

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI



**HOLŞTAYN İRKİ İNEKLERDE AYNI SÜPEROVULASYON
PROTOKOLÜ ÜZERİNDE UYGULANAN İKİ FARKLI FOLİKÜLER
DALGA SENKRONİZASYON YÖNTEMİNİN EMBRİYO VERİMİ VE
KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Hasan MUTLU

Danışman

Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

HATAY – 2024

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

**HOLŞTAYN İRKİ İNEKLERDE AYNI SÜPEROVULASYON
PROTOKOLÜ ÜZERİNDE UYGULANAN İKİ FARKLI FOLİKÜLER
DALGA SENKRONİZASYON YÖNTEMİNİN EMBRİYO VERİMİ VE
KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi
Hasan MUTLU

Danışman
Prof. Dr. Cengiz YILDIZ

Bu tez, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından
TAGEM/HAYSÜD/T1/23/A5/P3/6358 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2024

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM JİNEKOLOJİ VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

**HOLŞTAYN İRKİ İNEKLERDE AYNI SÜPEROVULASYON
PROTOKOLÜ ÜZERİNDE UYGULANAN İKİ FARKLI FOLİKÜLER
DALGA SENKRONİZASYON YÖNTEMİNİN EMBRİYO VERİMİ VE
KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi
Hasan MUTLU

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 11/07/2024 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı: Prof. Dr. Seyfettin GÜR

Üye : Prof. Dr. Barış Atalay USLU
Üye : Prof. Dr. Cengiz YILDIZ
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nurdan COŞKUN ÇETİN
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aysel ERASLAN ŞAKAR

Bu tez, Enstitümüz Doğum, Jinekoloji ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

11/07/2024
Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesi sırasında akademik bilgi ve deneyimleri ile bana yön veren ve çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyerek bana sabır gösteren başta kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Cengiz YILDIZ'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Fikret KARACA, Prof. Dr. İlker YAVAŞ ve Dr. Öğr. Nurdan COŞKUN ÇETİN'e, Anabilim Dalı Öğretim Elemanı Arş. Gör. Oğuz Kaan YALÇIN'a, Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Aysel ERASLAN ŞAKAR'a en derin duygularla teşekkür ediyorum.

Sunulan tez çalışması, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM/HAYSÜD/T1/23/A5/P3/6358 numaralı proje olarak desteklendi. Desteklerinden ötürü, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne (TAGEM) ve projenin yürütülmesi için hayvan, malzeme ve laboratuvar imkânlarını sağladıkları için Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve yöneticilerine şükranlarımı sunarım.

Çalışmanın yürütülmesi sırasında bana destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Uğur KARA, Dr. Serdal ÇOBAN, Veteriner Hekim Enver Gökhan ALTUN ve enstitümüz hayvancılık bölümü çalışanlarına, verilerin istatistiki değerlendirilmesinde özverili yardımları için Doç. Dr. Hatice HIZLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimine başlamam için beni cesaretlendiren abim Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya doktora eğitimim sırasında hoşgörü ve sevgi ile manevi desteklerini esirgemeyen eşim Gülay MUTLU ve oğlum Mustafa Kerem Efe MUTLU'ya en kalbi duygularla teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XII
ÖZET	XIV
ABSTRACT	XV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oogenezis ve Folikülogenezis	3
2.2. Ovaryum Folikül Popülasyonu	4
2.3. Ovaryum Folikülleri	4
2.3.1. Primordiyal Foliküller	5
2.3.2. Primer Foliküller	5
2.3.3. Sekonder Foliküller	6
2.3.4. Antral Foliküller	6
2.4. Antral Folikül Sayısı (AFS)	6
2.4.1. Ovaryum Rezervinin Oluşması Üzerine Prenatal Yaşam Sırasındaki Şartların ve Genetiğin Etkisi	7
2.4.2. AFS ve AMH Konsantrasyonu	8
2.5. Anti-Müllerian Hormon (AMH)	8
2.5.1. AMH'ın Tekrarlanabilirliği	9
2.5.2. Sığırlarda Kan AMH Düzeyleri	11
2.5.3. Östrus Siklusu Boyunca Plazma AMH Konsantrasyonundaki Değişim.....	12
2.5.4. Sığırlarda Süperovulasyon Yanıtı ile AMH Konsantrasyonu Arasındaki İlişki ...	13
2.6. Sığırlarda Östrus Siklusu Sırasında Foliküler Dalgalar	15
2.6.1. Folikül Havuzuna Girme, Seçilme ve Baskınlık	16
2.6.2. Foliküler Dalga Dinamiklerinin Hormonal Kontrolü	19
2.6.3. Çoklu Dominantlık (co-dominant)	21

2.6.4. Luteal Dinamikler-Korpus Luteum (CL)	22
2.6.5. Luteolizis	23
2.6.6. Küçük Foliküler Dalga	24
2.7. Embriyo Transferi	25
2.7.1. Embriyo Transferinin Önemi ve Gelişim Süreci	25
2.7.2. Günümüzde IVD (İn vivo) ve IVP (İn vitro) Embriyo Üretimi	27
2.8. Sığırlarda Süperovulasyon	29
2.8.1. Süperovulasyon İçin Kullanılan Gonadotropinler	30
2.8.1.1. FSH (Folikül Uyarıcı Hormon)	30
2.8.1.1.1. Süperovulasyonda Çoklu FSH Uygulama Sayılarını Azaltma Çalışmaları	32
2.8.1.1.2. Farklı Uygulama Protokollerinin Ardından pFSH'nın Dolaşımdaki Konsantrasyonları	34
2.8.1.2. eCG (equine chorionic gonadotropini)	35
2.8.2. Sığırlarda Süperovulasyon Başarısını Etkileyen Faktörler	38
2.8.2.1. Süperovulasyon Başarısını Etkileyen Hayvanlarla İlgili Faktörler.....	38
2.8.2.1.1. Östrus Siklus Günü ve Foliküler Dalganın Aşaması	38
2.8.2.1.2. Gelişmekte Olan Foliküllerin Sayısı ve Anti-müllerian Hormon	39
2.8.2.1.3. Yaş	39
2.8.2.1.4. Irk	40
2.8.2.1.5. Laktasyon Durumu ve Süt Üretimi	41
2.8.2.2. Süperovulasyon Başarısını Etkileyen Teknik Faktörler	41
2.8.2.2.1. Gonadotropinler	41
2.8.2.2.2. Süperovulasyon Protokolleri.....	42
2.8.2.2.3. Tohumlamalar	43
2.8.2.2.3.1. Süperovulasyon Yapılan Sığırlarda Fertilizasyon Oranı.....	43
2.8.2.2.3.2. Tohumlama Zamanı	43
2.8.2.2.3.3. Sexed Sperma ile Tohumlama	44
2.8.2.3. Süperovulasyon Başarısı Üzerine Beslemenin Etkisi	45
2.8.2.3.1. Negatif Enerji Dengesi	45
2.8.2.3.2. Yüksek Enerji ve Kuru Madde Alımı	46
2.8.2.3.3. Besinsel Protein	47

2.8.2.4.	Süperovulasyon Başarısını Etkileyen Çevresel Faktörler	47
2.8.2.4.1.	Mevsim, İklim ve Hava	47
2.8.2.4.2.	Psikolojik Stres	48
2.9.	Sığırlarda Süperovulasyon Yöntemleri	49
2.9.1.	Geleneksel Yöntem	49
2.9.2.	Foliküler Dalga Senkronizasyonu	51
2.9.2.1.	Progesteron ve östradiol kullanımı	51
2.9.2.2.	Folikül Aspirasyonu	52
2.9.2.3.	GnRH-LH Kullanımı	54
2.9.2.3.1.	GnRH'ya Ovulasyon Yanıtının İyileştirilmesi	56
2.9.2.3.2.	Persiste Ovaryum Folikülü Nasıl Gelişir?	57
2.10.	Embriyoların Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	60
2.10.1.	Normal İn Vivo Sığır Embriyo Gelişimi	61
2.10.2.	Embriyoları Gelişim Aşamasına Göre Sınıflandırma	62
2.10.3.	Embriyo Kalite Derecelendirmesi	65
2.10.4.	Embriyo Değerlendirme Prosedürü	66
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	71
3.1.	Gereç	71
3.2.	Yöntem	72
3.2.1.	Süperovulasyon Protokolleri ve Gruplar	72
3.2.1.1.	Süperovulasyon Protokollerinin Uygulanması	74
3.2.1.2.	Uterus Yıkaması Sonrası Yapılan İşlemler	79
3.2.2.	AMH (Anti Müllarian Hormon) Testleri için Kan Alımı	80
3.2.3.	AMH Analizi	81
3.3.	İstatistikî Analizler	83
4.	BULGULAR	84
4.1.	Süperovulasyon Sonrası Ovaryum Bulguları ve Flushing Sonrası Elde Edilen Oosit-Embriyo Sayıları.....	84
4.2.	Flushing Sonrası Elde Edilen Oosit-Embriyoların Kalite Sınıflandırılması Değerleri.....	86
4.3.	Flushing Sonrası Elde Edilen Embriyoların Gelişim Aşamalarına Göre Değerleri.....	88

4.4. Serum AMH1 ve AMH2 Düzeyleri Arasındaki Konsantrasyon Değişim Değeri.....	89
4.5. AMH1, AMH2, CL Sayısı, CL+Anovule Folikül Sayısı, Toplam Oosit-Embriyo Sayısı, Transfer Edilebilir ve Dejenere Embriyo Sayıları, UFO Sayıları ve Kalite Derecelerine Göre Embriyo Sayıları arasındaki İlişki	92
5. TARTIŞMA	94
5.1. Süperovulasyon sonrası Ovaryum Bulguları ile Flushing Sonrası Elde Edilen Oosit-Embriyo Sayıları ve Bunlara Ait Verilerin Yorumlanması.....	95
5.2. Ekzojen FSH ile Süperstimülasyonun Dolaşımdaki AMH Düzeyine Etkisi..	105
6. SONUÇ	110
7. KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ	126

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1.	İneklerde foliküler dalga.....19
Şekil 2.2.	Örnek geleneksel süperovulasyon protokolü.....50
Şekil 2.3.	Östradiol benzoat+ progesteron ile yapılan foliküler dalga senkronizasyonu ve Süperovulasyon uygulaması.....52
Şekil 2.4.	GnRH ile foliküler dalga senkronizasyonu sonrası başlanan protokollerden biri.....56
Şekil 2.5.	GnRH ile ovulasyonun uyarılmasından sonra oluşan ilk foliküler dalga sırasında uygulanan süperovulasyon protokolü.....59
Şekil 2.6.	Bir blastosistin yapısı.....62
Şekil 2.7.	Deneyimsiz embriyo teknisyenleri tarafından doğru ayrımı zor kılan, siklisun 6-8. günlerinde donörlerden elde edilen UFO'lardaki son derece geniş morfolojik değişkenlik.....63
Şekil 2.8.	Kod 1 (mükemmel) blastosistler (siyah ince oklar), Kod 1 expanded blastosistler (siyah kalın oklar) Kod 2 erken blastosist (çift beyaz ok), kod 2 kollabe olmuş ekspanded blastosist (tek beyaz ok).....68
Şekil 2.9.	Kod 1 ekspanded blastosist (kalın beyaz ok), kod 1 blastosistler (ince beyaz oklar), kod 2 blastosist (siyah ok).....68
Şekil 2.10.	Farklı morfolojik görünüme sahip (UFO) oositler.....69
Şekil 2.11.	Kod 1 (mükemmel) morulalar (siyah oklar), kod 1 kompakt morula (ince ok), kod 2 (iyi)kompakt morula (çift ince ok), kod 1 erken blastosist (beyaz ok).....69
Şekil 2.12.	Kod 1(mükemmel) blastosist (beyaz ince ok), kod 1 ekspanded blastosist (Kalın beyaz ok), kod 2 ekspanded blastosist (kalın siyah ok), kod 2 (iyi) blastosistler (siyah ince oklar).....70
Şekil 3.1.	Grup 1- Modifiye GnRH süperovulasyon protokolü.....73
Şekil 3.2.	Grup 2- Modifiye folikül aspirasyonu süperovulasyon protokolü.....73
Şekil 3.3.	Grup 3- Kontrol grubu süperovulasyon protokolü.....74
Şekil 3.4.	Folikül aspirasyonundan önce ovaryumdaki 10 mm ve 15 mm'lik yan yana iki folikülün durumu (Resim 1), 10 mm'lik folikülün aspirasyonundan

