41).

Gebe kısrak serum gonadotropininin kullanım avantajları, FSH`dan daha ucuz ve kolay temin edilebilir olması, uzun yarılanma ömrü nedeniyle tek uygulamanın yeterli olmasıdır (22, 42-44) Dezavantajları ise, yarılanma ömrünün uzun olmasından dolayı FSH etkisinin süperovulasyondan sonrada devamı ve follikülleri sitümüle ederek kanda östrojen seviyesinin yüksek kalması sonucu uterus ortamının olumsuz etkilenmesi, anovulator folliküller, endokrin profilin bozulması, embriyo sayısı ve kalitesinde azalma (22, 43-47), elde edilen embriyo sayısında ve kalitesinde geniş bir varyasyon olması ve uygulamadan sonra kalıntıları nedeniyle tekrar eden uygulamalarda problem (antikor) oluşturabilmesidir (22, 43).

Follikül stimulan hormon ise, yarılanma ömrünün kısa olması (44, 48, 49), süperovulasyondan sonra etkisinin devam etmemesi (50), herhangi bir antikor oluşumu şekillenmediğinden tekrarlanan süperovulasyon uygulamalarının yapılabilmesi (2) gibi avantajları, yarılanma ömrünün kısa olması nedeniyle günde iki kez ve dört-beş gün

süre ile tekrarlanan dozlarda uygulanması, bu uygulamalar sırasında ineklerde stres oluşumu ve uygulamanın zaman alması gibi dezavantajları bulunmaktadır (22, 49, 50).

Hayvanların süperovulasyona verecekleri cevap, yaş, ırk, mevsim, gonadotropik hormonun çeşidi, dozu, uygulama sayısı, beslenme, sürü yönetimi, hastalıkların kontrolü, östrus siklusunun ve laktasyonun dönemi, çevresel faktörler, iklim ve mevsim, ovaryumların mevcut durumu (2, 25, 30, 33, 34), özellikle de uygulamanın başlangıç zamanında ovaryumdaki follüküler dalganın aşaması gibi birçok faktörden etkilenmektedir (35, 36).

Genel olarak sütçü ineklerin süperovulasyon uygulamalarına cevabı etçi ırklardan daha düşüktür. Holştayn'lara göre diğer sığır ırkları süperovulasyona daha iyi cevap vermektedirler. On yaşından sonra, ineklerde süperovulasyona verilen cevap da düşmektedir (25, 30). Bu nedenle daha çok reproduktif problemi olmayan düveler tercih edilmelidir (22).

Tablo 2.1. Süperovulasyonda kullanılan hormonlar (30)

Hormon adı	Kısa yazılışı	Elde edildiği yer	Fonksiyonu
Follükül uyarıcı hormon	FSH	Hipofiz bezi	Follüküler büyüme uyarımı
Gebe kısrak serum gonadotropini	PMSG=eCG	Gebe kısrak kan serumu	Birinci derecede FSH ikinci derecede LH
İnsan korionik gonadotropini	HCG	Gebe kadın idrarı	Birinci derecede LH ikinci derecede FSH
İnsan menapozal gonadotropini	hMG	Menapoz sonrası kadın idrarı	Birinci derecede FSH ikinci derecede LH

Tablo 2.2. Süperovulasyonda kullanılan bazı hormonların kimyasal yapıları (30)

Hormon	Biyokimyasal yapı	Molekül ağırlığı (Dalton)
FSH	Glikoprotein	29.000-35.000
LH	Glikoprotein	29.000
PMSG(eCG)	Glikoprotein	53.000-68.000
hCG	Glikoprotein	36.700-40.000

2.2.1.1. Follikül Stimulan Hormon (FSH)

Bu hormona follikül stimüle edici hormon, follikül uyaran hormon da denir ve ön hipofizdeki gonadotrop hücrelerde oluşur (22). Ovaryumlarda follüküler gelişmeyi ve gelişen follüküllerden östrojen hormonunun salgılanmasını idare eder (2).

Büyük molekülü bir glikoprotein olan follikül uyarıcı hormon, % 32 oranında karbonhidrat içerir. Moleküldeki amino-asitlerin her biri birer peptit zincirinden oluşan iki alt birim halinde düzenlenmiştir. Bunlara alfa ve beta alt birimleri denir. Alfa alt birimlerinde 92 aminoasit, beta alt birimlerinde ise 118 aminoasit bulunmaktadır. FSH, gelişen follüküllerin teka interna ve granuloza hücrelerinden başta β -östradiol olmak üzere östrojenlerin salınımını uyarır. Follüküllerin östrojen salabilmesi için FSH ve Luteotropik Hormon (LH) birlikte etkimektedir. Follikül stimulan hormon ve ovulasyona oluşana kadar sinerjik olarak etki gösterir. Östrojen hormonu follüküllerin gelişiminde FSH'ya yardım eder. Östrojen düzeyi kanda yükseldikçe FSH salınımı azalır ve LH etkin duruma geçer. Follikül stimulan hormon genellikle at, domuz ve koyunlardan elde edilen bir hipofiz gonadotropinidir (22).

En önemli avantajı tekrarlanan dozlarda antikor şekillenmemesidir (2). Uygulama dozları ineğin canlı ağırlığına bağlı olmak üzere ham hipofiz ekstraktları 25 mg ile 50 mg (22, 49), saflaştırılmış hipofiz ekstraktları 400 mg'dır (49). FSH yarılanma ömrü çok kısa olduğundan (yaklaşık iki saat) özellikle süperovulasyon çalışmalarında periyodik tekrarlanan dozlar halinde kullanılmalıdır. Genel prensip günde iki kez azalan dozlarda dört ya da beş gün uygulanmasıdır (2, 22, 49, 50). Yapılan çalışmalara göre en uygun sonucu sabah ve akşam yapılan uygulamalar vermiştir. Araştırmacılar aynı zamanda aynı doz FSH uygulaması ile azalan dozları da mukayese etmişler ve azalan dozların daha iyi sonuç verdiğini belirlemişlerdir (22). Erkek hayvanlarda ise testislerde sertoli hücrelerini ve spermatogenezisi uyarır (2).

Tablo 2.3. FSH'ın değişik dönemler halinde uygulanmaları (30)

FSH uygulaması	İnek sayısı	Ortalama korpus luteum sayısı	Ortalama toplam embriyo sayısı	Ortalama nakledilebilir embriyo sayısı
3 kez /Gün	12	9.3±4.1 ^a	5.6±4.8 ^a	4.1±4.4 ^a
2 kez /Gün	12	9.9±4.0 ^a	5.7±4.3 ^a	4.3±3.2 ^a
1 kez /Gün	12	7.6±5.3 ^a	4.4±4.5 ^{a,b}	2.3±3.3 ^{a,b}
2 günde bir kez	10	2.5±3.3 ^b	1.0±2.3 ^c	0.6±1.4 ^b

a-b P<0.01; b-c P<0.05; b-d P<0.10

2.2.1.2. Gebe Kısarak Serum Gonadotropini (PMSG, eCG)

Gebe kısarak serum gonadotropini, PMSG olarak bilinir ancak son zamanlarda terminolojide daha çok eCG olarak anılmaktadır. Gebe kısrakların serumlarından elde edilen plasenta kaynaklı bir gonadotropindir (22, 4).

Gebe kısraklarda endometriyal kaplar oluşturan özel trofoblast hücrelerinden sentezlenen PMSG hormonu önemli oranda FSH benzeri ve az miktarda da LH aktivitesine sahiptir. Bahsedilen endometriyal formasyonlar gebeliğin 36-40. günlerinde hafif dışbükey beyaz renkli yapılar olarak gözlemlenir (2, 4). Gebeliğin 70. gününden sonra dejenere olmaya başlayan endometriyal kaplar 120-160. günler arasında fonksiyonlarını tamamen yitirirler. Maternal kan serumundaki PMSG düzeyi de bu yapıların formasyonuna paralel olarak 36-40. günlerde ölçülebilir düzeye erişir, 60-65. günlerde zirveye ulaşır ve sonra giderek azalarak 120-150. günlerde ölçülemeyecek düzeylere düşer (2). Gebe kısarak serum gonadotropini gebeliğin 40. ve 130. Günleri arasında kısrakların kanında bulunur (4).

Gebe kısarak serum gonadotropin hormonunun fizyolojik işlevi ovaryumlardaki sekonder folliküllerden 40. gün civarında, regrese olmaya başlayan gebelik CL'nun fonksiyonunu yüklenecek, sekonder CL'ların oluşmasına yardımcı olmaktadır. Endometrial kapların formasyonundan sonraki fetal ölümlerde ve corpus luteum regresyonlarında PMSG salgısı yukarıda belirtilen günlere kadar devam eder. İkiz gebeliklerde PMSG salgısı daha yüksektir. Gebe kısarak serum gonadotropininin dozu ayarlanırken istenilen amaca yönelik bir program yapılmalıdır. Küçük dozları ovaryumları uyarırken, orta dozları ikizliği uyarmakta, yüksek dozları ise

süperfollikülasyona sebep olmaktadır. Ayrıca istenilen etkiyi sağlamak üzere materyalin ırkı, cüssesi, siklik durumları, beslenme, mevsim gibi kalıtsal ve çevre ile ilgili faktörleri de göz önünde tutmak gerekir (2).

Gebe kısrak serum gonadotropini ineklerde, 2000 IU ile 4000 IU arasında değişen miktarlarda kullanılır (2). Yarılanma ömrü uzun olduğundan tek doz olarak uygulanması yeterli gelmektedir. Tek doz uygulama ile ineklerde oluşabilecek enjeksiyon stresi de önlenmiş ve iş yoğunluğu azaltılmış olacaktır (22, 50). Ancak yaklaşık beş günlük uzun biyolojik yarılanma ömrü ovaryum indüklenmesinde sürekliliğe neden olduğundan süperovulasyondan sonra bile ovaryumda büyük folliküller kalabilmekte ve bu folliküllerden salınan östrojenin periferal kandaki yüksek konsantrasyonu gelişen embriyoların sayısı ve özellikle kalitesi üzerine olumsuz etki yapabilmektedir (22, 43-47). Erken embriyonik gelişim döneminde kan östradiol seviyesinin toplanan embriyo sayı ve kalitesi üzerine çok fazla olumsuz etkisi bulunmazken geç gelişim aşamasındaki embriyolar üzerine çekirdek anomalileri oluşturması açısından bazı olumsuz etkileri söz konusu olmaktadır (1, 30). Bu olumsuz durum anti-PMSG preparatları kullanılarak giderilebilir (2, 25, 30, 51, 52).