	sonraki görüntü (Resim 2), ovaryum üzerinde bulunan iki büyük folikülün aspirasyonundan sonraki görüntü (Resim 3).....	78
Şekil 3.5.	Süperstimülasyon uygulaması devam ederken (4. FSH enjeksiyonu) foliküllerin durumu (Resim 4), tohumlama öncesi foliküllerin durumu (Resim 5).....	78
Şekil 3.6.	Süperovulasyon uygulanmış bir sığır ovaryumu, flushing öncesi korpus luteumlar (oklar korpus luteum çapları).....	79
Şekil 3.7.	Folikül aspirasyonu grubundaki bir donör inekten alınan oosit/embriyolar, üstte kalan kısımda 41 transfer edilebilir embriyo, altta kalan kısımda 7 UFO, 3 dejenere embriyo bulunmaktadır.....	80
Şekil 3.8.	Flushing öncesi ovaryumların muayenesi.....	82
Şekil 3.9.	Flushing (uterus yıkaması) işlemi.....	82
Şekil 3.10.	Uterus yıkantı sıvısının zona filtresinden süzülmesi.....	83
Şekil 3.11.	Zona filtresinde kalan ve petri kabına aktarılmış içerikte mikroskop altında embriyo aranması.....	83
Şekil 4.1.	Ortalama serum AMH 1 düzeylerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.....	95
Şekil 4.2.	Ortalama serum AMH 2 düzeylerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.....	95
Şekil 4.3.	Gruplardan bağımsız olarak tüm donör ineklerin ortalama serum AMH düzeylerinin AMH1 ve AMH2'deki değişimi.....	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1.	Kıtalara göre sığırlarda, 2022-2018 yılları arasındaki toplam IVD (in vivo embriyo üretimi) ve IVP (in vitro embriyo üretimi) embriyo üretimi.....	28
Çizelge 2. 2.	2022 Yılı Avrupa sığır IVD embriyo üretimi.....	29
Çizelge 2.3.	Sığır süperovulasyonunda kullanılan Avrupa, Amerika, Fransa ve Japonya da satışı yapılan FSH preparatları.....	31
Çizelge 2.4.	FSH (400 mg NIH-FSH-P1) ve değişen miktarda LH ile süperstimüle edilen Bos taurus ineklerin süperovulasyon yanıtının karşılaştırılması.....	32
Çizelge 2.5.	Dört gün boyunca günde iki kez kas içi Folltropin-V ile %2 hyaluronanda dilue edilen ve tek bir kas içi enjeksiyon yapılan etçi donörlerde ortalama oosit- embriyo üretimi.....	34
Çizelge 2.6.	Piyasada kullanılan bazı eCG ürünleri.....	37
Çizelge 2.7.	Üç farklı protokolle süperstimülasyon yapılmış sütçü ineklerden elde edilen ortalama oosit ve embriyo sayıları.....	55
Çizelge 2.8.	Embriyo kalite derecelendirme	60
Çizelge 2.9.	Embriyo gelişim aşamaları ve uluslararası kısaltmaları	60
Çizelge 3.1.	Protokolün 7. gününde, folikül aspirasyon grubundaki donörlerin folikül aspirasyonu öncesi ovaryumlarında bulunan aspire edilen foliküllerin sayı ve büyüklükleri.....	77
Çizelge 4.1.	Grupların süperovulasyon yanıtları, anovule folikül sayıları ve flushing sonrası elde edilen oosit-embriyo sayıları ile bunlara ait değerlendirmelerin uygulanan protokollere göre karşılaştırması.....	85
Çizelge 4.2.	Gruplardan elde edilen embriyoların kalite derecelerinin uygulanan protokollere göre karşılaştırması.....	87
Çizelge 4.3.	Gruplardan elde edilen embriyoların kalite derecelerine göre yüzde (%) değerlerinin uygulanan protokollere göre karşılaştırılması.....	87
Çizelge 4.4.	Gruplardan elde edilen embriyoların gelişim aşamalarının uygulanan protokollere göre karşılaştırılması.....	88

Çizelge 4.5.	Gruplardan elde edilen embriyoların gelişim aşamalarına göre yüzde (%) değerlerinin uygulanan protokollere göre karşılaştırılması.....	89
Çizelge 4.6.	Gruplara göre AMH1, AMH2 ve AMH (%) değişim değerlerinin uygulanan protokollere göre karşılaştırması.....	90
Çizelge 4.7.	Gruplardan bağımsız AMH 1 ve AMH 2 arasında yapılan t-testi.....	92
Çizelge 4.8.	AMH1, AMH2, CL sayısı, toplam oosit-embriyo sayısı, transfer edilebilir ve dejenere embriyo sayıları, UFO sayıları ve kalite derecelerine göre (1, 2, 3, 4. kalite) embriyo sayıları arasındaki ilişkinin derecesi (korelasyonları)..	93



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AETA	: Amerikan Embriyo Transfer Derneği
AETE	: Avrupa Embriyo Transfer Derneği
AFS	: Antral folikül sayısı
AMH	: Anti-Müllerian hormon
BCS	: Vücut kondisyon skoru
bFSH	: Bovine folikül stimüle edici hormon
BL	: Blue tongue
BMP-15	: Bone morphogenetic protein 15
BSE	: Bovine spongiform encephalopathy
BUN	: Kan üre nitrojen
BVD	: Bovine viral diyare
CETA	: Kanada Embriyo Transfer Derneği
CIDR	: Kontrollü progesteron salan intravaginal gereç
CL	: Korpus luteum
DF	: Dominant folikül
DMI	: Kuru madde alımı
EBL	: Enfeksiyöz bovine löykoz
eCG	: Equine chorionic gonadotropini
EGF	: Epidermal growth factor
ET	: Embriyo transferi
ETTED	: Embriyo Transferi ve Teknolojileri Derneği
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
GH	: Growth Hormon
hCG	: Human menopausal gonadotropin
IBR	: Enfeksiyöz bovine rhinotracheitis
ICM	: İnnner cell mass
IETS	: Uluslararası Embriyo Teknoloji Derneği
IGF 1	: İnsülin like growth factor 1
IU	: İnternasyonel ünite
IVD	: İn vivo development embriyo

IVP	: İn vitro production embriyo
kDa	: Kilo dalton
LH	: Luteinleştirici hormon
MIS	: Müllerian inhibe edici madde
MOET	: Multiple ovulation and embriyo transferi
mRNA	: Messenger ribo nükleik asit
ng	: Nanogram
OPU	: Ovum pick-up
pg	: Picogram
PG	: Prostaglandin
PGF2 α	: Prostaglandin F2 alfa
PMSG	: Gebe kısrak gonadotropini
PRID	: Progesteron salan vagina içi alet
RbFSH	: Rekombinant sığır folikül stimüle edici hormon
roFSH	: Rekombinant ovine folikül stimüle edici hormon
SBTE	: Brezilya Embriyo Transfer Derneği
TGF- β	: Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
THI	: Sıcaklık-nem indeksi
TMR	: Total Mix Rasyon
UFO	: Unfertilize oosit
VEMTED	: Veteriner Embriyo Teknoloji Derneği

ÖZET

Holştayn Irkı İneklerde Aynı Süperovulasyon Protokolü Üzerinde Uygulanan İki Farklı Foliküler Dalga Senkronizasyon Yönteminin Embriyo Verimi ve Kalitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Süperovulasyon ve embriyo transferi, genetik ilerleme hızını artırma ve arzu edilen fenotiplerin daha hızlı çoğaltılması amacıyla kullanılan önemli bir hayvansal üretim programıdır. Bu çalışmanın amaçları; 1) iki farklı foliküler dalga senkronizasyon yönteminin (GnRH enjeksiyonu ve folikül aspirasyonu) elde edilen embriyo sayısı ve kalitesi üzerine etkisini karşılaştırmak ve 2) süperstimülasyon uygulamasının antimüllerian hormon (AMH) seviyesine etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmada her biri 10 Holştayn inekten oluşan üç grup hayvan (n=30) kullanıldı. Araştırma gurupları; presenkronizasyon + PRID-PG + 7. gün GnRH +48 saat sonra FSH (grup 1-modifiye GnRH), presenkronizasyon + PRID-PG + 7. gün foliküler aspirasyon + 48 saat sonra FSH (grup 2-modifiye folikül aspirasyon), ve PRID-PG + 7. gün GnRH + 36 saat sonra FSH (grup 3-orijinal GnRH) olarak oluşturuldu. Toplam 500 µg FSH azalan dozlarda 12 saat arayla 8 enjeksiyonla yapıldı. AMH için kan alımları, FSH enjeksiyonlarına başlamadan hemen önce (AMH1) ve süperstimülasyon bittikten 24 saat sonra (AMH2) gerçekleştirildi. Grup 1 ve 2'de süperovulasyona cevabı gösteren CL sayıları grup 3'ten yüksek bulundu (p<0.05). Grup 2'de fertilize olmamış oosit (UFO) (p<0.05), anovule folikül ve 4. kalite embriyo sayıları (p<0.01) ile 4. kalite embriyo (%) ve UFO (%) değerleri (p<0.05) grup 1 ve 3'ten yüksek bulundu. Grup 1 ve 3'te ise transfer edilebilir embriyo (%) ve fertilize oosit (%) oranları (p<0.05) grup 2'den yüksek bulundu. Grup 3'te %71.42±22.91 kompakt morula kazanımı ile grup 1 ve 2'ye göre daha toplu gelişim aşamasında embriyo elde edildi (p<0.01). Dolaşımdaki AMH seviyesi artışının, FSH enjeksiyonlarına başlamadan hemen önce (AMH1) ile süperstimülasyon sonrası dönem (AMH2) arasında önemli düzeyde olduğu ortaya konuldu (p<0.05).

Sonuç olarak, GnRH ile foliküler dalga senkronizasyon yönteminin kullanım kolaylığı, fertilize ve transfer edilebilir embriyo (%) oranlarının daha yüksek, 4.kalite (dejenere embriyo + UFO) embriyo sayısı ve (%) oranlarının daha düşük olmasından dolayı folikül aspirasyon yönteminden daha iyi olduğu tespit edildi. Süperstimülasyon sonrası ölçülen AMH değerlerinin de güvenilir bir indikatör olamayabileceği anlaşıldı.

Anahtar kelimeler: Süperovulasyon, GnRH, Folikül aspirasyonu, Embriyo, AMH

ABSTRACT

The Effect of Two Different Follicular Wave Synchronization Methods Applied on The Same Superovulation Protocol on Embryo Yield and Quality in Holstein Breed Cows

Superovulation and embryo transfer is an important animal production program used to increase the rate of genetic progress and to reproduce desirable phenotypes faster. The objectives of this study are; 1) to compare the effect of two different follicular wave synchronization methods (GnRH injection and follicle aspiration) on the number and quality of embryos obtained, and 2) to investigate the effect of superstimulation application on the level of antimullerian hormone (AMH).

Three groups of animals (n=30) each consisting of 10 Holstein cows were used in the study. The research groups were as follows; presynchronization + PRID-PG + GnRH on day 7 + FSH after 48 hours (group 1-modified GnRH), presynchronization + PRID-PG + follicular aspiration on day 7 + FSH after 48 hours (group 2-modified follicular aspiration), and PRID-PG + GnRh on day 7 + FSH after 36 hours (group 3-original GnRH). A total of 500 µg FSH was administered in 8 injections 12 hours apart in decreasing doses. Blood sampling for AMH was performed immediately before starting FSH injections (AMH1) and 24 hours after the end of superstimulation (AMH2). CL numbers indicating response to superovulation were higher in groups 1 and 2 than that of in group 3 (p<0.05). The number of unfertilized oocytes (UFO) (p<0.05), anovulated follicles and 4th quality embryos (p<0.01), 4th quality embryos (%) and UFO (%) values (p<0.05) were higher in group 2 than groups 1 and 3. In groups 1 and 3, transferable embryo (%) and fertilized oocyte (%) rates (p<0.05) were higher than group 2. In group 3, 71.42±22.91% compact morula and embryos at a more collective stage of development were obtained compared to groups 1 and 2 (p<0.01). The increase in circulating AMH levels was found to be significant (p<0.05) between the period just before the start of FSH injections (AMH1) and the period after superstimulation (AMH2).

In conclusion, it was determined that the follicular wave synchronization method with GnRH was better than the follicle aspiration method due to its ease of use, higher fertilized and transferable embryo (%) rates, and lower number and (%) of 4th quality (degenerate embryo + UFO) embryos. It was also understood that AMH values measured after superstimulation may not be a reliable indicator.

Keywords: Superovulation, GnRH, Follicle aspiration, Embryo, AMH

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artmasına bağlı olarak hayvansal proteine olan talepte günden güne artmaktadır. Bunun karşılanabilmesi için hayvansal üretim, birim hayvan başına verimliliğin artırılması ve daha hızlı genetik ilerleme kazanımı adına, son yıllarda ileri üreme tekniklerinden olan *in vivo* ve *in vitro* embriyo üretim yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Günümüzde embriyo transfer uygulamaları, sığır yetiştiriciliğinin sektörel bir hal aldığı birçok ülkede üstün genetik özelliğe sahip sığırlara olan talep sayesinde ve daha çok ekonomik gerekçelerle yaygın biçimde kullanılmaktadır. Ülkemizde embriyo transferinin pahalı olduğu şeklinde yanlış bir algı bulunmaktadır. Embriyo transferinin doğru donörlerle ve doğru amaçlarla kullanıldığında ortaya koyacağı avantajlara bakıldığında maliyetlerinin çok üzerinde faydalar sağlayacağı açıktır. Ülkemizin nitelikli damızlık ihtiyacı bakımından dışa bağımlılıktan kurtulmasındaki en etkin ve hızlı yol embriyo transfer uygulamalarının yaygınlaştırılması olacaktır. Embriyo transfer uygulamalarının maliyetlerini düşürmek için; 1) bu işe değer donör kullanmak, 2) süperovulasyon başına transfer edilebilir ve dondurulabilir embriyo sayısını artırmak gerekmektedir.

Sığırcılıkta yardımcı üreme teknolojilerinden suni tohumlama uygulamalarının düzenli kullanımı 1936 yılından sonra başlamış ve suni tohumlama kooperatiflerinin kurulmasıyla gelişimini sürdürmüştür. Günümüzde kullanılan ileri biyoteknolojik faaliyetlerin; embriyo transferi (ET), *in vitro* fertilizasyon (IVF), intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ve klonlama gibi önemli üreme biyoteknolojilerinin birer prosedür haline gelmesinde katkısı büyük olmuştur (Herdoğan ve ark. 2023). Yardımcı üreme teknolojilerinden embriyo transferi uygulamalarının sığırcılık alanında gelişimi de 1940'lı yılların sonlarında olmuştur. Günümüz çiftlik hayvanlarında embriyo transfer sektörü iki grubun öncü çabalarının sonucu gelişimini sürdürmüştür. Bunlar, ilk başlarda prosedürleri ve embriyo transfer tekniklerini geliştiren bilim adamları ile bu teknolojiyi modifiye eden, sığırcılık sektörüne ilk olarak uygulanabilir ve ulaşılabilir hale getiren ticari embriyo transfer uygulayıcıları olmuştur (Hasler 2014). ABD'de uygulanan bir genetik seleksiyon modeline göre; mevcut sürünün en iyi %5'inin embriyo transferi donörü olarak kullanılması, %45'inin genetik değeri yüksek dişi sperma ile tohumlanması ve geriye kalanların da embriyo transferi taşıyıcısı ya da etçi sperma ile kullanma melezlemesi yapılması önerilmektedir (Sağırkaya 2021).

IETS (Uluslararası Embriyo Teknolojileri Topluluğu) 2021 yılı verilerine göre *in vitro* embriyo üretimi bir önceki yıla göre %31.5 artışla 1.521.018 adet, *in vivo* embriyo üretimi de %6.8 artışla 386.374 adet olmuştur (Viana 2022). Günümüzde embriyo üretimi ve transferi başarısının artmasına yönelik yapılan yoğun bilimsel çalışmaların sonucunda, üretilen embriyoların taze ya da donmuş-çözdürülmüş transferlerinin çiftliklerde suni tohumlama benzeri kolay bir şekilde yapılmasına olanak sağlamış, bu sayede embriyo transferi uygulamaları endüstri haline gelmiştir. Süperovulasyon yanıtlarında donör başına sıfır ile elliden fazlaya değişen çok büyük varyasyon vardır. Flush başına ortalama embriyo kazanımlarının; 10 oosit-embriyo ve 6 transfer edilebilir embriyo olduğu (Seidel ve ark. 2003) ve bu ortalamaların günümüzde de değişmemiş olduğu, AETA (Amerika Embriyo Transfer Derneği) 2021 verileri ile büyük ölçüde benzediği görülmektedir (Demetrio 2021). Süperovulasyon uygulamalarının başarısı elde edilen transfer edilebilir embriyo sayısına göre belirlenmektedir. Bu yüzden çalışmamızın amacı flush başına transfer edilebilir embriyo sayısını artırmak olacaktır. Embriyo transferi başarısını etkileyen çok fazla etken bulunmaktadır. *In vivo* embriyo üretimi amacıyla bir süperovulasyon uygulamasından maksimum sayıda transfer edilebilir embriyo elde etmek için; AMH (Anti Mullerian Hormon) düzeyi yüksek donör kullanmak, süperstimülasyona en uygun zamanda başlamak, besleme ve çevre şartlarının ideal olmasına dikkat etmek gerekmektedir (Mikkola ve ark. 2020).

Sığırlarda serum AMH konsantrasyonu ile antral folikül rezervi ve süperovulasyon cevabı arasında önemli bir ilişki olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Souza ve ark. 2015; Hirayama ve ark. 2017; Abdel Aziz ve ark. 2017). Ayrıca sığırlarda serum AMH konsantrasyonlarının östrüs siklusu içerisinde çok az değişim gösterdiği, bu nedenle siklusun herhangi bir gününde bir kez alınan kan örneği ile AMH seviyesinin doğru bir şekilde belirlenebileceği bildirilmektedir (Mossa ve Ireland 2019).

Sunulan çalışmada, aynı modifiye süperovulasyon protokolü üzerinde iki farklı foliküler dalga senkronizasyon yöntemi (GnRH enjeksiyonu ve folikül aspirasyonu) kullanılmasının, elde edilen embriyo sayı ve kaliteleri üzerine etkilerini belirlemek ayrıca süperstimülasyon uygulamalarının antimüllerian hormon (AMH) seviyeleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oogenezis ve Folikülogenezis

Oogenezis, dişi primordiyal germ hücresinin büyüme ve farklılaşmasına yol açan fizyolojik süreci, folikülogenezis de foliküllerin oluşması anlamına gelir. Primordiyal foliküller ile başlar, gelişme olgun folikül (Graaf folikülü ya da preovulatör) aşamasına kadar meydana gelebilir (Hafez ve Hafez 2000; Collado-Fernandez ve ark. 2012). Folikülogenezis sırasında oositte birçok morfolojik ve hücrenel olaylar meydana gelir. Bu süreç sırasında oosit gelişimsel yeterliliğini tamamlayarak döllenme ve embriyo aşamasına kadar gelebilecek olgunluğa ulaşır (Walker ve Biase 2020).

Uterus ortamında, fetal gelişim aşamasında iken primordiyal germ hücreleri oluşur. Bu hücreler vitellüs kesesinden gonadal çıkıntıya göç eder. Burada arka arkaya mitotik bölünmeler geçirerek oogoniuma dönüşür. Bu aşamada mezonefrozdaki somatik hücreler oogonyaları çevreleyerek kortikal kord adı verilen kordon benzeri bir yapı oluşturur. Bundan sonra primordiyal foliküller oluşur. Dolayısıyla reproduktif yaşam boyunca kullanılacak oosit popülasyonunun bileşimi için mitotik çoğalma vazgeçilmezdir (Seneda ve ark. 2023).

Yetişkinlikte kullanım için sınırlı sayıda oosit vardır. Oogonyumların üretimi ve apoptozis arasındaki dengeyi memelilerin reproduktif yaşamlarındaki bu aralığın varlığı belirlemektedir (Aitken ve ark. 2011). Art arda mitotik bölünmeler sonrası oogonyumlar farklılaşmış oositlere dönüşür. Mayoz bölünme süreci başlar. Mayoz 1'in profaz aşamasının diploten safhasında bu bölünme durur. Bu safhaya kadarki gelişme ve bölünmeler doğumdan kısa bir süre önce gerçekleşmekte ve pubertaya kadar ovaryumlar üzerindeki tüm foliküller içlerindeki primer oositlerle birlikte bu bölünme aşamasında beklemelerini sürdürmektedirler (Sönmez 2016; Seneda ve ark. 2023). Ovulasyondan hemen önceye kadar primer ya da olgunlaşmamış oositin mayoz bölünmenin profaz 1 aşamasındaki beklemesi sürmektedir. Mayoz süreci FSH ve LH'ya yanıt olarak yeniden başlar. Daha sonra mayozun diğer aşamaları olan metefaz 1, anafaz 1 ve telefaz 1 meydana gelir. İlk polar cisimcik atılarak mayoz 1 tamamlanmış ve sekonder oosit oluşmuş olur. Ruminantlarda oositin ilk olgunlaşma bölünmesi ovulasyondan kısa bir süre önce tamamlanır ve hücre sekonder oosit olarak ovule olur. Haploid (n) kromozoma sahip sekonder oositin hücrenel bölünmesi mayoz

2'nin metafaz 2 aşamasında yeniden durur. Bu şekilde ovule olup ovidukta hareket eden oosit eğer fertilize olursa ikinci polar cisimcik de atılarak 2. olgunlaşma bölünmesini tamamlamış olur. Yani oogenesisin son aşaması fertilizasyonla tamamlanır. Son olarak hem folikülogenezis hem de oogenezis süreci, dölllenme yeteneğine sahip bir dişi gamet hücreninin oluşmasını temin eder. Folikülogenezis sürecinin sonu olgun folikülün ovulasyon zamanında meydana gelirken oogenezis sonu sadece fertilizasyondan sonra son bulur (Hafez ve Hafez 2000; Sönmez 2016; Seneda ve ark. 2023).

2.2. Ovaryum Folikül Popülasyonu

Ovaryum rezervi sığırlarda primordiyal foliküllerin toplam sayısı olarak ifade edilmekte ve ovaryum rezervi ile fertilité, gebelik oranları arasında önemli oranda ilişki olduğu bildirilmektedir (Mossa ve ark. 2012; Ribeiro ve ark. 2014). Ovaryumların folikül rezervi bireysel olarak tür, ırk, genetik, yaş, hormon seviyeleri ve reproduktif duruma göre değişebilir. Dişi sığırların ovaryum folikül popülasyonunun doğumda yaklaşık 235 000 olduğu ve her ovaryumda 0-720 000 arasında olduğu bildirilmektedir (Betteridge ve ark. 1989). Diğer türlerdeki preantral folikül rezervleri yaklaşık olarak koyunlarda 160 000, kısrakta 30 000-150 000 ve kadınlarda 2000 000 olduğu bildirilmektedir (Seneda ve ark. 2023).

2.3. Ovaryum Folikülleri

Ovaryum, foliküler büyüme ve gelişmenin aynı anda olması gibi çeşitli olayları içeren dinamik bir yapıya sahiptir. Foliküllerde granüloza hücreleriyle çevrili bir oosit ile ovaryumların morfo-fonksiyonel birimi olarak kabul edilen teka hücreleri de bulunur. Foliküller endokrin (steroid hormon üretimi ve salınımı, diğer peptidler) ve ekzokrin yani bir oositin canlılığını devam ettirebilmesi için gerekli elementleri kendisinin ürettiği, gametojenik fonksiyona sahiptir. Bu sayede foliküller olgunlaşmamış oositin büyüme ve maturasyonu için ideal bir ortam sağlar ve olgun oositin ovulasyona ulaşmasına da imkân sağlar (Gonzalez ve ark. 2017).

Ovaryum folikül rezervi, preantral ya da non-kaviteli foliküller (primordiyal, primer ve sekonder foliküller) ve antral ya da kaviteli foliküllerden (tersiyer ve preovulatör

foliküller) oluşmaktadır. Ovaryum folikül popülasyonunun da yaklaşık %90'ı preantral foliküllerden oluşmakta ve bunlar devamlı olarak ovaryumlardaki antral foliküllerin yenilenmesini teşvik etmektedirler (Sutton ve ark. 2003). Bununla birlikte preantral foliküllerin yaklaşık %99,9'u preovulatör foliküllere dönüşemez, atreziya olarak adlandırılan bu foliküllerin dejenerasyonu ile karakterize olan bir sürece uğramaktadırlar. Yetişkinlikte yeni foliküller oluşmadığı için ovaryumlar çok düşük üretkenliğe sahip organlar olarak kabul edilmekte ve dişi memelilerin foliküler rezervlerinin sınırlı olduğu bildirilmektedir (Griffin ve ark. 2006).

2.3.1. Primordiyal Foliküller

Primordiyal foliküller fetal yaşam sırasında oositi pre-granüler hücreler olarak bilinen tek katmanlı düz somatik hücrelerin çevrelemesiyle oluşur. Oluşan ilk ve en ilkel foliküler aşamadır. Daha sonra pre-granüloza hücrelerin çoğalması durgunlaşır ve primordiyal foliküller uyku dönemine girer. Hücre çoğalması sadece uyku halindeki primordiyal foliküllerin büyümeye başlamasından sonra devam eder. Bunun oluşumu aylar-yıllar arasında bir dönemde gerçekleşir. Ovaryumlardaki oositlerin çoğu primordiyal foliküllerde depolanmıştır. Bu aşamada çok sayıda folikül dejenere olmuştur. Kalan foliküller ovaryum foliküler havuzu oluşturacaktır. Düzenli sayıda foliküller foliküler havuza dahil olmaya tüm reproduktif yaşam boyunca devam edecektir. Foliküllerin folikül havuzuna girme ve aktivasyonu tam olarak anlaşılmamıştır. Sığır primordiyal foliküllerinin preovulatör aşamaya kadar gelişmesinin yaklaşık 100 gün kadar sürdüğü bildirilmektedir (Seneda ve ark. 2023).

2.3.2. Primer Foliküller

Primordiyal foliküllerin büyüme süreci için seçilmeleri sonrası ilk büyüme aşaması başlar. Granüloza hücrelerinin sayıca artması ve yassı olan şeklinin kübik şekil almasıyla primordiyal foliküller primer foliküle dönüşmüş olur. İkinci büyüme aşamasının başlamasıyla birlikte granüloza hücrelerinin sayısında ekstrasdan artış meydana gelir ve foliküller en az 40 granüloza hücresine ulaştığında oosit büyümeye başlar, çapı artar buda zona pellusidanın şekillenmesini uyarır. Zona pellusida, granüloza hücrelerinden oositin ve diğer hücrelerin ayrılmasına imkân tanır. Oosit sadece gerekli olgunlaşma sürecinden

geçmekte, büyüklüğü önemli derecede değişmemektedir (Aerts ve Bols 2010; Cox ve Takov 2020).