2.2.1.3. İnsan Menepozal Gonadotropini (hMG)

Human menapozal gonadotropin gebe kadın idrarından elde edilen yüksek FSH ve düşük LH aktivitesine sahip protein hormondur. Jinekolojide ovulasyonun indüksiyonu ve sterilite tedavisi için yaygın olarak kullanılır (50). Pubertaya erişen bir dişide, gonadotropik hormonların etkisi ile follikül gelişimi olur ve gelişen bu folliküllerden salınan östrojenin kandaki miktarı artar. Artan östrojen miktarına bağlı olarak ise FSH ve LH salınımı baskılanarak kandaki düzeyleri azalır. Ancak menapoz sonrası gelişecek follikül kalmadığından östrojen salınımı da önemli ölçüde düşer ve FSH ve LH salınımı baskılanmadığından, kandaki dolayısıyla idrarla çıkarılan miktarları dört-10 katı kadar artar. Bu düşünceden yola çıkarak menapoz sonrasındaki bir kadının idrarından elde edilen gonadotropinlerin süperovulasyon amacıyla kullanılabilceği düşünülmüş ve bu hormona da hMG adı verilmiştir. Human menapozal gonadotropin kullanılarak yapılan süperovulasyon çalışmalarında FSH veya PMSG gibi olumlu ve yeterli sonuç alınamamıştır. Bazı araştırmacılar az sayıda hayvan üzerinde yaptıkları çalışmalarda süperovulasyona cevabın PMSG uygulaması gibi çıktığını belirtmişlerdir. Fakat

hMG'nin yüksek dozlarında bile ovule olmayan follikül sayısının önemli oranda fazla olduğunu ifade etmişlerdir (22).

Bunun yanı sıra PMSG ile karşılaştırıldığında embriyo sayısı ve kalitesinin daha uyumlu, süperovulasyon sonuçlarındaki farklılığın daha az olduğu (53), FSH ile yapılan süperovulasyonlar ile benzer sonuçların elde edildiği de bildirilmektedir (54).

2.2.1.4. Human Korionik Gonadotropini (HCG)

Human korionik gonadotropin, gebe kadınların plasentalarının korion villuslarındaki sinsitiotrofoblast hücrelerden salgılanmaktadır. Human korionik gonadotropin alfa ve beta alt birimlerinden oluşmuş, % 31 oranında şeker içeren bir glikoproteindir (22).

Human korionik gonadotropin bütün gebelik süresi içinde kana verilir ve döllenmeyi izleyen üç-dört hafta içerisinde de idrarla çıkarılmaya başlar. Gebeliğin 70. gününde ise en yüksek değere ulaşır daha sonra doğuma kadar gittikçe azalır (22). Daha çok LH etkisi olduğundan luteotrop etkidedir ve FSH benzeri etkisi azdır. Folliküllerin gelişmesine ve ovulasyona katkıda bulunur. Menstruel korpus luteumların gebelik korpus luteumuna dönüşmelerini ve bunların gebelik süresince gereği kadar yerlerinde kalmalarını temin eder (22). Süperovulasyon uygulanan ineklerde ovulasyonlar 24-48 saat hatta daha geniş bir zaman aralığına yayılmakta bu da ovumların fertilizasyonunda sorun oluşturmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak amacıyla östrusun başlangıcında 2500-5000 IU hCG intravenöz enjeksiyonu yapılmalıdır (2).

2.2.2. Süperovulasyonda Hormonlarla Birlikte Kullanılan Diğer Hormonlar

2.2.2.1. Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)

Doğal olarak hipotalamusda arkuatik nukleusta sentezlenen ve aksonlar yoluyla eminentia medialis taşıyarak burada depo edilen dekapeptid yapıda bir neurohormondur. Beyinden gelen uyarılarla hipotalamus ile hipofiz arasındaki portal dolaşıma verilir ve böylece adenohipofize ulaşan GnRH gonadotropik hormonların (FSH ve LH) sentez ve sekresyonunu uyarır. Gonadotropin releasing hormon uygulanan hayvanlarda doza da bağlı olarak serum FSH ve LH düzeyleri yükselir. Gonadotropin releasing hormonun tekrarlanan enjeksiyonlarının immun sistemi uyardığı ya da anafilaksiye sebep olmadığı saptanmıştır. Bu özelliği gonadotropik hormonlara kıyasla tedavide önemli bir avantaj sağlamaktadır. Gonadotropin releasing hormonu adenohipofizdeki hücreler tarafından tamamen kullanılır ve periferik dolaşıma hemen

hiç geçemediğinden düzeyleri assay teknikleri ile belirlenememektedir. Zirveye ulaştıktan altı-yedi saat sonra hipotalamo-hipofizle dolaşımında da düzeyleri tespit edilemez. Bu nedenle rezidülerine süt ve ette rastlanmaz. Veteriner pratikte GnRH analogları olan buserelin asetat gonadorelin diasetat, gonarelin ve fertirelin asetat başarı ile yaygın olarak kullanılmaktadır (2).

2.2.2.2. Prostaglandin F₂α (PGF₂α)

Prostaglandinler doku hormonları olup otocoidler olarak bilinirler. Normal fizyolojik işlevler ve metabolik fonksiyonlar sırasında çeşitli dokulardan salgılanarak lokal mediatör olarak görev yaparlar. Mekanik, kimyasal, fiziksel veya travmatik her türlü uyarıda Prostaglandin (PG) formasyonunu hızlandırır. Prostaglandinler ve türevleri prostonaik asit olup yirmi karbon atomlu bir pentagonal halka, iki yan zincir ve karboksil grubunu içerir. Bu pentagonal halka üzerindeki farklı yapılarla değişik PG türevleri ortaya çıkmaktadır. Yapısal ve fonksiyonel olarak dört ana grup PG vardır: A, B, E ve F. Bunlardan en iyi bilinenler ve muhtemelen dokulardan en çok salgılananlar E ve F serileridir. Prostaglandinler çabuk metabolize olurlar ve klasik hormon işlevlerinin aksine, lokal bir hormon olarak salgılandıkları bir bölgeye veya yakınındaki dokulara etkili olurlar. Reprodüksiyon alanında en önemli grup F serisi (PGF₂α) olup, doğal olarak ineklerde seksüel siklusun 16-17. günlerinde uterustan salgılanarak ovaryumdaki fonksiyonel CL'un morfolojik ve işlevsel regresyonuna sebep olur. Gebe ineklerde ise doğal PG salgısı inhibe olur, CL etkilenmez ve gebelik devam eder. Doğal veya sentetik PGF₂α ineklerde seksüel siklusun 5-17. günleri arasında enjekte edildiğinde CL geriler ve küçülür, kan progesteron (P₄) hormonu düzeyi 12 saat içerisinde belirgin bir şekilde düşer. Enjeksiyonu izleyen 24. saatte progesteronun düşmesinin yanı sıra östradiol (E) oranı 48-72. Saatlere kadar giderek artar ve ortalama 72. saatte (±24 saat) östrus evresi başlar. Prostaglandin F₂α'nın lüteolitik etkisi; LH ve prolaktine karşı antagonizm oluşturması, lizozimlerin fragilitelerini artırması, utero-ovaryen venalarda vazokonstriksiyon oluşturup ovaryuma kan ulaşımını yavaşlatması, progesteron preküsörlerinin ve kolesterol esterlerinin depolanmasını azaltması ve esteraz aktivitesini düşürmesiyle açıklanmaktadır. Yapılan çalışmalar ineklerde PG metabolitlerinin 48 saat içerisinde % 90 oranında idrar ve gaita ile (2/1 oranında) vücuttan atıldığını ortaya koymuştur. Eksojen verildiğinde en uzun süre enjeksiyon bölgesinde kalan rezidüler 48-72 saat sonra elimine edilir. Uygulanan dozun ancak % 0.6'sı süte atılmaktadır. Gebe,

gastrointestinal ve respiratorik sistemlerde akut-subakut bozukluklar bulunan hayvanlarda $PGF_2\alpha$ ve analogları endike değildir (2).

2.2.2.3. Luteotropik Hormon (LH)

Luteinleştirici hormon ya da erkeklerde ICSH (Interstisyel hücre stimüle edici hormon) olarak bilinir ve ön hipofizdeki gonadotrop hücrelerde oluşur ve salınır. Luteotropik hormon da FSH gibi glikoprotein yapısında büyük molekülü bir hormondur. İneklerde normal olarak LH pikinden 24 saat sonra ovulasyon gerçekleşir. Kandaki LH konsantrasyonu bu pikin ardından yine hızlı bir şekilde düşer. Follikül situmulan hormon gibi salınımında GnRH rol oynamaktadır. Kabaca dişilerde folliküllerin gelişimi ve olgunlaşmasında rol oynamaktadır. Bu etkinin gerçekleşmesi için de önceden FSH etkisi ile folliküllerin uyarılması gerekir. Luteinleştirici hormon olgun follikülün ovulasyonunu sağlar. Nitekim plazmada LH düzeyi ovulasyondan hemen önce doruk noktasına ulaştığı için, luteinleştirici hormon ovulasyonu başlatıcı uyarı olarak kabul edilmektedir. Bu hormonun asıl ismini almasını sağlayan ise onun luteinleştirici etkisidir. Yani CL oluşumunu sağlayan yönüdür (22).

Luteotropik hormon ovulasyonun uyarılması amacıyla önceleri kullanılırdı ve bazı araştırmacılar elde edilen embriyo sayı ve kalitesini artırdığını bildirmişlerdi (55), artık kullanımı terk edilmiştir. Zira östrusun indüklenmesi amacıyla prostaglandin uygulamasını takiben ön hipofizden yeterli düzeyde endojen LH salındığı belirlenmiştir (30).

2.2.2.4. Anti-Gebe Kısarak Serum Gonadotropini (Anti-PMSG)

Hindi, tavşan, koyun ve keçi gibi hayvanlardan elde edilebilmekte ve PMSG rezidülerinin serumdaki varlığının ortadan kaldırılması amacıyla kullanılmaktadır (1, 25, 30).