2.3.3. Sekonder Foliküller

Sekonder foliküller daha büyük bir oosit, iyi gelişmiş bir zona pellusida, ilk teka hücreleri ve iki veya daha fazla granüloza hücre tabakasına sahip olmaları şeklinde tanımlanmaktadır. Sekonder folikül oluşumu sırasında, activin-A, EGF (epidermal growth factor), ve BMP-15 (bone morphogenetic protein 15) gibi bazı markırlar bildirilmiştir. Bu aşamanın sonunda FSH ve LH'nın oynadığı önemli roller tespit edilebilir. Oosit ve granüloza hücreleri arasındaki etkileşim, sekonder folikül ve sonraki aşamalarda GAP junction vasıtasıyla yapılmaktadır (Seneda ve ark. 2023).

2.3.4. Antral Foliküller

Antral ya da kaviteli foliküller, tersiyer ve graaf foliküllerinden oluşur. Aynı zamanda olgun, preovulatör ve dominant foliküller olarak da adlandırılmaktadırlar. Foliküller gelişip büyüdükçe çok katlı folikül epitelleri arasında yer yer erimeler meydana gelir. Bunun neticesinde folikül içerisinde boşluklar oluşmaya başlar. Bu aşamadaki foliküllere tersiyer folikül adı verilir. Bir tersiyer folikül, zona pellusida, birçok granüloza hücre tabakası, küçük antral kavite, basal membran ve iki tabakalı teka hücre katmanı tarafından çevrilmiş bir oositten oluşmaktadır (Sönmez 2016; Seneda ve ark. 2023). Graaf folikülleri, foliküler gelişmenin son aşaması, en gelişmiş ve patlamaya hazır foliküllerdir (Sönmez 2016).

2.4. Antral Folikül Sayısı (AFS)

Sığırlarda primordiyalden ovulatör aşamaya folikül gelişiminin 4-6 ay sürdüğü tahmin edilmektedir (Mihm ve ark. 2002; Fair 2003). Antral foliküller, serum benzeri foliküler sıvı ile dolu olan bir antrum ile karakterize olan ve yaklaşık olarak 2-3 mm çapa ulaştıklarında ultrasonografi ile tespit edilebilen foliküllerdir. Sığırlarda her östrus siklusunda FSH ile indüklenmiş iki ya da üç dalgalı olan foliküler dalgalar bu sayede tespit

edilmektedirler. Sığırlarda foliküler dalga başına alınan ≤ 3 mm çaptaki antral folikül sayısının, bireysel olarak son derece değişkenlik (8-54) gösterdiği fakat aynı hayvanlarda, aynı ya da ardışık sikluslarda son derece tekrarlanabilir olduğu bildirilmiştir (Burns ve ark. 2005). Antral folikül sayısının tekrarlanabilirliği laktasyondaki sütçü ineklerde foliküler büyümenin bilinmeyen aşaması ve foliküler dalga çıkma gününde (Gobikrushanth ve ark. 2017), Bos taurus, Bos indicus ve etçi sığırlarda puberteden yıllık yaşına (Morotti ve ark. 2017), Hereford ve Braford düvelerde, süttten kesimden tohumlama öncesi yaşa kadar (Santa Cruz ve ark. 2018) yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Bos taurus (Avrupa kökenli kültür ırkları) ırkı ineklerde, antral folikül sayısı ile ovaryum rezervi arasında direkt ilişki olduğu belirtilmektedir. Antral folikül sayısı üzerine gebelik, beslenme, genetik, ortam şartları ve sağlık durumu gibi çok sayıda etmenin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Ireland ve ark. 2011; Evans ve ark. 2012).

2.4.1. Ovaryum Rezervinin Oluşması Üzerine Prenatal Yaşam Sırasındaki Şartların ve Genetiğin Etkisi

Fötal yaşam sırasında karşılaşılan şartlar ovaryum folikül sayısını etkileyebilmektedir. Prenatal hayatın özellikle ilk üçte birlik kısmındaki maternal beslenme, sıcaklık stresi ve laktasyon gibi faktörlerin etkisi çalışmalarla ortaya konmuştur.

Mossa ve ark. (2013) gebeliğin erken dönemindeki dişiyi yetersiz enerji kaynağı ile beslemenin sığır ovaryum rezerv gelişimini olumsuz olarak etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Sütçü sığırlarda fötal ovaryumların en yüksek germ hücrelere sahip olduğu fötal yaşamın ilk üçte birlik kısmında yüksek ortam sıcaklığına maruz kalmanın ovaryum rezervinin oluşması ile negatif ilişkili olduğu belirtilmektedir (Succu ve ark. 2020). Maternal laktasyon durumunun ovaryum rezerv oluşumu üzerine etkisinin olmadığı bildirilmekte ayrıca düvelerin ortalama 15 aylık yaşta gebe kalmaları nedeniyle olgun ağırlıklarının ancak %55-60'ına ulaşabildiği, gebelikleri sırasında fetusla birlikte büyümeye devam ettikleri için besin ihtiyacında nispeten fetusla rekabete girdiği ve bu durumun yavrunun ovaryum folikül rezervini bozabildiği ifade edilmiştir (Scholl ve ark. 1994; Mossa ve ark. 2013; Succu ve ark. 2020).

Sütçü ve etçi ineklerde üreme ile ilgili çoğu özelliğin düşük derecede kalıtsal olduğu bildirilmektedir (Berry ve ark. 2014). Oysa Walsh ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada sütçü inek ve düvelerde AFS (antral folikül sayısı)'nin kalıtsallığını orta düzey genetik özellik olarak bulmuşlardır. Daha sonraki çalışmalarda da anti müllerian hormon (AMH) pedigrî bazlı kalıtsallık ve AMH genomik kalıtsallık tahmin çalışmaları yapılmıştır (Nawaz ve ark. 2018; Gobikrushanth ve ark. 2018). Bu tahminler dışı sığırdaki herhangi bir üreme ile ilişkili özellik bakımından en yüksek bulunmuştur. Bu nedenle genomik seleksiyonun, sütçü sığırlarda ovaryum rezervinin büyüklüğünü artırmada kullanılabileceği bildirilmektedir (Berry ve ark. 2014).

2.4.2. AFS ve AMH Konsantrasyonu

Dişilerde AMH ağırlıklı olarak büyüyen ovaryum foliküllerinin sağlıklı granüloza hücreleri tarafından üretildiğinden kadınlarda, sığırlarda, keçi ve koyunlarda ovaryum rezerv büyüklüğünün bir markırı olarak periferik AMH konsantrasyonunun kullanılabileceği bildirilmiştir (Bézar ve ark. 1987; La Marca ve ark. 2006; Monniaux ve ark. 2012). AMH primordiyal ve atretik foliküllerden üretilmemektedir. Foliküller gelişim için uyarıldığında üretilmeye başlamakta, preantral ve küçük antral aşamada pik yapmakta, FSH uyarımı altında seçilmiş folikül preovulatör aşamaya doğru büyüdükçe foliküllerin AMH sentezi azalmaktadır (Monniaux ve ark. 2008; Veiga-Lopez ve ark. 2012). Ayrıca sığırlarda AMH serum seviyesi ile antral folikül sayısı arasında yüksek düzeyde pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle sığırlarda AMH konsantrasyonu ve AFS'nin, toplam sağlıklı oosit büyüklüğünü tahmin etmede kullanılabilecek indikatör olduğu belirtilmiştir (Ireland ve ark. 2008; Monniaux ve ark. 2014).

2.5. Anti-Müllerian Hormon (AMH)

AMH ilk kez 1953 yılında Alfred Jost tarafından keşfedilmiş, Picon tarafından tanımlanmış, daha sonra sığır fetüs testis doku sıvısının inkübasyonundan saflaştırılmıştır (Umer ve ark. 2019). AMH fetal yaşamın sonlarında dişilerin (kadın, sığır, koyun) granüloza hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) familyasının bir üyesi olan AMH aynı zamanda Müllerian inhibe edici madde (MIS) olarak da adlandırılmaktadır. AMH dimerik glikoprotein yapıda, 140 kDa moleküler ağırlıkta ve

yarılanma ömrü 1,5 gün olan bir hormondur (Cate ve ark. 1986; Josso ve Di Clemente 2003; Claes ve ark. 2013).

Erkeklerde AMH, testiküler farklılaşmanın başlangıcından puberteye kadar sertoli hücreleri tarafından üretilmektedir ve müller kanallarının uterus, ovidukt ve vajinanın üst parçasının gerilemesinden sorumludur. Erkeklerde serum AMH düzeyi, puberta öncesi testis işlevi için önemli bir markıdır. Hermofroditizm durumlarını araştırmada da kullanılmaktadır (Arouche ve ark. 2015).

Anti Müllarian Hormon dişilerde, folikülogenezisin başlangıcından menopoza kadar büyüyen foliküllerin granüloza hücrelerinden sentezlenmektedir (Weenen ve ark. 2004). AMH ekspirasyonu, primordiyal foliküllerin foliküler dalga için aktivasyonundan başlayarak, primer ve sekonder foliküllerde pik seviyeye çıkmakta, dominant folikül seçildikten sonra azalmakta, atretik ve primordiyal foliküllerde üretilmemektedir (Umer ve ark. 2019).

AMH'nın büyüyen folikül havuzuna aşırı sayıda primordiyal folikülün girmesini engellemeyle, ovaryum folikül rezervinin erken tükenmesini önlediği ve preantral ve küçük antral foliküllerin FSH'ya duyarlılığını azaltmasıyla da foliküler gelişmeyi düzenlediği bildirilmektedir (Dewailly ve ark. 2014; Mossa ve ark. 2017; Umer ve ark. 2019).

Yapılan çalışmalarda, dolaşımdaki kan AMH konsantrasyonunun fertilité ile bağlantılı olan AFS popülasyon büyüklüğünün güvenilir bir endokrin belirteci olduğu ortaya konmuştur (Monniaux ve ark. 2012; Souza ve ark. 2015). Serumdaki AMH düzeyinin tek bir ölçümü ile sığırlarda ovaryum folikül rezervinin büyüklüğü tespit edilebilmektedir. Ayrıca AMH düzeyinin, süperovulasyon yanıtı, toplam elde edilen embriyo sayısı ile pozitif ilişkili olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur (Souza ve ark. 2015; Abdel Aziz ve ark. 2017; Nabenishi ve ark. 2017).

2.5.1. AMH'ın Tekrarlanabilirliği

Sığırlarda dolaşımdaki AMH düzeyleri östrus döngüsü içerisinde çok az değişim göstermektedir. Düvelerde ve sütçü ineklerde; aynı östrus siklusunda, iki ayrı siklusun farklı günlerinde (Ireland ve ark. 2008; Rico ve ark. 2009), doğal ve senkronize östrus

döngülerinde (Pfeiffer ve ark. 2014) AMH konsantrasyonundaki günden güne değişimin minimal düzeyde kaldığı bildirilmektedir.

Ireland ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada, 23 adet etçi düveden ovulasyondan 4 gün önce ve 4 gün sonra olacak şekilde toplam 8 gün, AMH konsantrasyonunun tespiti ve değişiminin takibi amacıyla kan numunesi alınmış ve sonuçta alındığı östrus siklus gününe bakılmaksızın aynı bireydeki tek bir AMH ölçümünün sekiz günlük genel ortalama ile yüksek düzeyde ($r^2=0.97$) ilişkili olduğu gösterilmiştir. Benzer çalışma 12 aylık sütçü düvelerde yapılmış, birinci kan örneği östrus siklusunun rastgele bir gününde yapılan birinci PG (prostaglandin) enjeksiyonunun hemen ardından, ikincisi 11 gün sonra ikinci PG enjeksiyonundan önce ve son kan alımı da ikinci PG'den 4 gün sonra yapılmış, sonuç olarak bir östrus siklusunun rastgele bir günündeki tek bir AMH ölçümünün, üç günlük AMH ölçüm ortalaması ile son derece ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Ireland ve ark. 2011).

Sütçü ineklerde antral folikül sayısı ve anti müllerian hormonun, foliküler büyümenin bilinmeyen aşaması ile muhtemel foliküler dalga çıkma zamanlarında tekrarlanabilirliği üzerine yapılan bir çalışmada; hem antral folikül sayısının hem de AMH'nin foliküler büyümenin bilinmeyen aşaması ile muhtemel foliküler dalga çıkma gününde tekrarlanabilir olduğu, eğer sütçü inekler foliküler büyümenin bilinmeyen aşamasında taranırsa, AMH'nin periferik konsantrasyonunun reproduktif sonuçlar ile ilişkiyi test etmek için antral folikül sayısından daha uygun bir fenotipik belirteç olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca antral folikül sayısı ve AMH foliküler aşamaya bakılmaksızın orta derecede ilişkilendirilmiştir (Gobikrushanth ve ark. 2017).

Yapılan bir başka çalışmada, düzenli östrus siklusu gösteren 60 baş 11-13 aylık Holştayn düvelerden siklusun rastgele bir gününde (0. gün) kan alınmış ardından 7, 14 ve 28. günlerde de kan alınarak AMH ölçümleri yapılmıştır. Yapılan bu ölçümler sonucunda, ölçüm günlerindeki AMH düzeyleri arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (Koca ve ark. 2023).

Tüm bu bulgular sığırlarda siklusun herhangi bir gününde tek bir kez alınan kan örneği ile AMH konsantrasyonlarının güvenilir bir şekilde belirlenebileceğini göstermektedir (Mossa ve Ireland 2019). Fakat yaş ilerledikçe ya da antral folikül havuzu azaldıkça serum AMH seviyeleri de azalmaktadır. Hirayama ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada, Japanese

Black ırkı 10 ineğe yaklaşık iki ay arayla 6-10 kez süperovulasyon uygulandığında AMH konsantrasyonlarının üçüncü uygulamadan sonra önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir.

2.5.2. Sığırlarda Kan AMH Düzeyleri

Sığırlarda kan AMH düzeyleri ölçüldüğünde reproduktif dönemler içerisinde bireysel olarak küçük değişimler göstermesine rağmen, farklı bireyler arasında ise önemli derecede değişim gösterdiği bildirilmektedir. 457 Holştayn, 185 jersey ve 621 Holştayn-jersey melezi toplamda 1263 baş laktasyondaki sütçü ineklerin dahil edildiği bir çalışmada; plazma AMH konsantrasyonunun 10-3198 pg/ml arasında değiştiği, örnekler sınıflandırıldığında en düşük % 20'lik AMH düzeyinin 10-140 pg/ml aralığında ve ortalamasının 85 pg/ml olduğu, orta düzey AMH konsantrasyonuna sahip olan %60'lık kısımdakilerin 141-450 pg/ml aralığında ve 263 pg/ml ortalamaya ve en yüksek %20'lik dilimdeki olanların AMH düzeyleri de 451-3198 pg/ml ve ortalamaları da 631 pg/ml olarak tespit edilmiştir (Riberio ve ark. 2014).

Carter ve ark. (2016) farklı sığır ırklarının AMH düzeylerini belirledikleri bir çalışmada Zebu, Avrupa ırkı (Bos taurus) ve melez (Zebu-taurus) ırk sığırların ortalama AMH konsantrasyonlarını sırasıyla; 0.77 ± 0.09 ng/ml, 0.33 ± 0.24 ng/ml ve 0.63 ± 0.07 ng/ml olarak bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada 105 baş Holştayn ırkı 12-15 aylık düvelerin, iki yıllık bir periyotta üç farklı dönemde; siklik düve, doğum yaptıktan sonraki 5-20. günler arası (fresh) ve postpartum 45-60. günler aralığında (siklusta ve tohumlama öncesi) AMH düzeylerinin değişimi incelenmiş sonuç olarak, üç zaman noktasındaki ortalama AMH konsantrasyonlarının düve iken: 313 pg/ml, fresh dönemde: 160 pg/ml ve postpartum tohumlama öncesi dönem: 183 pg/ml olarak ölçülmüştür. Siklik düvelerin dolaşımdaki AMH düzeyinin, ilk laktasyondaki hayvanlar ve yetişkin hayvanların AMH konsantrasyonunun son derece önemli belirteci olduğu ifade edilmiştir. Buzağılama sonrası AMH seviyesi biraz düşmektedir. Fresh dönemde düşük AMH kategorisindeki hayvanlar düşük kategoride kalmasına rağmen orta ve yüksek gruptakilerin bir kısmı geçici olarak düşük kategoriye düşebilmektedir. Bu nedenle plazma-serum örneklerinin hemen buzağılama sonrası dönemde alınmasının hayvanların gerçek AMH kategorilerinin belirteci olmayabileceği ifade edilmektedir. AMH değerlerinin sürüden sürüye büyük değişim göstermesinden dolayı

AMH konsantrasyonları sürünün kendi içerisinde kategorize edilmelidir (Alward, Kayla ve ark. 2021).

2.5.3. Östrus Siklusu Boyunca Plazma AMH Konsantrasyonundaki Değişim

İnsanlarda, ovaryum östrus döngüsü sırasında AMH endokrin seviyelerini gösteren sonuçlar tutarlı değildir. Bazı çalışmalar menstrual siklus boyunca AMH düzeyinde önemli düzeyde dalgalanma olmadığını söylerken (Hehenkamp ve ark. 2006; La Marca ve ark. 2006; Streuli ve ark. 2008) diğerleri, özellikle ortalama yüksek AMH düzeylerine sahip genç kadınların foliküler faz sırasında en yüksek AMH konsantrasyonuna sahip olduklarını bildirmişlerdir (Wunder ve ark. 2008; Sowers ve ark. 2010).

Etçi düvelerde AMH konsantrasyonunun, ovulasyondan 4 gün önce ile ovulasyondan 4 gün sonraya dayanan bir zaman diliminde oldukça statik olduğu ifade edilmektedir (Ireland ve ark. 2008, 2011). Buna karşılık Rico ve ark. (2011)'nin yaptıkları çalışmada, sütçü ineklerde AMH'nin östrus siklusu sırasında belirli bir dinamik profil sergilediğini, östrustan sonra AMH konsantrasyonunda bir azalış olduğunu, siklisun 4-9 günleri arası minimal değerlere ulaşan, sonraki östrusa kadar yavaş bir artışın olduğunu, bu durumun özellikle yüksek ortalama AMH konsantrasyonuna sahip olanlarda bariz olduğu ve bu sonuçların insanlardaki verilerle (Wunder ve ark. 2008; Sowers ve ark. 2010) uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda yüksek AMH üreten folikül popülasyonundaki atreziya oranında meydana gelen değişimlerin AMH düzeyinde görülen değişimlerle bağlantısı bilinmemektedir. İlginç bir şekilde yüksek FSH konsantrasyonunun, in vitro sığır granuloza hücreleri tarafından üretilen AMH'yı azalttığı gösterilmiştir (Rico ve ark. 2011; Scheetz ve ark. 2012).

Sığırlarda, östrusta pre ve perioovulatr FSH salınımına yanıt olarak östrustan sonraki günler de AMH'nin endokrin seviyelerindeki azalmanın bu iki art arda FSH salınmasından kaynaklanan yüksek plazma FSH konsantrasyonunun, yüksek AMH üreten foliküller olan küçük antral foliküllerin granuloza hücreleri tarafından AMH üretimini azaltabileceği sonucu çıkarılmıştır (Monniaux ve ark. 2012).

2.5.4. Sığırlarda Süperovulasyon Yanıtı ile AMH Konsantrasyonu Arasındaki İlişki

Donör inekler arasında süperovulasyon yanıtı ve iyi kalite embriyo sayılarındaki değişkenlik sığır embriyo transfer çalışmalarında bir sorun teşkil etmektedir. Bu değişkenlik süperovulasyon uygulamalarının başlangıcında, folikül rezerv büyüklüğündeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Flush yapılan hayvan başına transfer edilebilir embriyo sayıları, büyük folikül rezervine sahip donörlerde, düşük rezerve sahip olanlardan fazla olmaktadır (Abdel Aziz ve ark. 2017). Ayrıca sığırlarda ovaryum antral folikül sayıları, süperovulasyon yanıtı (Kawamata 1994; Ireland ve ark. 2007), in vitro blastosist üretimi (Taneja ve ark. 2000; Pontes ve ark. 2009), fertilitite ve uzun sürü ömrü gibi fertilitenin dolaylı birçok parametreleri ile pozitif ilişkilidir (Oliveira ve ark. 2002; Mossa ve ark. 2012).

Sığırlarda ultrasonografi ile belirlenmiş antral folikül rezerv büyüklüğü ile süperovulasyon cevabı ilişkilidir (Singh ve ark. 2004; Ireland ve ark. 2007). Fakat saha koşullarında kullanılan ultrasonun tipi, operatör deneyimi, antral foliküllerin tespit edildiği östrus günü gibi kayda değer değişkenler mevcuttur (Singh ve ark. 2004; Monniaux ve ark. 2010). Bu nedenle donör hayvanların seçiminde güvenli ve başarılı serum markır düzeylerinin belirlenmesi gibi laboratuvar yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Sığırlarda dolaşımdaki AMH konsantrasyonunun ovaryum folikül rezervi için en bilgilendirici serum markır olduğu bildirilmektedir (Nelson 2013).

Abdel Aziz ve ark. (2017) Holştayn sağmal inekler kullanılarak, süperovulasyon öncesi ölçülen dolaşımdaki AMH konsantrasyonu ile süperovulasyon yanıtı arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, önce AMH düzeylerine göre hayvanları dört gruba ayırmışlar (Q1, Q2, Q3 ve Q4) sonra da gruplardaki AMH düzeylerine göre Holştayn ineklerin süperovulasyon yanıtlarına bakmışlardır. Özellikle AMH düzeyi yüksek olan (Q4) grubundan elde edilen transfer edilebilir embriyo sayısı ve 1.kalite embriyo sayısının, AMH seviyesi düşük olan (Q1) gruba göre iki kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, Holştayn ineklerde süperovulasyon programlarına başlamadan önce, donör ineklerin sirkülasyondaki AMH düzeylerini belirlemenin, yüksek süperovulasyon yanıtına sahip ineklerin tespit edilmesinde kullanılabileceği böylece transfer edilebilir embriyo sayısını geliştirmek için uygulayıcılara olanak sağlayabileceği ve üretilmiş embriyo başına maliyetleri azaltabileceği ortaya konmuştur.

Dolaşımdaki kan AMH konsantrasyon seviyelerine göre süperovulasyon yanıtlarının karşılaştırıldığı ve 72 Holştayn ineğin kullanıldığı bir çalışmada, AMH düzeylerine göre dört grup oluşturularak süperovulasyon yanıtları karşılaştırılmış, süperovulatör yanıt bakımından AMH grupları arasında önemli düzeyde farklılıklar tespit edilmiştir. Q1 (44.9 pg/ml) ve Q4 (243.1 pg/ml) arasında AMH konsantrasyonu bakımından 5 kattan fazla farklılık varken, CL (korpus luteum) sayıları Q1 (12) ve Q4 (25.6) arasında 2 kattan fazla, elde edilen toplam ova-embriyo sayıları Q4 (14) ile Q1 (5) karşılaştırıldığında neredeyse 3 kat fark olduğu ayrıca transfer edilebilir ve dondurulabilir embriyo sayılarının da Q4'te Q1'den daha fazla iken, Q2 ve Q3'te orta düzeyli bulunmuştur. Ayrıca süperovulasyona yanıtta 15 CL'den daha fazlasına sahip olan inekler için eşik noktası 123.5 pg/ml olarak belirtilmiştir (Souza ve ark. 2015).

Japanese Black sığırlarda, plazmadaki AMH hormon konsantrasyonunun uzun dönemli değişimi ve süperovulatör yanıt ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada; 13 adet Japanese Black dişi buzağıdan 2 aylıktan itibaren kan alınarak plazma AMH düzeylerindeki değişim incelenmiş, 2 aylıktan 7. aya kadar devamlı bir artış (istatistiksel olarak fark yok), 8. aydan 11. aya kadar azaldığı ve yaklaşık 11. ayda sabitlendiği görülmüştür. Japanese Black sığırlar yaklaşık olarak 13. ayda puberteye girmektedir. Bu ırklarda embriyo donör aday seçmek için en erken AHM ölçümünün 11. aydan sonra yapılması gerektiği gösterilmiştir. Bu hayvanlara 13-18. aylık yaşta süperovulasyon uygulanmış elde edilen ova-embriyo sayılarının 11 aylık yaşta ölçülen plazma AMH düzeyleri ile pozitif ilişkili olduğu, yani yüksek AMH konsantrasyonuna sahip olanlardan düşük olanlara kıyasla daha fazla sayıda oosit-embriyo elde edildiği bildirilmiştir. Aynı zamanda tekrarlı süperovulasyon uygulamalarının plazma AMH düzeyleri ve süperovulasyon yanıtları üzerine etkisinin araştırılması amacıyla ortalama 5,6 yaşındaki 10 ineğe 6-10 kez, 2 ay arayla tekrarlı süperovulasyon yapılmış, üçüncü süperovulasyon uygulamaları sonrası plazma AMH düzeylerinde önemli oranda düşüş olduğu ifade edilmiştir (Hirayama ve ark. 2017).

Sonraki süperovulasyon yanıtı ve embriyo verimini tahmin etmede AMH ve antral folikül sayısının değerlendirildiği 79 baş etçi ineğin kullanıldığı bir çalışmada, süperovulasyondan önce ovaryumlardaki 3-5 mm'lik tüm antral foliküllerin sayılmasına eş zamanlı olarak AMH için kan alınmasının ardından hayvanlar süperovulasyon protokolüne alınmış ve süperovulasyon yanıtları ile başta tespit edilen antral folikül sayısı ve plazma AMH düzeyleri arasındaki ilişkiye bakılmıştır. Sonuç olarak, AMH düzeyinin inek

ovaryumlarındaki küçük antral folikül sayısı ile pozitif ilişkili olduğu ve süperovulatör yanıtı tahmin etme ya da geliştirmek için süperovulasyon yöntemlerini ayarlama da kullanılabileceği gösterilmiştir. Süperovulasyon yanıtını geliştirmek için düşük folikül sayısına (ya da AMH) sahip olan bireylerde gonadotropin tedavi süresini uzatmak tavsiye edilirken, aynı şekilde büyük folikül sayısına (ya da AMH) sahip bireylerde ise sıklıkla zayıf embriyo kalitesi ile sonuçlanan aşırı uyarımdan kaçınmak için gonadotropin dozu ya da uygulama süresinin azaltılabileceği önerilmiştir (Center ve ark. 2018).