Süperovulasyon için PMSG kullanılan ineklerde residüel PMSG transfer edilebilir embriyoların üzerine olumsuz etkileri vardır. PMSG uygulanan ineklerde residüel PMSG'nin fertilizasyon ve embriyonik gelişim üzerine bu olumsuz etkileri nötralize etmek için anti-gebe kısarak serum gonadotropini (anti-PMSG) kullanılabilir (2, 51, 52). Rezidüel PMSG`yi nötralize etmek için östrus başlangıcından 18-24 saat (2) yada 12-18 saat (51, 52) sonra verilebilir. Ovulasyon öncesi LH yükselmesinden çok kısa süre sonra anti-PMSG verilerek ovulasyon ve transfer edilebilir embriyo sayısında artış

sağlanmaktadır (2). Ayrıca anti-PMSG uygulamaları ile büyük follikül ve kist rastlantıları da önemli ölçüde azalmaktadır (2).

Bu açıklamalara rağmen anti-PMSG kullanımının süperovulasyona cevabı artırdığına dair hiçbir kanıt bulamadıklarını bildiren araştırmalarda mevcuttur (56).

Tablo 2.4. PMSG ve anti-PMSG kullanılan ineklerden alınan sonuçlar (30).

PMSG (IU)	Anti-PMSG(IU)	İnek sayısı	Ortalama toplam embriyo sayısı	Ort. fertilize embriyo sayısı	Ort. nakledilebilir embriyo sayısı
1500	0	12	2.8±0.8	1.7±0.7	0.4±0.7
1500	1500	10	5.3±1.1	3.5±1.0	2.4±0.8
3000	0	10	2.2±1.1	0.9±0.6	0.3±0.3
3000	3000	11	10.1±1.2	6.2±1.1	3.2±1.0
4500	0	10	5.1±2.4	1.2±1.3	0.6±0.5
4500	4500	11	5.8±1.3	2.1±0.8	0.6±0.3

2.2.2.5. Progesteron (P₄)

Progesteron, 21 karbon atomu içeren steroid yapıda bir hormondur. Üretimi LH'nın denetimi altında gerçekleşir (22). Progestagenler veya progestinler doğal P₄ hormonu da dahil olmak üzere, P₄ molekülünde modifikasyon yapılarak oluşturulmuş P₄ benzeri etki yapan yapılar olarak tanımlanabilirler. Progesteron hormonunu bazı hayvan türlerinde placentar ve adrenal bezden de salgılandığı bilinmekle birlikte ana kaynağı CL'ü oluşturan luteal hücrelerdir. Progesteronun en önemli etkisi gebelik sırasında olup, özellikle erken gebeliklerde düzeyi önemlidir. Progesteron hormonu uterus myometrial aktiviteyi azaltır ve embriyonik dönemdeki besin kaynağı olarak endometriyal bezlerden uterus sütünü salgılatır. Uterus bezleri bu hormonun etkisiyle derinleşir ve dallanarak sekresyona başlar. Bu gelişimde östrojenik hormonun etkisine gerek vardır. Progesteron hormonu doku reddine neden olan T lenfositleri bloke ederek immunsupresif bir etki yapar ve fötusteki paternal antijenlerin ana tarafından reddini engeller. Progesteron siklik dozlarda adenohipofizden gonadotropinlerin salınımını inhibe eder. Progesteronun inekte belirlenen yarılanma ömrü 22-36 dakikadır. Bu nedenle dolaşımdaki standart düzeyi için devamlı salgısı gerekir. Gebelik yönünden

bu denli önemine rağmen bu durum ilginçtir. Özellikle üremenin kontrolü uygulamalarında çoğunlukla progestagenler tercih edilmektedir. Oral ve parantral uygulanan progestagenlerin hipotalamus ve adenohipofiz üzerinde güçlü negatif geriye tepki etkisi vardır ve GnRH salınımını, dolayısıyla siklik aktiviteyi inhibe eder (2).

Progestogenik preparatlar kullanılarak süperovulasyon aralıklarını kısaltmak mümkün olmaktadır. Bunda iki asıl amaç şunlardır;

-Endokrinolojik yapıyı luteal fazdakine eşdeğer hale getirerek dominant follikül oluşumunun engellenmesi.

-Progestogenik preparatların PG'lerle birlikte kullanımı ile elde edilen iyi kalite embriyo sayısının artırılması (22).

2.2.2.6. Östrojen

Ovaryumlardan, plecentadan, adrenal korteks'ten ve kısmende testislerden salgılanan steroid yapıda hormonlardır. Ovaryumlarda follikül çeperindeki hücrelerden salgılanan primer östrojen östradiol'dür. Östradiol, östron ve östriol siklik olarak salgılanırlar. Fizyolojik olarak P₄'la sinerjik olarak östrus sırasındaki ve psikolojik etkilerin ortaya çıkmasında, dişi genital kanalın gebeliğe hazırlanmasında, memelerin gelişmesi, latopoez ve galaktogenez olaylarında ve doğum sürecinde önemli roller oynarlar (2).

Süperovulasyon uygulaması yapılan ineklerde östrus ya hiç gözlenmemekte ya da zayıf olarak gözlenmektedir. Bu nedenle 10 mg östradiol 17- β beklenen östrus gününde ya da bir gün önce hayvana enjekte edilebilir (2).

2.3. SÜPEROVULASYON TEKNİKLERİ

Ticari ET için devam etmekte olan en büyük problem süperovulasyona cevaptaki farklılıklardır (49, 57-61). Teknolojinin yaygın bir kullanım alanının olması ve süperovulasyona yanıtı etkileyen faktörleri araştırmak, süperovulasyona yanıtı artırmak için yapılan girişimlere rağmen ekzojen gonadotropinlere cevap verme yeteneği, oosit kalitesi, LH dalgasının oluşumu, ovulasyon oranları, embriyonik gelişim, kullanılabilir embriyo sayısı gibi birçok parametrede doğal ve bireysel olarak hayvanlar arasında önemli derecede farklılıklar bulunmaktadır (18, 24, 62-64).

Aynı koşullar altında uygulanan süperovulasyon programından yıkama başına ortalama altı adet transfer edilebilir embriyo kazanılmaktadır. Ancak, yıkamalar arasında büyük farklılıklar söz konusu olmaktadır. Genellikle yıkanan süperovule ineklerin % 20-30'undan hiç embriyo kazanılmazken, diğer % 20-30'undan bir-üç adet embriyo kazanılabilmektedir. İdeal embriyo sayısı olan beş-12 embriyo vericilerin sadece üçte birinden elde edilebilmektedir. Zaman zamanda çok küçük oranda bir donör inekten 20'den fazla sayıda transfer edilebilir embriyo kazanılabılırken, çok nadiren de 50'den fazla sayıda embriyo kazanılabilmektedir (20).

Donörler arasında CL, ovum/embriyo ve freezing embriyo sayılarında önemli derecede fark oluşmaktadır. Yüksek verimli Holştayn ineklerde yapılan bir çalışmada östrus sırasında çapı 8 mm'den büyük follikül sayıları ve embriyo toplanması sırasında CL sayıları arasında bireysel farklılıkların tespit edildiği bildirilmiştir (65).

Donörlerin ovaryum yanıtı süperovulasyon uygulamasının başladığı zamanda gonadotropinlere duyarlı follikül sayısına bağlı olup bu folliküllerin sayısının belirlenmesi süperovulasyonun etkinliğini artıracaktır (23), ayrıca donör inekler arasında süperovulasyona yanıtındaki büyük çeşitlilik ovulasyon zamanındaki foliküllerin gelişim aşaması (66) ve PG enjeksiyonu ile LH artışları arasındaki oldukça değişken zaman ile kısmen ilişkili olabilir (67).

Bu değişkenlik ve özellikle LH artışındaki gecikme düşük sonuçlara katkıda bulunabildiği anlamına gelmektedir. LH pikindeki gecikmenin suni tohumlamadan sonra döllenme oranı (68) ve süperovulasyonu takiben transfer edilebilir embriyo sayısı üzerine olumsuz etkileri bildirilmiştir (69).

Geleneksel süperovulasyon protokollerinde; foliküler gelişimin optimal zamanında süperovulatör uygulamalara başlanılamaması, suni tohumlama zamanının belirlenmesi için östrusun tespitinin gerekliliği, donör başına embriyo üretiminde yüksek farklılık, donörlerin % 20-30'nun süperovulasyona yanıt vermemesi gibi bazı kısıtlamalar mevcuttur (17).

Bilinen protokollerde gonadotropin uygulamasına siklus ortasında başlanıldığından (ovulasyondan sonraki sekiz-12. günler) bu yaklaşımın gonadotropin uygulamaya başlanmadan önce östrusun belirlenmesi ve ikinci foliküler dalganın başlangıç günündeki büyük bireysel farklılıklar gibi süperovulatör yanıtı olumsuz etkileyebilen zorlukları bulunmaktadır (49).

Daha önceki dönemlerde süperovulasyon protokollerinde PG kullanılmadığı için bu amaçla PMSG'nin siklusun 16. gününde enjekte edildiği bildirilmektedir. Bu yöntem CL'un doğal luteolizisi esasına dayanmaktadır (2, 70). Östrusun tespit edildiği gün LH veya hCG uygulamasıyla ovulasyonlar uyarılmaktadır (1).

Bu yöntemde sakin kızgınlık, fertilizasyonun şekillenmemesi, ovaryumda follüküler kist şekillenmesi, ovaryum cevabının yeterli olmaması ve elde edilen embriyo sayısının az olmasından dolayı yöntemin kullanımı sınırlı olmuştur (2, 70).

Ovaryumların PMSG enjeksiyonlarına karşı cevabını etkileyen en önemli faktör PMSG enjeksiyonu ile östrusların başlaması arasındaki değişken süredir (2).

Günümüzde ise PMSG ve PG'ler (2) veya FSH ve PG'lerin birlikte kullanıldığı siklus ortası stimülasyon yöntemi uygulanmaktadır (28). Luteal faz stimülasyonlarında PMSG, östrus siklusunun sekiz-14. (mid-luteal faz) günleri arasında herhangi bir günde enjekte edilebilir ve bunu takiben 48 ya da 72 saat sonra luteolitik doz PG enjeksiyonu ile süperovulasyon yapılabilir (2, 4, 28, 43). Birinci PGF₂ α uygulamasından 12-24 saat sonra uygulanan ikinci PGF₂ α uygulamasının embriyo sayısını artırdığı bildirilmektedir (28, 70). Donör ve taşıyıcı hayvanlar arasındaki senkronizasyonun tam olarak sağlanması için PG'ler taşıyıcılara verici hayvanlardan 12-18 saat öncesinden uygulanır. Çünkü verici hayvanlar süperovulasyon amacıyla uygulanan hormonlardan dolayı PG enjeksiyonlarına daha erken cevap verirler (2).