2.6. Sığırlarda Östrus Siklusu Sırasında Foliküler Dalgalar

Sığırlarda foliküler dalga çıkışı, başlangıçta ultrasonografi ile tespit edilen 3-4 mm çapındaki 8-41 küçük folikülün ani (2-3 gün içinde) büyümesi olarak tanımlanmaktadır (Pierson ve Ginther 1987; Savio ve ark. 1988; Ginther, Kastelic ve Knopf 1989). Büyüme oranı dalganın folikülleri arasında yaklaşık iki gün benzerdir. Sonra bir folikül büyümeye devam etmesi (dominant folikül) için seçilirken diğerleri atretik ve regrese (subordinat foliküller) olurlar. İki ve üç dalgalı östrus sikluslarında, ilk foliküler dalganın çıkışı ovulasyon günü (0. gün) ile uyumlu bir şekilde meydana gelir. İkinci dalganın çıkışı iki dalgalı sikluslarda 9 ya da 10. günlerde, üç dalgalı sikluslarda 8 ya da 9. günlerde olurken üçüncü dalga ise 15 ya da 16. günlerde ortaya çıkmaktadır. Diöstrus, gebelik gibi progesteronun etkisi altındaki ardışık dalgaların dominant folikülleri anovulatördür ve atreziya ya uğrar (Bergfelt, Kastelic ve Ginther 1991). Luteolizisin başında var olan dominant folikül ovulatör folikül haline gelir. Sonraki dalganın çıkışı, takip eden ovulasyon gününe kadar ertelenir. CL (korpus luteum)'nin regresyonu iki dalgalı sikluslarda 16. gün, üç dalgalı olanlarda 19. gün başlamaktadır (Adams ve Singh 2021).

Sığır östrus sikluslarının çoğunluğu (>%95) iki ya da üç foliküler dalgadan oluşmaktadır (Adams 1999; Jaiswal ve ark. 2009). Bos taurus'larda belli bir dalga biçimi için ırk ve yaşın özel tahmin ediciliği olmadığı görülmekte, üç dalgalıların oranında bir artış olduğu ama bu durumun düşük besleme ve sıcaklık stresi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Murphy ve ark. 1991; Badinga ve ark. 1993).

Yapılan 91 ovulasyonlar arası aralığın değerlendirildiği bir çalışmada, iki dalgalı siklusların üç dalgalı olanlardan daha kısa olduğu (19.8 ± 0.2 ve 22.5 ± 0.3 gün) ve dalga

biçimlerinin ardışık siklulardaki oranlarının %70 oranında değişmediği ve dalga biçimlerinin büyük oranda tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir (Jaiswal ve ark. 2009).

2.6.1. Folikül Havuzuna Girme, Seçilme ve Baskınlık

Her büyüme dalgası, folikül dalgasına girme, seçilme ve baskınlık dönemleri olmak üzere alt bölümlere ayrılabilir. Dalgaya dâhil olma, dolaşımdaki FSH seviyelerinin artması nedeniyle bir antral folikül grubunun apoptozdan kaçtığını ima eder. İneklerde gelişmekte olan bir grup tipik olarak 5-10 folikülden oluşmakta ama 24'e kadar folikülde içerebilmektedir (Driancourt 2001). Bir büyüme dalgası sırasında dominant folikülün gerilemesi ya da bir östrus siklusunun sonunda meydana gelen ovulasyon, dolaşımdaki FSH seviyesinde geçici bir yükselmeye sebep olur. Çoğu folikülün fizyolojik şartlar altında atretik dejenerasyon nedeniyle yok olduğu aşamada FSH erken antral foliküller için bir hayatta kalma faktörü olarak işlev görür. Sonuç olarak FSH bir sonraki büyüme dalgası için yeni bir antral folikül grubunun dalgaya dâhil olmasında esas sorumludur (Chun ve ark. 1996).

Tek ovulasyonlu (monovular) türlerde seçim ifadesi, tek bir folikülün bir foliküler dalganın diğer folikülleri üzerinde fonksiyonel ve morfolojik olarak dominant hale gelmesi olarak tanımlanmaktadır. Sığırlarda FSH'daki geçici yükseliş bazı foliküllerin LH duyarlılığı kazanması için yeterli folikül büyüklüğüne ulaşmasına imkân tanımaktadır. LH'ya yanıt verme kabiliyeti edinen folikül de FSH'sız büyümesine devam etme yeterliliği kazanmaktadır (Adams ve Singh 2021).

Dominant folikül seçimi, dalganın ilk üç günü boyunca dolaşımdaki FSH düzeyinde azalma ile ilişkili olmasına rağmen süreç başlangıcı tam olarak anlaşılmamıştır (Adams ve ark. 1993). Dalgaya giren küçük foliküller (≤ 5 mm) gelişimlerine devam etmek için dolaşımdaki artmış FSH konsantrasyonuna bağımlıdır. FSH'daki salınım sonrası düşüş karşısında, dalganın büyüyen foliküllerinin çoğu durur ve dalga çıkışının iki ile beşinci günleri arasında regresyon başlar. Aksine dominant olacak olan folikülde, hücre çoğalması ve östradiol üretimi, FSH konsantrasyonunun azalmasına rağmen devam etmekte, bu durum yüksek FSH reseptörü mRNA ekspresyonunu ve FSH bağlanma afinitesini koruyarak ortaya çıkmış gibi görünen bir yetenek olduğu, sığırlarda tek bir dominant folikülün seçimi için FSH'ya başlangıçta maruz kalmanın ve dominant folikülün FSH'dan LH'ya geçiş kabiliyetinin kritik olduğu anlaşılmaktadır (Evans ve Fortune. 1997; Gong, Campbell ve

Webb, 2020). Dominant folikül dolaşımındaki düşük FSH seviyelerine rağmen varlığını devam ettirebilir ve olgunlaşabilir. Bununla birlikte dominantlık süresince bile FSH bazal seviyeleri dominantlık için kritik öneme sahip olmaya devam etmektedir. Yapılan bir çalışmada dolaşımındaki FSH' nın azaltılmasının ineklerde DF (dominant folikül) gelişimini sekteye uğrattığı, diğer türlerde ise DF regresyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Turzillo ve Fortune 1993).

En büyük ve ikinci en büyük folikülün büyüme profilindeki farklılık, seçim sürecinin bir bildirgeci ve dalga çıkmasından sonraki 2,5 güne kadar barizdir (Adams ve ark. 1993). Dominant ve subordinat foliküller arasındaki büyüme oranında farklılık olarak tanımlanan folikül deviasyonu, Holştayn düvelerde gelecek dominant folikül ortalama 8,5 mm çapa ulaştığında, dalga çıktıktan 2,5 gün sonra meydana gelmektedir (Ginther ve ark. 2003). 8 mm eşiğinin (en büyük iki folikülün büyüme oranındaki sapma noktası) ötesinde devam eden dominant folikül gelişimi, bağımlılığın FSH'dan LH'ya geçici ile ilişkilidir (Ginther ve ark. 2000-2001). Dominant foliküllerin granüloza hücrelerinin subordinatlarla karşılaştırıldığında gelişmiş bir LH bağlama kabiliyeti edindikleri ve daha fazla LH reseptör mRNA ekspresiyonuna sahip oldukları bildirilmektedir (Bao ve Garverick 1998; Evans ve ark. 2004).

Memelilerde preovulatör LH salınımları folikülün olgunlaşması ve ovulasyonu için son derece önemlidir. Siklusun ilk dominant folikülü korpus luteum aktif olmasına rağmen genellikle ortaya çıkmaktadır. Progesteron salgılaması nedeniyle korpus luteum, LH atım sıklığını olumsuz olarak etkilemekte, orta luteal fazda düşük atım sıklığı LH' ya bağımlı olan dominant folikülde atreziya (gerileme) ile sonuçlanmaktadır. İkinci dominant folikülün dominantlık dönemi sırasındaki luteolizis, bu folikülün ovulasyonu ile sonuçlanacaktır. Ancak CL aktif kalmaya, progesteron salgılamaya devam ederse ve ardından LH baskısı ikinci dominant folikülde de regresyonuna sebep olacaktır. Dominant folikül sadece olgunlaşmayı ve sonunda ovulasyonu teşvik edecek olan foliküler dönemdeki artan LH salınım sıklığından faydalanmaktadır (Mihm ve Austin 2002).

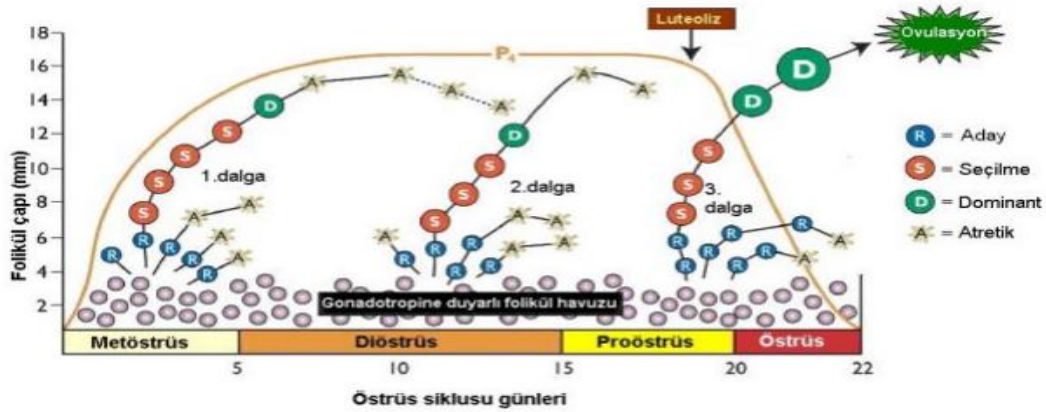
Her iki ovaryum tek bir birim olarak hareket etmektedir. Yani bir ovaryum diğerinin foliküler dalgasından bağımsız değildir. Ovaryumlar, foliküler dalga dinamiklerini düzenleyen faktörlere uyum içinde yanıt vermektedir. Bu nedenle bir foliküler dalgada her iki ovaryumda da çoklu folikül büyümesi meydana gelmektedir. Ginther ve ark. (1989)

foliküller ve CL arasındaki ovaryumlar arası ilişkiyi açıklayan çalışmalarında; dominant folikülün, subordinat ve yeni dalga çıkmasını baskılamasının lokal kanallardan ziyade sistemik yolla olduğunu, bir ovaryumda bir dominant folikülün bulunması diğer ovaryumda eşit olarak görülemeyecek bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Bu yüzden östrus siklusu boyunca birbirini izleyen dominant foliküllerin bulunduğu yerde ovaryumlar arası ilişki bulunamamış, anovulatör ve ovulatör dominant foliküllerin bulunduğu tarafın rastlantısal olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, büyük foliküle sahip ovaryumun alınması kalan diğer ovaryumdaki folikül gelişiminde artışa yol açmış fakat büyük foliküllü olmayan ovaryumun alınmasının diğer ovaryuma böyle bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Ginther ve ark. 1989).

Sütçü ineklerde tohumlama öncesi ovaryum foliküler dalgaların fertilité ile ilişkisinin araştırıldığı 106 sütçü inekle yapılan bir çalışmada; sonraki östrus ve ovulasyondan önce üç foliküler dalgalı olanların iki dalgalı olanlardan daha az oranda (%30 ve %68) olduğu fakat gebelik oranlarının üç dalgalılarda daha yüksek (%81 ve %63) olduğu ifade edilmiştir. İki foliküler dalgalı ineklerde daha büyük ve yaşlı ovulatör folikül ile daha kısa östrus siklusu, üç foliküler dalgalı olanlarda ise luteal fonksiyonun daha uzun süre ve progesteron zirve konsantrasyonunun da daha geç meydana gelmesi ayrıca iki dalgalı olanlara göre ovulatör folikül çapının daha küçük ve genç olması, gebelik başarısını etkileyen etmenler olduğu belirtilmiştir (Townson ve ark. 2002).

Sütçü ineklerde dominant folikül çapı, iki ovulasyon arası süre ve foliküler dalgalar arasındaki ilişkinin ultrasonografi ile izlendiği 22 baş Holştayn postpartum 60. gündeki ineklerin dahil edildiği bir çalışmada; ineklerin çoğunluğunun (%58) iki dalga, %31'nin de üç dalga biçimi gösterdiği sadece %10'nun bir dalga biçimi sergilediği bildirilmiştir. İki ovulasyon arası aralığın; üç dalgalı olanlarda (22.5 ± 1.75), iki (20.14 ± 2.1) ve bir (19 ± 2.5) dalgalı olanlardan daha uzun olduğu, foliküler dalga sayısı ile inter-ovulatör aralığın uzunluğunun arttığı ifade edilmektedir. Dominant folikül büyüklükleri de üç foliküler dalgalı olanlarda; 1. dalgada: 10.75 ± 1.33 mm, 2. dalgada: 9.85 mm, 3. dalgada: 9.9 mm, iki foliküler dalgalı olanlarda 1. dalga: 12.35 ± 2.24 mm, 2. dalga: 11.5 mm, bir foliküler dalgalı olanlarda ise: 13.5 mm maksimum dominant folikül çaplarının ölçüldüğü bildirilmiştir (Elkamash ve ark. 2023).