Süperovulasyon protokollerinde gonadotropin uygulaması için en uygun zamanın östrüs siklusunun sekiz-14. günleri arası olduğu ve bunun temel nedeninin donörün ovaryumunda iyi gelişmiş bir CL bulunması ve follüküler dalganın süperovulasyon için en uygun durumda olmasıdır (2, 22, 71). Bu günlerden daha önce veya sonra başlanması durumunda süperovulasyon cevabının azalacağı bildirilmektedir (72).

Çalışmalarda altıncı siklus gününe değin çok erken olduğu yani iki, üç, dört, beş, ve altıncı günlerdeki hormon uygulamalarında istenilen sonucun alınmadığı, dokuz ve 14. günler arasında yapılan hormon uygulamalarında en iyi cevabın şekillendiği görülmüştür. Bu araştırma sonuçlarına göre, dokuz ve 14. günler arasında gerçekleştirilen süperovulasyon uygulamalarında toplanan embriyo sayı ve kalitesi bakımından bir fark olmadığı ortaya konulmasına rağmen (1, 25, 30) yapılan bir çalışmada süperovulasyon amacıyla FSH enjeksiyonuna östrüsten sonraki sekiz ya da 12. gün başlamışlardır. Araştırmacılar sekizinci gün FSH uygulamasına başladıkları

grupta ortalama 1.93, 12. gün başladıkları grupta ise 4.93 transfer edilebilir embriyo elde etmişlerdir (73).

Östrus siklusunun herhangi bir zamanında uygulanan progesteron salan preparatların kullanılmasıyla da östrusun takibine gerek duyulmadan süperovulasyon başlatılabilmektedir (Şekil 2.4.) (20). İneklerde süperovulasyon amacıyla PMSG tavsiye edilen dozu 1500-3000 IU olmakla birlikte genellikle 2500 IU dozda kas içi uygulanmaktadır (2, 28, 30, 49, 70).

Gonadotropin uygulamaya başlanıldığı gün foliküler dalganın aşaması süperovulasyona yanıtı etkileyen en önemli faktörlerden birisidir (65) ve birçok çalışma foliküler dalganın oluşum zamanında gonadotropin uygulamasına başlamanın önemini ortaya koymuştur (49). Östrus siklusunun dominant bir follikülün bulunmadığı aşamasında gonadotropin uygulamaya başlanması ya da uygulama zamanında bir dominant follikülün bulunmaması süperovulasyon yanıtının etkinliğini artırmaktadır (49, 65). Süperovulasyon uygulamasına foliküler dalganın ortaya çıktığı gün ya da bir gün önce başlanılmasının cevabı artacağı bildirilmektedir (74). Yapılan bir çalışmada foliküler dalganın başlangıç gününde yapılan gonadotropin uygulamalarında, foliküler dalganın başlangıcından bir ya da iki gün sonra yapılan uygulamalardan daha yüksek süperovulasyon yanıtı elde edildiği bildirilmektedir (36).

Foliküler gelişimi senkronize etmenin yollarından birisi de ovaryumda bulunan ≥ 5 mm çapındaki bütün folliküllerin transvaginal ultrason eşliğinde uzaklaştırılması ve bunu takiben bir gün sonra FSH uygulamasına başlanmasıdır (75, 76). Foliküler gelişimin senkronizasyonunda kullanılan bir başka yol da süperovulasyondan önce porcine LH (pLH) veya GnRH uygulamasıdır. Fakat bu yöntemin her zaman iyi sonuç vermediği bildirilmektedir (76). Ayrıca dominant follikülün müdahale edilerek uzaklaştırılması (ablation) foliküler dalganın oluşum zamanını kısalttığı (57), dalga oluşumuyla ilgili olarak FSH'nın konsantrasyonunu ve iki gün içerisinde küçük folliküllerin sayısını artırmıştır (77).

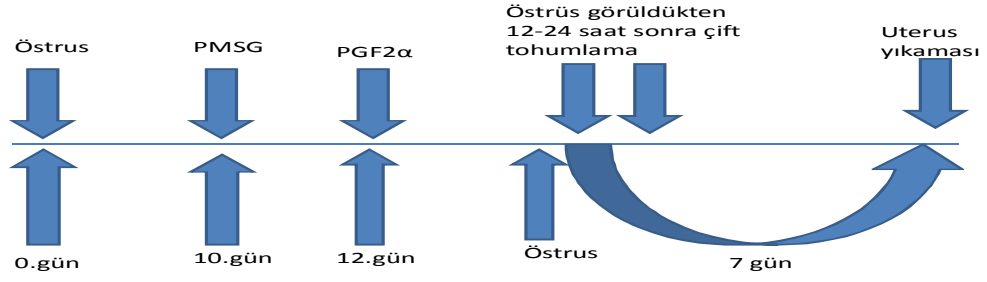
Siklus ortası FSH uygulamaları sırasında bir dominant follikülün bulunması süperovulasyona cevabı azalttığı (21, 71), ayrıca dominant follikülün uzaklaştırılmasıyla süperovulasyonla elde edilen embriyo sayısında artış sağlandığı bazı çalışmalarda bildirilirken, dominant follikülün aspirasyonunun süperovulasyon cevabında herhangi bir artış olmadığını bildiren çalışmalarda mevcuttur (5). Bununla

birlikte bu uygulamaya verilecek cevabın değişken olabileceği ve gelişecek folliküllerin atreziye olabilecekleri veya kistik yapı kazanabilecekleri belirtilmektedir (78).

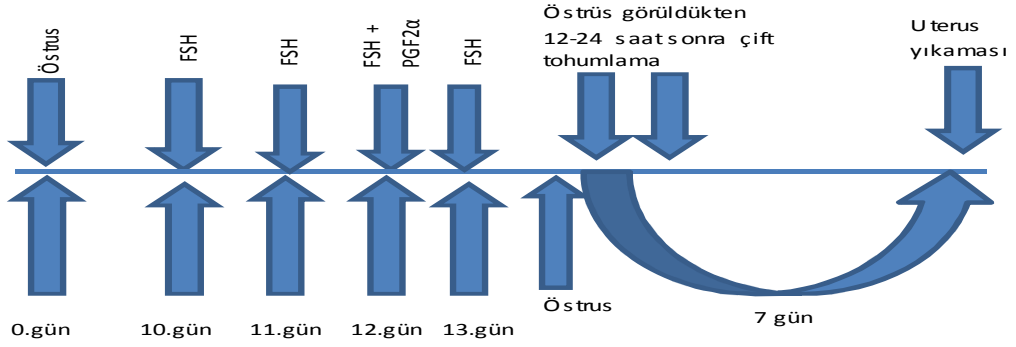
Süperovulasyon programları öncesinde foliküler gelişimin senkronizasyonu amacıyla en çok tercih edilen yöntem ise kontrollü ilaç (progesteron) salınımı yapan gereçlerin (CIDR) uygulaması ile birlikte beş mg östradiol (E)-17 β + 100 mg progesteron enjeksiyonunu takiben dört gün sonra FSH uygulamaya başlanmasıdır. Östrüs siklusunun herhangi bir döneminde başlanabilen bu yöntem ile siklusun sekiz–12. günlerinde süperovulasyona başlanan yöntemler kadar embriyo elde edilebildiği bildirilmiştir (79).

FSH'nın yarılanma ömrü kısa (iki saat) olduğundan tekrarlanan dozlar halinde ve yeterli süperovulasyon cevabı elde etmek için bu hormonun 12 saat aralıklarla sekiz–10 kez enjeksiyonu gerekmektedir (2, 22). FSH uygulamaları toplam dozun sekiz eşit miktarda enjeksiyonu şeklinde yapılabildiği gibi, 5:5,4:4,3:3,2:2 oranında günlük azalan miktarlarda da yapılabilmektedir. FSH'nın günde iki veya üç kez enjeksiyonu alınan cevabın, günde bir veya iki günde bir uygulanmasından daha yüksek olduğunu bildirilmiştir (1) (Tablo 2.3).

Süperovulasyon amacıyla kullanılan FSH preparatının içerdiği FSH/LH oranı da cevap üzerinde etkilidir (72). Preparat içinde bir miktar LH'nın bulunması gerektiği, yüksek LH oranının ise süperovulasyon cevabı, fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesini olumsuz etkilediği bildirilmektedir (75). Mapletoft ve ark. (74) 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 corpus 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. Bununla birlikte en uygun FSH/LH oranı ırklar arasında farklılık gösterebilmektedir (80).



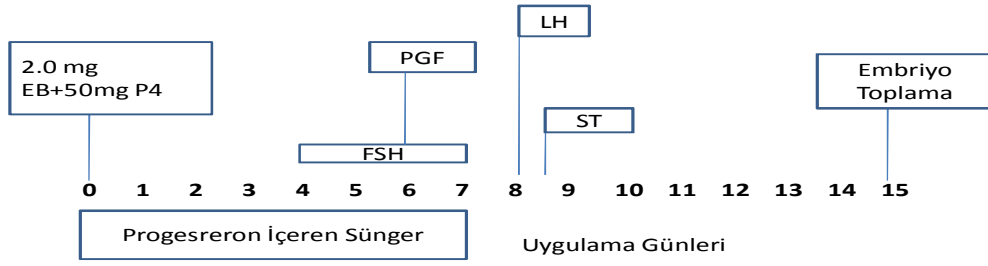
Şekil 2.1. Donörlerde PMSG ile süperovulasyon programı (15)



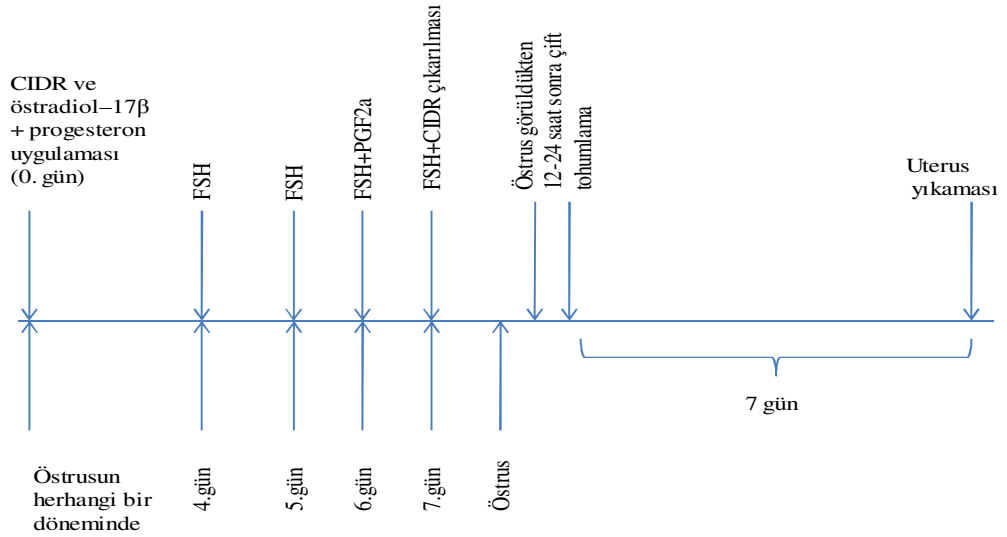
Şekil 2.2. FSH ile yapılan süperovulasyon programı (82).

Süperovulasyon uygulamalarında, ekzojen olarak paranteral ya da intravaginal progesteron verilerek östrus siklusunun herhangi bir aşamasında süperovulasyona başlanması mümkün olmaktadır. Bu yöntemle birim zamanda donör başına elde edilen embriyo sayısı artırılmıştır (81).

Foliküler gelişimin senkronizasyonu sayesinde östrus siklusunun evresine bakılmaksızın süperovulasyona başlanabilmekle birlikte, siklusun sekiz-12. günlerini beklemeye ve östrüs ve ovulasyon takibine gerek kalmamaktadır (49, 74).



Şekil 2.3. FSH, LH, Progesteron ve Östradiol benzoat ile yapılan süperovulasyon protokolü (17).



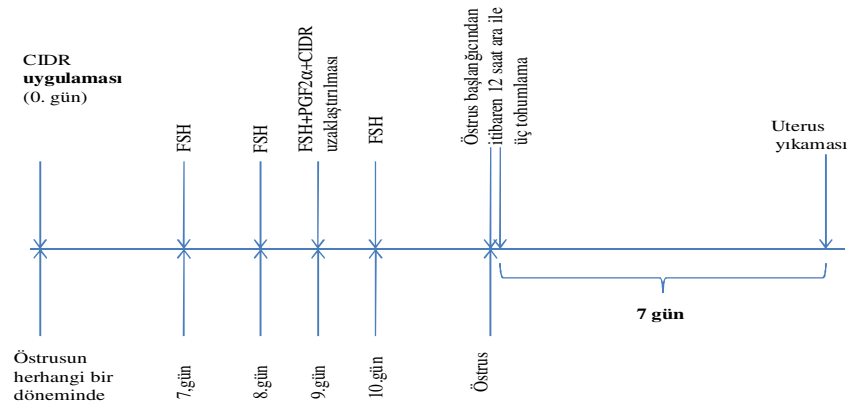
Şekil 2.4. Östrus gözlenmeden yapılan süperovulasyon uygulaması (74).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

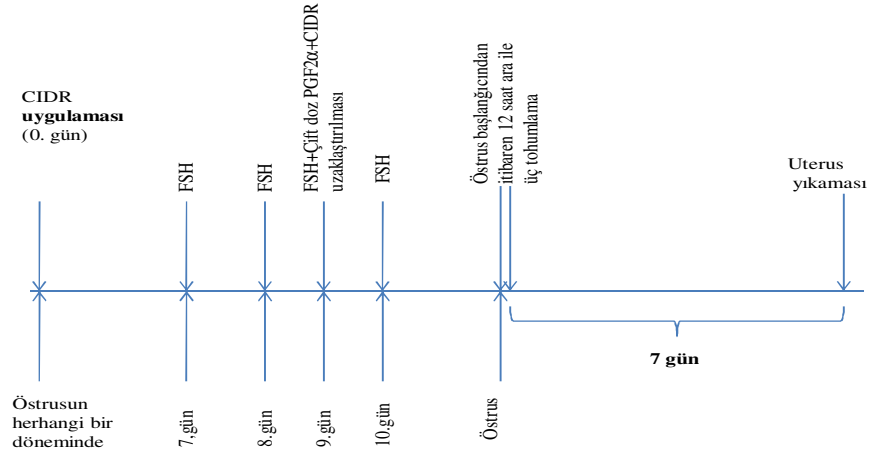
Bu çalışma; Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Araştırma çiftliğinde Holstayn ırkı ineklerde 2010 yılı nisan ayında gerçekleştirildi. Tez çalışmasında kullanılan donörler beş-yedi yaşlı Holstayn ırkı herhangi bir sağlık ve reproduktif problemi bulunmayan, siklusları düzenli ineklerden seçildi.

Çalışmada 20 baş inek süperovulasyon amacıyla onarlı iki gruba ayrıldı (Grup I ve GrupII). Süperovulasyon amacıyla donörlere uygulamanın başında (0. Gün) CIDR (Controlled İnternal Drug Release,1,38 gr progesteron,pharmacia&Upjohn company division of pfizer inc. Newyork NY10017) intra vaginal olarak uygulandı. Yedinci günden itibaren 12 saat ara ile günde iki kez sabah ve akşam azalan dozlarda (80:80 mg,60:60mg,40:30 mg,30:20 mg) toplam 400 mg FSH (Folltropin-V, toplam400 mg NIH-FSH-P1, Bioniche Animal Health Inc.,Ontario, CANADA K8N5J2) dört gün süre ile kas içi uygulandı. Daha sonra CL'i lize etmek amacıyla Grup I' de beşinci FSH enjeksiyonuyla birlikte tek doz 500µg Cloprostenol (Esrumate ,schering plough/Essex Animal Health sedelsberger strasse 2,26169 Friesoythe-ALMANYA) ve Grup II'de beşinci ve altıncı FSH enjeksiyonuyla birlikte çift doz (500 µg+500 µg) kas içi enjekte edildi. Her iki grupta da altıncı FSH enjeksiyonuyla birlikte CIDR uzaklaştırıldı. Cloprostenol enjeksiyonundan 24 saat sonra günde üç kez donörlerin östrusları takip edildi ve östrus başlangıcından itibaren 12 saat ara ile 0,25 ml payetlerdeki sperma ile

üç kez tohumlandı. Embriyolar tohumlamayı takiben yedinci günün sonunda uterus yıkaması ile toplandı. Uterus yıkaması sırasında ultrason (5 MHz, Honda HS-101V) ile ovaryum muayeneleri yapılarak mevcut CL ve anovulatör follükül sayıları tespit edildi. Yıkama solüsyonu olarak % 1 buzağı serumu (Fotal Bovine Serum Sigma F 9665) ve % 0.1 Kanamisin (Kanovet, Vetaş Veteriner ve Tarım İlaçları A.Ş.) içeren 1000 ml'lik laktatlı-ringer solüsyonu(Ringer-Fleks,Eczacıbaşı-Baxter Hastane Ürünleri,İstanbul) kullanıldı .Uterus yıkamasına başlamadan önce dört-altı ml lokal anestezi (Adokain,SANOVEL İlaç San.ve Tic. A.Ş.Maslak/İstanbul) solüsyonu kullanarak üst epidural anestezi yapıldı. Uterus yıkaması çift yönlü foley kateteri ile yapıldı. Kateterin balonu kornuların bifurkasyon noktasından yaklaşık beş cm içeri girdikten sonra 15-20 ml hava ile şişirilerek sabitlendi. İlk iki yıkama sırasında kornuların yaklaşık %70 den fazlası solüsyonla doldurulmadan her defasında 50-100 ml solüsyon verilerek her bir kornu beş-altı defa yaklaşık 500 ml solüsyon kullanılarak yıkandı. Alınan uterus yıkama içeriği filtreden geçirildikten sonra petri kutularına konarak stereo mikroskop altında embriyolar bulundu. Bulunan embriyolar arama solüsyonuna aktarıldı (Viqro TM HOLDİNG Plus Bioniche Animal Health USA INC Pulman WA, USA 509-3354047). Bu solüsyonda üç kez yıkandıktan sonra kaliteleri ve gelişme evreleri belirlendi.



Şekil 3.1. Grup I'de uygulanan süperovulasyon protokolü



Şekil 3.2. Grup II 'de uygulanan süperovulasyon protokolü

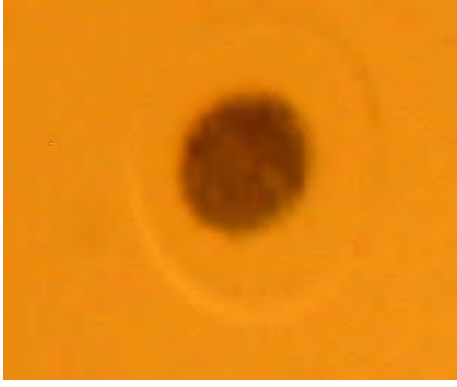
Embriyoların kalitelerine göre sınıflandırması:

Çok İyi (1.kalite): Embriyo küre şeklinde büyüklüğü rengi ve yapısı tek düze hücrelere sahip.

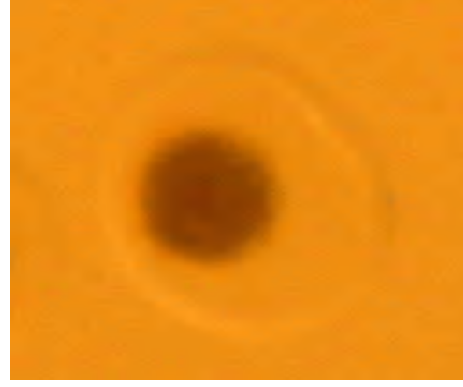
İyi (2. kalite): Birkaç vezikül, düzensiz şekil ve dışarıya doğru birkaç çıkıntı gibi önemsiz birkaç kusurlara sahip embriyo.

Orta (3. 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 (2).