Kumar (2020) çalıştığı 18 östrus siklusundaki melez sütçü ineklerden 12'sinin (%66.7) üç foliküler dalga, kalan 6'sının (%33.3) iki foliküler dalga sergilediğini bildirmiş, CL'nin diöstrus boyunca genellikle maksimum çapa ulaşana kadar sürekli bir şekilde büyüdüğünü, luteal dominantlık döneminin belirli bir süresinde dalgalı bir seyir izlediğini ve siklusun sonuna doğru sürekli gerilemeye başladığını, üç foliküler dalgalı sikluslarda iki foliküler dalgalı olanlara göre CL'nin maksimum çapa önemli biçimde daha erken ulaşmakta olduğunu, dominantlık süresinin de önemli şekilde daha uzun olduğunu bildirmiş ve sonuç olarak; luteal dominantlık periyodunun bir östrus siklusunun foliküler dalga biçimini ve dolayısıyla sığırların fertilesini belirlediği sonucuna varılabileceğini ifade etmişlerdir.



Şekil 2.1. İneklerde Foliküler Dalga (Senger 2003)

2.6.2. Foliküler Dalga Dinamiklerinin Hormonal Kontrolü

Foliküler dinamikler konusunda yapılan ilk çalışmalar sayesinde dominant foliküllerin mevcut dalgadaki subordinatların büyümesini ve sonraki folikül dalgasının çıkışını baskıladığı ortaya konmuştur. Bu durum sığırlarda ovaryum senkronizasyonu ve süperstimülasyonu açısından yeni bir çağ açmıştır (Ginther ve ark. 1989; Bo ve ark. 1995).

Bir foliküler dalganın ortaya çıkışı ve dominant folikülün seçilimi, dolaşımdaki FSH konsantrasyonunun yükseliş ve düşüşü ile geçici ve nedensel olarak ilişkilidir (Adams ve ark. 1992). Bir foliküler dalganın ortaya çıkmasından önce hem spontan hem de uyarılmış dalgalarda plazmadaki FSH konsantrasyonlarında bir artış meydana gelmekte, her dalgadan önce gelen FSH salınımları benzer büyüklükte olmaktadır. Yani siklus ortasındaki salınımlar

genlik ve genişlik bakımından preovulatör gonadotropin salınımına benzemektedir (Adams ve ark. 1992; Sunderland ve ark. 1994). Özellikle dominant foliküldeki foliküler ürünler, FSH salınımının ve sonraki folikül dalgasının çıkışını baskılamaktan sorumludur. FSH artışına yanıt olarak ortaya çıkan folikül sayısı ile bunu takip eden FSH baskılama derecesi arasındaki doğrudan ilişki, yeni dalganın tüm foliküllerinin FSH baskılanmasına katkıda bulunduğu kanıtı olduğu ifade edilmiştir (Burns ve ark. 2005).

Östradiol, inhibin A ve inhibin B, FSH'nın baskılanmasından sorumlu başlıca foliküler ürünlerdir. İnhibin A, dalganın tüm küçük büyüyen folikülleri tarafından üretilmekte, dalganın çıkışının ilk iki günü boyunca en önemli FSH baskılayıcısı olduğu bildirilmekte, daha sonrada dominant folikülden salınan östradiolün en önemli FSH baskılayıcısı olduğu ifade edilmektedir (Ginther ve ark. 2001; Mihm ve Bleach 2003). Dolaşımdaki FSH en düşük seviyeye dalganın ortaya çıkmasından dört gün sonra ulaşılır ve seviyeler sonraki iki ila üç gün boyunca düşük kalır. Dominantlık döneminin sonunda (ovulasyon ya da orta siklusun anovulatör dominant folikülü) FSH'nın dolaşımdaki seviyesi sonraki iki gün boyunca yükselmeye başlar ve gelecek foliküler dalga çıkışından yaklaşık 12-24 saat önce en yüksek seviyeye çıkar. Eğer mevcut dominant folikül kaldırılırsa (foliküler aspirasyon) FSH'da sonraki 12 saat içinde salınım başlar ve sonraki 24 saat için de de yeni foliküler dalganın çıkması ile sonuçlanır (Bergfelt ve ark. 1994). FSH'daki yeniden yükseliş, östradiolün iki gün önce azalmasına rağmen ancak inhibin A konsantrasyonları en düşük düzeye ulaştığında olmaktadır (Bleach ve ark. 2001).

Yapılan bir çalışmada, dolaşımdaki progesteron konsantrasyonu ile dominant folikül büyümesi arasında olumsuz bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Üç dalgalı östrus sikluslarında maksimum dominant anovulatör folikül çapının dalga 1'de dalga 2'den büyük olduğu aynı şekilde düvelerde yapılan bir çalışmada da endojen + eksojen (yüksek progesteron konsantrasyonu) progesteron işlemleri düvelerde maksimum anovulatör folikül büyümesi sadece eksojen progesteron uygulananlardan daha küçük kalmıştır (Adams ve ark. 1992). Bu durum progesteronun, LH'nın salınım sıklığı üzerine negatif geri bildirim vasıtasıyla büyüme dönemindeki dominant folikülü doz-bağımlı bir şekilde baskılamakta olduğunu göstermektedir (Savio ve ark. 1993). Progesteron tedavisi FSH'yı baskılamadığı için dominant folikül üzerindeki baskılayıcı etkilere dolaşımdaki FSH'nın azalmasının etkisi olmamıştır. Foliküler büyüme sırasındaki yüksek plazma progesteronu ile daha küçük daha kısa ömürlü dominant folikül, gelecek foliküler dalgadan önce salınan FSH'nın daha erken

salınmasına ve sonraki foliküler dalga çıkışının daha hızlı olması ile sonuçlanmıştır. Düşük progesteron konsantrasyonu ise büyük bir persiste dominant folikül, FSH salınmasında gecikme ve sonraki dalga çıkışının gecikmesi ile sonuçlanmıştır (Adams ve ark. 1992).

2.6.3. Çoklu Dominantlık (co-dominant)

Eğer ovaryum üzerinde bulunan mevcut dominant folikül ortadan kaldırılırsa (folikül aspirasyonu) ya da foliküler dalga başından itibaren eksojen FSH uygulaması yapılırsa subordinat foliküller dominant hale gelebilmektedirler (Adams ve ark. 1993; Gibbons, Wiltbank ve Ginther 1997). Ovulatör dalga sırasında co-dominantlıktan kaynaklanan çift ovulasyonlar olabilmektedir. Co-dominantlık ve çift ovulasyon sıklığı düvelerde düşük ya da sıfır (Ko, J ve ark. 1991; Sartori ve ark. 2004), yüksek verimli sütçü ineklerde ise çoklu ovulasyon sıklığı %10-39 oranında bildirilmiştir (Fricke ve Wiltbank. 1999; Vasconcelos ve ark. 2001). Çoklu ovulasyon olan ineklerde tüm ovulatör foliküller aynı dalgadan çıkmaktadır. Çoklu dominant folikül gelişen ineklerde deviyasyon süreci, inhibin ve progesteronun dolaşımdaki konsantrasyonun, tek dominant folikül gelişen ineklere göre daha düşük olması ile ilgili olarak, beklenen deviyasyon zamanında ki FSH ve LH'nın dolaşımdaki yüksek düzeyi ile tutarlı olduğu ve bu durumda dalganın ikinci ve üçüncü en büyük foliküllerinin de büyümeye devam ederek çoklu dominant foliküllerin geliştiği bildirilmektedir (Lopez, Sartori ve Wiltbank 2005).

2.6.4. Luteal Dinamikler-Korpus Luteum (CL)

Östrus siklusu ardışık dört faza bölünebilir: Proöstrus; CL'nin regresyonu ve bir ovulatör folikül gelişimi, östrus; fonksiyonel bir CL'nin yokluğunda final folikül maturasyonu ve ovulasyonun meydana geldiği seksüel kabul dönemini, metöstrus; CL oluşum periyodunu ve diöstrus; CL'nin olgun ve aktif olarak progesteron ürettiği dönemdir (Peter ve ark. 2009). Proöstrus ve östrus foliküler faz, metöstrus ve diöstrus luteal faz olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda luteal fazda folikül gelişiminin olmadığı anlaşılmalı aksine foliküler dalgalar östrus siklusunun foliküler ve luteal faz dönemi boyunca çıkmaya devam etmektedir (Adams ve Singh 2021).

CL'nin östrus siklusu sırasında büyüme ve ölümü vücuttaki en hızlı dinamik süreçlerden biridir. Ovulasyon anında antral içerikler boşaltılır ve ovulatör folikül duvarı boşalmış antrum içine kıvrılarak çökmektedir. Ovule olan folikülün granüloza ve teka hücreleri daha sonra önceki folikülün antrumunun hacminin de ötesinde genişlemekte bu çarpıcı damarlanma ve luteinizasyon sonucu fonksiyonel bir CL oluşmaktadır (Sönmez 2016; Adams ve Singh 2021). Yapılan çalışmalarla plazma progesteron konsantrasyonunun CL'nin ağırlığı, hacmi, histomorfolojisi ve ultrason morfolojisi ile son derece ilişkili olduğu bildirilmiştir (Marciel, Rodriguez ve Gustafsson 1992; Singh, Pierson ve Adams 1997).

Metöstrus döneminde kan damarı içerikleri CL'nin en büyük hacim yüzdesini kapsamaktadır. Luteal hücreler progesteronun en yüksek düzeyde üretildiği orta-diöstrusta hipertrofiye uğramaktadır. CL'nin oluşum fazı döneminde luteal hücre büyüklüğünde bir artış, regresyon fazında ise azalış, progesteron salgılanması da bu duruma paralellik göstermektedir. Proöstrus fazında regrese CL'nin ağırlığında, luteal hücre hacim yoğunluğunda, kan damar içeriklerinde ve progesteron üretiminde azalma meydana gelmektedir. Proöstrusta meydana gelen bu morfolojik değişiklikler, plazma progesteron konsantrasyonunda aşamalı değişimlere neden olmakta; ovulasyondan sonraki üç günde <2 ng/ml, altı gün sonra yaklaşık 4 ng/ml ve ovulasyon sonrası 10-14. günler arası pik konsantrasyon >6 ng/ml düzeyinde olmaktadır. Luteolizisten dolayı 16. günden sonra progesteron seviyesi düşmekte, ovulasyon zamanında <0.50 ng/ml olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Adams ve ark. 1993; Kayacık ve ark. 2005).

Korpus luteumun ultrasonografi ile saptanmasının güvenilirliği ve doğruluğu ile ultrason görüntü özellikleri ve CL fonksiyonları arasındaki ilişkinin klinik düzenlemelerde ve siklus aşamasının normalliğini değerlendirmede önem arz ettiği bildirilmektedir. Yapılan bir çalışma ile CL'nin ultrasonografik tespiti ile açık anatomik ayrımı arasındaki bir karşılaştırmada; deneyimsiz operatörler %83 doğrulukla, deneyimli olanlar ise %97 düzeyinde CL değerlendirmesini doğru olarak yapmışlardır. Ayrıca büyüyen CL'ler 80 östrus siklusunun >%95'da (ovulasyon günü=0) 2. güne kadar tespit edilmiştir ve gerileyen CL'de sonraki östrus siklusuna ortalama 1.4 gün kala tespit edildiği ifade edilmektedir (Ginther 1998).

Normal bir korpus luteumun büyük bir kısmı (%40-70) gelişimleri sırasında merkezi bir sıvı dolu kaviteye sahiptirler, geri kalanlar katı yapılardır (Singh, Pierson ve Adams 1997,

2003). Korpus luteum kavitesi seröz bir transudat ile doludur. CL olgunlaştıkça merkez kavite daha küçük hale gelir genellikle bir süre sonra kaybolmaktadır. Plazma progesteron konsantrasyonları merkezi kaviteli olanlar ile olmayanlar arasında farklı bulunmamıştır (Kastelic, Bergfelt ve Ginther 1990).