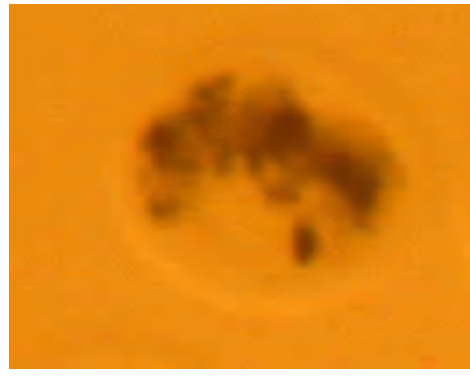
Birinci Kalite Morula



İkinci Kalite Morula



Üçüncü Kalite Expanded Blastosist



Dejenere Blastosist

Şekil 3.3. Kalite sınıflarına göre sığır embriyoları

3.1. İSTATİSTİK ANALİZ

Çalışmada iki farklı protokolün toplam embriyo sayısı ve kalitesi, toplam follikül, toplam CL, transfer edilebilir embriyo sayısı üzerine etkileri t-testi yapılarak karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmada deneyimli araştırmacılar tarafından iki farklı grupta toplam 20 adet süperovulasyon uygulanmıştır. Uterus yıkamasının yapıldığı gün rektal muayene ve ultrasonografik muayenelerle Grup I de 119 adet ve Grup II de ise 93 adet CL tespit edilmiştir. Grup I de iki adet ve Grup II de bir adet donörden embriyo toplanamamıştır. Çalışma sonucu her iki grupta elde edilen bulgular Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Her iki grupta elde edilen embriyoların kalitelere göre sayıları

Protokol	1.Kalite	2.Kalite	3.Kalite	Dejenere
Grup I TEK PG F ₂ α	19	9	6	10
Grup II ÇİFT PG F ₂ α	28	8	9	2

Tablo 4.2. Gruplarda yapılan muayenelerde ovaryum bulguları ve elde edilen toplam embriyo sayıları

Protokol	CL	Anovulatör Follikül	Toplam Embriyo	Unfertilize Ovum (UFO)
Grup I TEK PG F ₂ α	119	30	44	5
Grup II ÇİFT PG F ₂ α	93	46	47	3

Çalışmada iki farklı protokolün toplam embriyo sayısı ve kalitesi, toplam folikül, toplam CL, transfer edilebilir embriyo sayısı üzerine etkileri t-testi yapılarak karşılaştırılmıştır.

Araştırmada Birinci Protokolün toplam follikül, toplam CL, toplam embriyo sayısı ve kaliteleri, transfer edilebilir embriyo sayısı ve dejenere embriyolar üzerine ortalamaları, standart sapmaları ve güven aralıkları Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Birinci Protokolün Toplam Follikül, Toplam CL, Toplam Embriyo Sayısı ve Kaliteleri, Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı ve Kaliteleri ve Dejenere Embriyolar Üzerine Tanımlayıcı İstatistikleri

	Ortalama	Standart Hata	95% Güven Aralığı		P
			Alt Sınır	Üst Sınır	
Toplam Fol.	3,00	0,94	0,8672	5,1328	P>0,05
Toplam CL	11,90	2,51	6,2025	17,5975	
Toplam Embriyo	4,40	1,17	2,2351	7,5649	
Transfer Edilebilir Embriyo	2,70	0,82	0,8514	4,5486	
Kalite1	1,90	0,67	0,3750	3,4250	
Kalite2	0,90	0,40	-0,0204	1,8204	
Kalite3	0,60	0,26	-0,0032	1,2032	
Dejenere	1,00	0,39	0,1078	1,8922	

Araştırmada İkinci Protokolün toplam follikül, toplam CL, toplam embriyo sayısı ve kaliteleri, transfer edilebilir embriyo sayısı ve dejenere embriyolar üzerine ortalamaları, standart sapmaları ve güven aralıkları Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4. İkinci Protokolün Toplam Follikül, Toplam CL, Toplam Embriyo Sayısı ve Kaliteleri, Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı ve Kaliteleri ve Dejenere Embriyolar Üzerine Tanımlayıcı İstatistikleri

	Ortalama	Standart Hata	95% Güven Aralığı		P
			Alt Sınır	Üst Sınır	
Toplam Fol.	4,60	1,55	1,0761	8,1239	P>0,05
Toplam CL	9,30	1,36	6,2084	12,3916	
Toplam Embriyo	4,70	1,61	0,8893	8,9107	
Transfer Edilebilir Embriyo	3,60	1,38	0,4691	6,7309	
Kalite1	2,80	1,19	0,1064	5,4936	
Kalite2	0,80	0,24	0,2357	1,3643	
Kalite3	0,90	0,31	0,1886	1,6114	
Dejenere	0,20	0,13	-0,1016	0,5016	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Denemede elde edilen bulgular değerlendirildiğinde protokollerin toplam embriyo sayısı ve kalitesi üzerine olan etkisinin istatistiki açıdan önemsiz olduğu görülmüştür. Toplam embriyo sayısı 1. Protokolde 4.40 ve 2. Protokolde 4.70 olarak bulunmuştur. Süperovulasyon uygulaması sonucunda ortalama 10 embriyo elde edilebildiği ve bunun yaklaşık %50'sini transfer edilebilir embriyoların oluşturduğu bildirilmektedir (31, 32).

Yaakub ve ark. (83) etçi düvelerde rasyonda 3 kg konsantre yem ilave verilen çalışma grubunda toplam 265 mg NM-FSH-P1 sekiz eşit dozda uygulanması ve beşinci FSH uygulaması ile birlikte tek doz prostaglandin uygulayarak yaptıkları çalışma da ortalama 9.8 ± 0.9 ovum/ embriyo elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki toplam embriyo sayısının düşük olmasının nedenleri süperovulasyon protokünün farklılığı, gonadotropik hormonun uygulama şekli, dozu, ilave besleme yapılmaması olarak düşünüldü. Novotny ve ark. (84) ineklerde azalan dozlarda FSH ve çift doz $PGF_2\alpha$ uygulayarak tohumlama sırasında Progesteron ölçüm sonuçlarına göre iki gruba ayrılan çalışmada progesteron düzeyi düşük grupta sırasıyla toplam embriyo sayısı ve transfer edilebilir embriyo sayısı 8.8 ve 5.06, progesteron düzeyi yüksek grupta sırasıyla toplam embriyo sayısı ve transfer edilebilir embriyo sayısı 3.85 ve 1.43 olarak tespit etmişlerdir. Köse ve ark. (85) toplam 400 mg NM-FSH-P1 sekiz azalan dozda uygulanması ve beşinci FSH uygulaması ile birlikte tek doz PG uygulayarak yaptıkları çalışmada ortalama 8.54 ± 1.69

ovum/embriyo elde etmişlerdir. Bizim çalışma gruplarımızın her iki çalışmadaki toplam embriyo sayısı ve transfer edilebilir embriyo sayısından düşük olmasının sebepleri ırk, mevsim, besleme, süperovulasyon protokollerinin uygulanmasındaki farklılıklar, süperovulasyona başlamadan önce östrus siklusunun takip edilmemesi, süperovulasyon sırasında dominant follikülün varlığının kontrol edilmemesi olarak düşünüldü.

Denemede geri kazanım oranı ise Grup I' de % 41,1 (49/119) ve Grup II'de %53,7 (50/93) olarak tespit edildi. Sartori ve ark. (86), Holstein ırkı düvelerde yaptıkları çalışmada geri kazanım oranını % 63.9 tespit etmişlerdir. Köse ve ark. (85) İsviçre esmeri ineklerde yaptıkları çalışmada geri kazanım oranını % 74.0 tespit etmişlerdir. Bizim çalışma gruplarımızın her iki çalışmadaki geri kazanım oranlarından düşük olmasının sebepleri ırk, mevsim, besleme, süperovulasyon protokollerinin uygulanmasındaki farklılıklar, süperovulasyona başlamadan önce östrus siklusunun takip edilmemesi, süperovulasyon sırasında dominant follikülün varlığının kontrol edilmemesi olarak düşünüldü.

Denemede toplam follikül sayısı protokol tiplerinden etkilenmemiş ($P>0.05$), 1. protokolde 3.00 ± 0.94 olan follikül sayısı, 2. protokolde 4.60 ± 1.55 olarak tespit edilmiştir. Yaakub ve ark. (83) yaptıkları çalışmada follikül sayıları (> 10 mm) 3.5 ± 0.6 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki bulgularla uyum göstermektedir.

Denemede toplam CL sayısı uygulamalardan etkilenmemiştir. 1. Protokolde 11.90 ± 2.51 olan bu parametre, 2. Protokolde 9.30 ± 1.36 olarak saptanmıştır. Denemede uygulanan 1. Protokolün istatistiki olarak önemli olmasa da CL sayısını artırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Nakajima ve ark. (43) iki grup üzerinde 4000 IU PMSG ve çift doz $PGF_2\alpha$ uygulamasını takiben östrusun başlangıcından 12 saat sonra bir gruba anti-PMSG serum uygulayarak yaptıkları çalışmada, anti-PMSG serum uyguladıkları grupta ortalama corpus luteum, sayısını 12.7 ± 5.2 , kontrol grubunda ise ortalama CL sayısını 14.3 ± 6.1 olarak tespit etmişlerdir. Köse ve ark. (85) yaptıkları çalışmada ortalama CL sayılarını 11.54 ± 1.63 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlarla bizim çalışmamızdaki bulgular uyum göstermektedir.

Denemede transfer edilebilir embriyo sayısı 1. protokolde 2.70 ± 0.82 ; 2. Protokolde 3.60 ± 1.38 olarak tespit edilmiş, uygulamaların transfer edilebilir embriyo sayısı üzerine olan etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$).

Süperovulasyon için PMSG kullanılan ineklerde residüel PMSG'nin transfer edilebilir embriyoların üzerine olumsuz etkileri vardır. PMSG uygulanan ineklerde rezidüel PMSG'nin fertilizasyon ve embriyonik gelişim üzerine bu olumsuz etkileri nötralize etmek için anti-PMSG kullanılabilir (2, 51, 52). Nakajima ve ark. (43) iki grup üzerinde 4000 IU PMSG ve çift doz $PGF_2\alpha$ uygulamasını takiben östrusun başlangıcından 12 saat sonra bir gruba anti-PMSG serum uygulayarak yaptıkları çalışmada, anti-PMSG serum uyguladıkları grupta ortalama transfer edilebilir embriyo sayısını 3.3 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuç bizim çalışmamızdaki bulgularla uyum göstermektedir. Kontrol grubunda ise ortalama transfer edilebilir embriyo sayısını 2.0 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonucun anti-PMSG grubu ve bizim çalışma sonuçlarımıza göre düşük olması anti-PMSG uygulanmayan protokollerde PMSG'nin yarılanma ömrünün uzun olmasından dolayı FSH etkisinin devam etmesi olarak düşünüldü.

Yaakub ve ark. (83) yaptıkları çalışma da ortalama 4.8 ± 0.7 transfer edilebilir embriyo elde etmişlerdir. Sugano ve Shinogi (50) 450 IU tek enjeksiyon, 600 IU tek enjeksiyon ve 600 IU günde iki kez 3 gün human menoposal gonadotropin ve tek doz $PGF_2\alpha$ uygulayarak yaptıkları çalışma da ortalama transfer edilebilir embriyo sayılarını sırasıyla 5.4 ± 2.6 , 7.5 ± 4.5 , 6.3 ± 5.2 olarak tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki transfer edilebilir embriyo sayısının düşük olmasının nedenleri süperovulasyon protokünün farklılığı, çevresel faktörler, besleme, süperovulasyon protokollerinin uygulanmasındaki farklılıklar, LH kullanılmaması, süperovulasyona başlamadan önce östrus siklusunun takip edilmemesi, süperovulasyon sırasında dominant follikülün varlığının kontrol edilmemesi olarak düşünüldü.

Lopes da Costa ve ark. (87) toplam 400 mg NM-FSH-Pl sekiz eşit dozda uygulanması ve 6. FSH uygulaması ile birlikte tek doz prostaglandin uygulayarak yaptıkları çalışma da ortalama 6.4 ± 1.2 transfer edilebilir embriyo elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki transfer edilebilir embriyo sayısının düşük olmasının nedenleri gonadotropik hormonun uygulama şekli, dozu, çevresel faktörler, besleme, süperovulasyon protokollerinin uygulanmasındaki farklılıklar, süperovulasyona başlamadan önce östrus siklusunun

takip edilmemesi, süperovulasyon sırasında dominant follikülün varlığının kontrol edilmemesi olarak düşünüldü.

Denemede 1. ve 2. Kalite embriyo sayısı 1. Protokolde sırasıyla 1.90 ± 0.67 ve 0.90 ± 0.40 ve 2. Protokolde sırasıyla 2.80 ± 1.19 ve 0.80 ± 0.24 olarak bulunmuştur. Denemede uygulanan 2. Protokolün istatistiki olarak önemli olmasa da 1. Kalite embriyo sayısını artırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yaakub ve ark. (83) yaptıkları çalışmada ortalama 2.7 ± 0.5 1. ve 2. Kalite embriyo elde etmişlerdir. Köse ve ark. (85) yaptıkları çalışmada elde ettikleri ortalama 1. Kalite embriyo sayısı 3.23 ± 1.18 ve 2. Kalite embriyo sayısı 1.69 ± 0.47 dir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir.

Süperovulasyon amacıyla kullanılan FSH preparatının içerdiği FSH/LH oranı da cevap üzerinde etkilidir (72). Preparat içinde bir miktar LH'nın bulunması gerektiği, yüksek LH oranının ise süperovulasyon cevabı, fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesini olumsuz etkilediği bildirilmektedir (75). Mapletoft ve ark. ineklerde yaptıkları çalışmalarında, 400 mg NIH-FSH-P1 ve farklı dozlarda, %100 (standart FSH-P), %32 ve %16 LH içeren ve hiç LH içermeyen FSH preparatları ile süperovulasyon uygulamışlardır. Araştırmacılar gruplarda inek başına ortalama corpus 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 (74). Bununla birlikte en uygun FSH/LH oranı ırklar arasında farklılık gösterebilmektedir (80).

Siklus ortası FSH uygulamaları sırasında bir dominant follikülün bulunması süperovulasyona cevabı azaltığı (21, 71), ayrıca dominant follikülün uzaklaştırılmasıyla süperovulasyonla elde edilen embriyo sayısında artış sağlandığı bazı çalışmalarda bildirilmektedir. Kim ve ark. (24) dominant follikülün uzaklaştırarak yaptıkları süperovulasyon çalışmasında, dominant follikülün uzaklaştırıldığı grupta toplam corpus luteum, toplam ovum/embriyo ve transfer edilebilir embriyo sayılarını sırasıyla 9.6 ± 1.1 , 7.7 ± 1.3 ve 4.6 ± 0.9 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçların bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlardan yüksek olmasının sebebi dominant follikülün uzaklaştırılmasını takiben FSH konsantrasyonunda ve küçük folliküllerin sayısındaki artış ve süperovulasyonun başlangıcında östrus siklusunun takip edilmesi olarak düşünüldü. Kontrol grubunda ise toplam corpus luteum, toplam ovum/embriyo ve

transfer edilebilir embriyo sayılarını sırasıyla 6.1 ± 0.9 , 3.9 ± 1.0 ve 2.3 ± 0.8 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçların bizim çalışma grubunda elde edilen sonuçlardan düşük olmasının sebebi dominant follikülün varlığı ve donörler arasındaki bireysel farklılıklar olarak düşünüldü.

Ticari embriyo transferi için devam etmekte olan en büyük problem süperovulasyona cevaptaki farklılıklardır (49, 57-61). Teknolojinin yaygın bir kullanım alanının olması ve süperovulasyona yanıtı etkileyen faktörleri araştırmak, süperovulasyona yanıtı artırmak için yapılan girişimlere rağmen ekzojen gonadotropinlere cevap verme yeteneği, oosit kalitesi, LH dalgasının oluşumu, ovulasyon oranları, embriyonik gelişim, kullanılabilir embriyo sayısı gibi birçok parametrede doğal ve bireysel olarak hayvanlar arasında önemli derecede farklılıklar bulunmaktadır (18, 24, 62-64).

Süperovulasyon cevabındaki farklılıklar; yaş, ırk, mevsim, gonadotropik hormonun çeşidi, dozu, uygulama sayısı, beslenme, sürü yönetimi, hastalıkların kontrolü, östrus siklusunun ve laktasyonun dönemi, çevresel faktörler, iklim ve mevsim, ovaryumların mevcut durumu (2, 25, 30, 33, 34), özellikle uygulamanın başlangıç zamanında ovaryumdaki foliküler dalganın aşaması gibi birçok faktörden etkilenmektedir (35, 36).

Donör basına elde edilen embriyo sayı ve kalitesi bazı çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde kullanılan hormon ve yöntem farklılığı, dozu, uygulama sayısı ve yöntemi, beslenme, östrus siklusunun ve laktasyonun dönemi, çevresel faktörler, iklim ve mevsim, ovaryumların mevcut durumu, uygulamanın başlangıç zamanında ovaryumdaki foliküler dalganın takibinin yapılmaması, ek besleme programı uygulanmayışı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Dünyada yaygın olarak kullanılan reproduktif biyoteknoloji uygulamalarından birisi olan embriyo transferi gelecekte ülkemizde de genetik kapasitesi yüksek ırkların elde edilmesinde ve kültür ırkı hayvan varlığımızın artırılmasında, genetik kapasitesi yüksek damızlıklardan kurulan büyük işletmelerin sayısının artırılmasında kullanılması kaçınılmazdır. Bu uygulamanın en önemli aşamasından birisi de süperovulasyondur.

Bu çalışmada PG'ler ile iki farklı süperovulasyon uygulamasının embriyo sayısı ve kalitesi üzerine etkisi incelendi. İstatistiki olarak her iki protokol arasında önemli bir fark bulunamamış olsa da donörlere östrüstan önce çift PG uygulamasının embriyo sayısı ve kalitesi üzerine sayısal olarak olumlu etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Süperovulasyon uygulamalarındaki en önemli problem donörlerin cevaplarındaki bireysel farklılık ve süperovulasyon cevabının önceden belirlenememesidir. Süperovulasyona etki eden faktörler ve önem düzeylerinin belirlenmesi, süperovulasyon yöntemleri araştırılarak embriyo sayısı ve kalitesi yönünden en uygun ve maksimum sayıda transfer edilebilir embriyo elde edilmesine olanak sağlayacak tekniğin geliştirilmesi mevcut ülke şartlarında embriyo transferinin uygulanmasında önemli avantaj sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. Manual of Bovine Embryo Transfer. National Livestock Breeding Center MAFF, JICA-Japan. 1995.
2. Alaçam E., Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun`i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite (1.Baskı). Konya 1994; 1-385 s.
3. Mapletoft RJ. The Technology of Embryo Transfer. IETS, Montreal, 1987; pp: 2-41.
4. Gordon I. Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes. Controlled Reproduction in Farm Animals Series. CAB International, 1996; pp 1-492.
5. Hasler JF. Factors influencing the success of embryo transfer in cattle, 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada, July 11-16 2004;
6. Elsdon RP. Embryo collection by surgical methods. Embryo Transfer in Farm Animals. A Review of Techniques and Applications. Monogr Agric. Canada, Ottawa 1977;
7. Rowe RF, Del Campo MR, Eilts CL, French LR, Winch RP, Ginther OJ. A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. Theriogenology 1986; 6: 471.
8. Seidel GE Jr. Superovulation and embryo transfer in cattle. Science 1981; 211: 351-357.
9. Thibier M. The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine in vivo-derived embryos transferred. Embryo Transfer Newsletter 2000; 18 (4): 24-28.

10. Rodewijk H. Embryo transfer in the dairy herd. *Veepro Magazine* 1997; 29: 12-14.
11. Kılıçoğlu Ç, Tekeli T. Tavşanlarda embriyo transferi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1981; 28 (1-4): 23-35.
12. Ünal EF. Farelerde Embriyo Transferi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara 1983;
13. Kılıçoğlu Ç. Koyunlarda embriyo nakli üzerinde çalışmalar. *Doğa Bilim Derg* 1984; 8(3): 257-270.
14. İleri İK, Sayın T. Sığırlarda embriyo transfer çalışmaları. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 1986; 12 (1): 23-35.
15. Akyol N, Kızıl SH, Tuncer PH. İneklerde süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmaları. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2004; 44 (1): 1-5.
16. Seidel GE. Applications of embryo transfer. In: *Training manual for embryo transfer in cattle*. 1991; p 3-13.
17. Baruselli PS, Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bo GA. Superovulation and embriyo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 77-88.
18. Mikkola M, Mäntysaari P, Tammiranta N, Peippo J, Taponen J. Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Anim Reprod Sci* 2005; 87: 193-202.
19. Wildt DE, Monfort ST, Donoghue AM, Johnston LA, Howard J. Embryogenesis in conservative biology-or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology* 1992; 37: 161-184.
20. Sağırkaya H. Sığırlarda embriyo transfer uygulaması ve Türkiye açısından önemi. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg* 2009; 28(2): 11-19.
21. Meton JS, Roos APW, Mullaart E, Ruigh L, Kaal PLAM, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial pplications of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003; 59:651-674.
22. Akyol N. Sığır embriyo transferinde hormon kullanımı. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2001; 41(1): 95-105.
23. Driancourt MA. Regulation of ovarian follicle dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 2001; 55: 1211–1239.

24. Kim IH, Son DS, Yeon SH, Choi SH, Park SB, Ryu IS, Suh GH, Lee DW, Lee CS, Lee HJ, Yoon JT. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 2001; 55: 937-945.
25. Boland MP, Goulding D, Roche JF. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 1991; 35: 5-17.
26. Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1993; 39: 7-24.
27. Betteridge KJ, Smith C. Extending the use of embryo transfer in farm animals. In: *The Proceedings of 1th. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin 1988*; pp: 255-264.
28. Bülbül B, Dursun Ş. İneklerde süperovulasyon cevabına etki eden faktörler. *Hay Araş Derg* 2005; 15 (1): 16-25.
29. Huanca W, Cordero A, Huanca T, Cardenas O, Adams GP, Ratto MH. Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progestin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology* 2009; 72: 803–808.
30. Mori J. *Textbook on Advances Farm Animal Embryo Transfer Hormone Research*. JICA, Japan 1999.
31. Selk G (1996). Embryo transfer in cattle. Erişim: [<http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3158web.pdf>], Erişim Tarihi: 15 Temmuz 2010.
32. Gordon IR. *Reproductive technologies in farm animals*, CAB International, Cambridge 2005.
33. Donaldson LE. Embryo production in superovulated cows: Transferable embryos correlated with total embryos. *Theriogenology* 1984; 21(4): 517-523.
34. Žižlavský J, Říha J, Urban F, Máchal L, Štípková M. Production of embryos from repeated superovulations of cows during one calving interval. *Czech J Anim Sci* 2002; 47(3): 92-97.
35. Calder M, Rajamahendran R. Follicular growth, ovulation and embryo recovery in dairy cows given FSH at the beginning or middle of the estrus cycle. *Theriogenology* 1992; 38: 1163-1174.

36. Nasser LF, Adams GP, Bo GA, Mepletofl ILI. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 713-724.
37. De Rensis F, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow a review. *Theriogenology* 2003; 60: 1139-1151.
38. Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 2001; 55: 1323-1340.
39. Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP. 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* 1999; 55: 1-12.
40. Alkemade SJ, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation in the cow: Effects of biological activity of gonadotropins, Proc 12th Ann Conv, AETA, Portland, Maine, 1993; pp
41. Murphy BD, Mapletoft RJ, Manns J, Humphrey WD. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 1984; 21: 117-125.
42. Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotrophin. *Endocrine Rev* 1991; 12: 27-44.
43. Nakajima A, Hiraizumi S, Onodera K, Suzuki H, Kudo Y, Domeki I. The use of bovine anti-PMSG serum in beef cattle after PMSG-superovulation. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 95-98.
44. Nakahara T, Domeki I, Yamanouchi M. Changes in serum PMSG concentration in cows which were administered with PMSG. *Jpn J Anim Reprod* 1984; 30: 127-128.
45. Mikel-Jenson A, Greve T, Madej A, Edqvist LE. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2 α treated cow. *Theriogenology* 1982; 18: 33-34.
46. Moor RM, Kruip TAM, Green D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation. *Theriogenology* 1984; 21: 103-116.
47. Saumande J, Chupin D, Mariana JC, Ortavant R, Mauleon P. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation, In: Sreenan JM (eds), *Control of Reproduction in the Cow*. Martinus Nijhoff, 1978; pp 195-224.
48. Menzer C, Schams D. Radioimmunoassay for PMSG and its application to in-vivo studies. *J Reprod Fert* 1979; 55: 339-345.

49. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42(6): 601-611.
50. Sugano M, Shinogi T. Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Anim Reprod Sci* 1999; 55(3-4): 175-81.
51. Dieleman SJ, Bevers MM, Vos PLAM, de Loos FAM. PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 1993; 39: 25-42.
52. Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* 1994; 33: 519-529.
53. Lauria A, Genazzani AR, Oliva O, Inaudi P, Cremonesi F, Monittola C, Aureli G. Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. *J Reprod Fertil* 1982; 66: 219-225.
54. McGowan MR, Braithwaite M, Jochle W. Superovulation of beef heifers with Pergonal _HMG.: a dose response trial. *Theriogenology* 1985; 24: 173-184.
55. Takahashi Y, Kanagawa H. Effects of LH-RH Analogue on the Ovulation Rate and Embryo Quality in Heifers Superovulated With PMSG and PGF₂ α . *Jpn J Vet Res* 1984; 32: 183-189.
56. Callesen H, Greve T, Hyttel P, Bak A, Gotfredsen P, Holm P. Preovulatory plasma estradiol 17- β concentration and ovulation rates in PMSG/anti-PMSG treated heifers. *Theriogenology* 1990; 34: 251-258
57. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 177-188.
58. Guilbault LA, Grasso F, Lussier JG, Rouillier P, Matton P. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* 1991; 91: 81-89.
59. Petroman I, Păcală N, Petroman C, Bencsik I, Orboi MD, Dronca D, Băneş A. Utilization of gestagen hormones and pituitary FSH extracts in inducing the superovulation at embryo donor cows. *J Food Agric Env* 2009; 7(2): 193-195.

60. Barros CM, Nogueira MFG. Superovulaçãõ em zebuínos de corte. In: Proceedings of the first simpo´sio internacional de reproducãõ animal aplicada Londrina. 2004; pp 212-222.
61. Nogueira MFG, Barros BJP, Teixeira AB, Trinca LA, D'Occhio MJ, Barros CM. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology* 2002; 57: 1625-1634.
62. Callesen H, Greve T, Hyttel P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 1986; 25: 71-86.
63. Greve T, Callesen H, Hyttel P, Hoier R, Assey R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 41-50.
64. Vos PLAM, Van de Leemput EE, Zeinstra EC, Bevers MM, Dieleman SJ. Postponement of the preovulatory LH surge does not impair the developmental potential of in vivo matured oocytes from eCG/PG-superovulated heifers. *Theriogenology* 1996; 45: 329 (abstract).
65. Driancourt MA. Regulation of ovarian follicle dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 2001; 55: 1211-1239.
66. Humblota P, Holmb P, Lonerganc P, Wrenzyckid C, Lequarre´e AS, Guyader C, Jolya F, Herrmannnd D, Lopesb A, Rizosc D, Niemannd H, Callesenb H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005; 63: 1149-1166.
67. Maurel MC, Thierry P, Menissier F, Astruc S, Bouguennec B, Coupet H, Saumande J. LH monitoring in bovine embryo production. Application of an ELISA kit AETE meeeting. Lyon 1994, pp: 216.
68. Hansel W, Schechter RJ, Malven PV, Simmons KR, Black DL, Hackett AJ, R.R. Saatman. Plasma hormone levels in 6-methyl-17-acetoxypregesterone and estradiol benzoate treated heifers. *J Anim Sci* 1975; 40(4): 671-681.
69. Goff AK, Greve T, Bousquet D, King WH. Progesterone and luteinizing hormone profiles in heifers used as oocyte donors. *Theriogenology* 1986; 26: 577-86.
70. Seidel GE, Seidel SM. Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal Production and health paper 77. Erişim: [<http://www.fao.org/DOCREP/004/T0117E/T0117E00.htm>], Erişim Tarihi: 15 Temmuz 2010.
71. Rajamahendran R, Calder MD. Superovulatory responses in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave. *Theriogenology* 1993; 40: 99-109.

72. Hasler JF. Current status and potential of embryo transfer and reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1992; 75: 2857-2879.
73. Diaz C, Quintela LA, Peña AI, Becerra JJ, Herradón PG. Influencia del día de inicio del tratamiento en los resultados de superovulación en vacas lecheras. *Arch Zootec* 1999; 48: 43-50.
74. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Superovulation in perspective. *Bioniche Animal Health Customer Service* 2002.
75. Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner HP, Pöhland R. Superovulation in cattle: Practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 587-599.
76. Mapletoft RJ, Bó GA. 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 2004;
77. Bodensteiner KJ, Kot K, Wiithank MC, Ginther OJ. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 1996; 45: 1115-1128.
78. Liu J, Sirois J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biol Reprod* 1998; 58: 1527-1532.
79. Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 53-72.
80. Quaresma MA, Lopes da Costa L, Robalo Silva J. Superovulation of Mortelenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLTROPIN). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 2003; 98: 81-84.
81. Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003; 79: 245-264.
82. Bader JF, Kojima FN, Wehrman ME, Lindsey BR, Kerley MS, Patterson DJ. Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows. *Anim Reprod Sci* 2005; 85: 61-70.
83. Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* 1999; 51: 1259-1266.

84. Novotny F, Hajurka J and Macak V. Relationship between blood serum progesterone levels in cattle donors and the yield and quality of embryos. *Bull Vet Inst Pulawy*; 2005 49: 49-52.
85. Köse M, Dursun Ş, Bülbül B, Kırbaş M. İsviçre esmeri ineklerde fsh ile süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmaları. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 2006; 16:(1)1-6
86. Sartori R, Suarez-Fernandez CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJM and Wiltbank MC. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 2003; 60: 1319-1330.
87. Lopes da Costa L, Chagas e Silva J, Robalo Silva J. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology* 2001; 56 (1): 65-77.

ÖZGEÇMİŞ

Uğur KARA. 1978 yılında Adana ili, Saimbeyli ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Saimbeyli’de tamamladı. 1996 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesine girdi. 2001 yılında aynı fakülteden dönem birincisi olarak mezun oldu. Askerlik hizmetini 2002 yılında tamamladı. 2002-2003 yılları arasında Adana ili Tufanbeyli ilçesinde serbest Veteriner Hekim olarak çalıştı. 2003-2006 yılları arasında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Van Tarım İl Müdürlüğü Gürpınar İlçe Müdürlüğünde ve 2006-2008 yılları arasında Adana Tarım İl Müdürlüğü Tufanbeyli İlçe Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak çalıştı. 2008 yılı sonunda Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne tayin oldu. Halen burada veteriner Hekim olarak çalışmaktadır.