2.6.5. Luteolizis

Prostaglandinlerin (PGF) ineklerde doğal luteolizis yaptığı ilk olarak 1970'lerde keşfedilmiştir (McCracken 1972; Manns ve Hafs 1976). Keşfedildiği günden beri sığırlarda östrus senkronizasyonu ve seçmeli indüksiyon uygulamalarında en yaygın olarak kullanılan tedavi aracı haline gelmiştir. Uterustan PGF'in pulsatil salınımı ovulasyondan dört ila altı gün önce başlayan luteolizisi başlatmakta olduğu bildirilmiştir (Kastelic, Knopf ve Ginther 1990). Bu konuda yapılmış ilk çalışmalarda; PGF uygulama zamanındaki CL'nin olgunluğunun luteolitik yanıtı etkilediği, PGF'in östrusun ardından 5-6 güne kadar etkili bir şekilde luteolizisi uyaramadığı, yanıt eksikliğinin olgun olmayan CL'deki PGF reseptör eksikliğinin bir sonucu olduğu düşünülmüştür (Momont ve ark. 1984). Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda ovulasyondan iki gün sonra korpus luteumda PGF reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (Wiltbank ve ark. 1995). PGF'e olgunlaşmamış CL'nin direncinin nedeni belirsizliğini korumaktadır. Fakat bazıları olgun CL'nin PGF'in endometriyal salınımını artıran ve luteolizis sürecini devam ettiren, luteal oksitosin ve tümör nekrozis faktörü içeren pozitif geri bildirim döngüsüne sahip olabileceğini bildirmişler eğer bu fikir doğru ve olgunlaşmamış CL pozitif feedback döngüsüne sahip değilse, daha sonra PGF'in çoklu enjeksiyonlarının erken aşamadaki CL'de luteolitik süreci tamamlaması beklenebilir denmiştir. Buna göre ovaryum süperstimulasyonunu içeren iki çalışmada östrustan sonraki dördüncü ya da beşinci günün sabah ve akşamında yapılan PGF enjeksiyonlarının 60 düvenin 56'sında (%93) luteolizisi ve ovulasyonu indüklediği gösterilmiştir (Nasser ve ark. 1993; Adams ve ark. 1994). Son çalışmalar, endojen LH pulslarının luteotrofik etkisi ile PGF'in pulslarının luteolitik etkisi arasında belirgin bir neden sonuç dengesi olduğunu göstermektedir. Uterustan tekrarlı PGF pulsları nihai olarak luteolizisi tamamlamak için LH'nin harekete geçirici etkisi ile sonuçlanmaktadır (Ginther ve Beg 2012).

2.6.6. Küçük Foliküler Dalga

Ovaryum folikülleri, atlarda ve sığırlarda büyük ve küçük dalgalar şeklinde gelişmektedir (Ginther ve Bergfelt 1992; Ginther ve ark. 2002). Büyük dalgalarda foliküller birkaç gün içinde büyür ve en büyük folikül atlarda yaklaşık 22 mm'ye, sığırlarda 8.5 mm'ye ulaştığında dominant ve subordinat foliküllere, deviasyon ile ayrışır (Ginther 2000). Küçük dalgalar sırasında bir dominant folikülün gelişimi ve deviasyon meydana gelmez. Kısraklarda küçük dalgalar, ovulasyon ve anovulasyon dönemi arasındaki geçiş ve gebelik arasındaki interovulasyon aralığında bildirilmiştir (Bergfelt ve Ginther 1993). Düvelerde küçük dalgalar, bariz bir şekilde bir interovulasyon aralığının sonuna yakın meydana gelmektedir (Ginther ve Bergfelt 1992).

Düvelerde ilk çalışmalarda küçük dalga 14 düveden 7'sinde, ovulasyondan ortalama 5-7 gün önce 4 mm foliküllerle ortaya çıktığı bildirilmiştir (Ginther ve ark. 2002). En büyük folikül 5-8.7 mm maksimum çapa ulaşmakta ve daha sonra regrese olmaktadır. Küçük dalganın çıkışının yedi düvenin beşinde bir FSH dalgalanması ile ilişkili olduğu belirtilmekte fakat FSH konsantrasyonundaki değişimin önemli olmadığı bildirilmektedir. Bir küçük FSH dalgalanması interovulasyon aralığının yaklaşık %50'sinde meydana gelmekte fakat küçük FSH dalgalanması ile küçük foliküler dalga arasındaki ilişki bildirilmemiştir (Ginther ve ark. 2014).

Bir dominant folikülün çapı ve dolaşımdaki FSH konsantrasyonu iki yolla yakın etkileşim içindedir. Bir FSH artışının stimülasyonundan ortaya çıkan 1. dalga; folikül yaklaşık 5 mm'ye ulaştığında salınım zirve yapmakta, 2. FSH dalgalanması da hem foliküler dalga 2'nin çıkmasını uarmakta hem de 1. dalganın dominant folikülünün final büyümesine katkı sunmaktadır (Ginther ve ark. 2013). 1. dalganın dominant folikülü 11 mm ya da daha büyük olduğunda östradiol tedavisi ile 2. FSH yükselmesinin baskılanması 1. dalganın foliküllerinin çapında azalmaya neden olmaktadır. Preovulasyon folikülünün interovulasyon aralığının sonuna yakın küçük FSH dalgalanmasına yanıt verip vermediği bilinmemektedir (Ginther ve ark. 2014).

Ginther ve ark. (2014) interovulasyon aralığının sonuna yakın meydana gelen küçük FSH dalgalanmasının, preovulasyon folikülle olan ilişkisi ve fonksiyonunun anlaşılması için yaptıkları çalışmada; 35 Holştayn düvede 12. günden (ovulasyon günü: 0) başlayıp ovulasyon sonuna kadar kandaki FSH konsantrasyonu, foliküler dalgalar ve foliküllerin

çapında meydana gelen değişimleri inceledikleri çalışmada, küçük FSH dalgalanmasının işlevinin preovulatr folikülün büyüme hızını artırmak olduğu ve küçük foliküler dalganın tesadüfi ve önemsiz olabileceği sonucuna varmışlardır.

2.7. Embriyo Transferi

Embriyo transferi (ET), donör (verici) hayvanın genital kanalından toplanan (*in vivo*) ya da laboratuvar koşullarında elde edilen embriyoların (*in vitro*), taşıyıcı hayvanlara nakledilmesi işlemidir (Sönmez 2016; Kaymaz 2019). Embriyo transfer yönteminin nihai hedefi, üstün verim özelliklerine sahip ineklerden yaşamı boyunca vereceğinin çok üstüne çıkarılarak elde edilecek yavru sayısını katlamaktır. Bu metotla bir inekten yaşamı boyunca elde edilebilecek yavru sayısının en az 5 katı miktarda yavru elde edilebilmektedir (Seidel ve Seidel 1991).

2.7.1. Embriyo Transferinin Önemi ve Gelişim Süreci

İlk başarılı embriyo nakli, 1890 yılında tavşanlar üzerinde Walter Heape tarafından gerçekleştirilmiştir. Warwick ve arkadaşları 1930 ve 1940'lı yıllarda koyun ve keçilerde kayda değer embriyo transfer çalışmaları yapmışlardır. İneklerde ilk başarılı embriyo transfer çalışması Umbaugh tarafından 1949 yılında yapılmış fakat elde ettiği dört gebelik doğumdan önce sonlanmıştır. 1951 yılında mezbaha materyalinden üretilmiş 5 günlük bir embriyonun cerrahi transferinden sonra Wisconsin de ilk embriyo transfer buzağısı doğmuştur (Betteridge 2003; Mapletoft 2018). Sığırlarda embriyo transferi (ET) uygulamaları 1960'lı yılların ortalarına kadar cerrahi yöntemle yapılmaktaydı. Japon araştırmacı Suggie tarafından 1964 yılında, cerrahi olmayan *bypass* metodu geliştirilerek başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Günümüzde *in vivo* embriyo üretimi flushing işleminde kullandığımız servikal yöntem 1965 yılında geliştirilmiş olan Suggie metodu olarak bilinmektedir (Kanagawa, Shimohira ve Saitoh 1995; Betteridge 2003).

Bizim bugün bildiğimiz sığır embriyo transfer endüstrisi 1970'lerde kuzey Amerika da çıkmıştır (Betteridge 1981, 2003). Kanada için çok değerli olan Avrupa ırklarının ithalatı uluslararası sağlık ve ticaret kısıtlamaları nedeniyle nispeten kısıtlıdır. Embriyo transferi bu ırkların sayılarını hızla çoğaltmaya imkân vermiştir. Ancak ticari kullanım için

laboratuvardan sahaya teknolojiyi alan özel veteriner hekimler ve ticari şirketler, pratikte sayısız zorluklarla karşılaştılar ve bunları açmak ve çözüm bulmak için IETS (Uluslararası Embriyo Teknoloji Derneği)'yi kurdular. IETS 1974 yılında dünya genelinden araştırmacılar, akademisyenler, veteriner hekimleri temsil eden 82 özel üye ile kuruldu (Carmichael 1980; Betteridge 1981). Günümüzde IETS embriyo transferi ve ilişkili teknolojiler alanındaki tartışmalar için bilimsel ve düzenleyici ana form haline gelmiştir. Her yıl düzenli bilimsel toplantılar yapmakta olan IETS, 2023 yılında 49. yıllık toplantısını Peru'da yapmıştır.

AETA (Amerikan Embriyo Transfer Derneği) 1982'de Amerika Birleşik Devletlerindeki ticari embriyo transfer endüstrisini birleştirmek ve organize etmek için kurulmuştur. 1984'de Kanada Embriyo Transfer Derneği (CETA), 1985'te Brezilya Embriyo Transfer Derneği (SBTE) ve Avrupa Embriyo Transfer Derneği (AETE)'de 1986 yılında kurulmuştur. Bu dernekler IETS gibi uluslararası gruplar ve yetiştirici kuruluşları, üretici gruplarıyla doğrudan bağlantılıdır. Amaçları her bir ülke içinde, uygulamada standart sağlamak ve uluslararası olarak embriyo transfer teknolojilerinden yararlanmayı güvenli hale getirmektir. Bu bağlamda bu kuruluşların sertifikasyon programları, embriyo transfer uygulayıcılarının uluslararası ticarete kullanılan embriyoların işlenmesinde, teknik ve etik açıdan yetkin olmalarını sağlamanın ayrılmaz bir parçasıdır (Mapletoft ve Hasler 2005). Aynı amaçla ülkemizde ilk olarak 2021 yılında Prof. Dr. Yavuz ÖZTÜRKLER'in öncülüğünde kurulan VEMTED (Veteriner Embriyo Teknoloji Derneği) IETS'nin de partner üyeliğini almıştır. Ülkemizde ikinci olarak 2022 yılında Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA'nın gayretiyle ETTED (Embriyo Transferi ve Teknolojileri Derneği) kurulmuş olup AETE'nin ortak dernek kuruluşu olarak kabul edilmiş bu vesileyle ülkemizde *in vivo* ve *in vitro* üretilen sığır, koyun embriyoları AETE'nin yıllık verilerinde yerini almıştır (Quinton 2023).

Genetik ilerleme 1970'lerde ticari embriyo transferinin gelişmesiyle hayvanlarda arzu edilen fenotiplerin çoğalması için en yaygın kullanılan hayvansal üretim programı olmuştur. Guelph üniversitesi 1987'de (MOET) Multiple Ovulation and Embriyo Transferi kavramını ortaya koymuştur. Guelph üniversitesi, MOET programlarının artan genetik kazançla neticelenen, artmış seleksiyon yoğunluğu ve azalmış jenerasyon aralığı ile sonuçlanabildiğini göstermiştir (Smith 1988). Çekirdek sürülerin ve düve yavrularında 'genç MOET' oluşturulması, geleneksel progeny test yöntemiyle elde edilenlerin yaklaşık iki katı genetik kazançla sonuçlandığı gösterilmiştir (Mapletoft 2013).

Embriyo transferi, en verimli inekler ve kanıtlanmış boğalardan suni tohumlama boğalarının üretilmesinde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Teepker ve Keller 1989). Ayrıca yeni genomik teknikler embriyo donörlerini ve boğalarını seçmek için artan bir şekilde kullanılmaktadır. Geleneksel progeny test ile bir boğayı test etmek 5,5 yıl sürmekteyken MOET yöntemiyle 3,5 yıla düşürmek mümkündür bu sayede jenerasyon aralığı kısaltılmış olmaktadır (Seidel 2010; Mapletoft 2013). Günümüzde ise genomik değeri yüksek olan boğalar daha genç yaşta (9-13 ay) belirlenmekte ve suni tohumlama boğası olarak kullanılmaktadır (Akther 2023).

Yapılan birkaç büyük çalışma ile *in vivo* üretilen sığır embriyolarının enfeksiyöz hastalıkları bulaştırmadığı, bu konuda IETS hastalık ajanlarını sığır embriyosu tarafından bulaşma riskine göre kategorize ederek göstermiştir (Stringfellow ve Givens 2000; Mapletoft ve Hasler 2005). Kategori 1 hastalıklar, yeterli kanıtı sahip olan hastalıkları içermekte, embriyolar toplama ve transfer sırasında uygun şekilde muamele edildiğinde bulaşma riski önemsizdir. Bu zona pellusida'nın 50x büyütmede incelenmesi ve yıkama, tripsin muamele prosedürlerini içermektedir. Kategori 1 hastalıkları arasında Enzootik Sığır Lökozu, Şap, Mavi Dil, Brucella Abortus, IBR, BSE yer almaktadır. Kategori 2, 3, 4 hastalıklar daha az araştırma bilgisiyle üretilmiş olanlardır. Sonuç olarak embriyo transferinin bir salgınla karşılaşıldığında genetiği kurtarmak için kullanılabileceği ifade edilmektedir (Wrathall ve ark. 2004).

2.7.2. Günümüzde IVD (İn vivo) ve IVP (İn vitro) Embriyo Üretimi

IETS'nin 2021 yılı verilerine göre en bariz embriyo üretim artışı sığırlarda olmuştur. 2020 yılı ile kıyaslandığında %31.5 oranında bir artış (1,156,422'den 1,521,018'e) ile 1,5 milyonun üzerinde *in vitro* üretilmiş (IVP) embriyo kaydedilmiştir. Aynı zamanda 2020 ile kıyaslandığında IVD (*in vivo*) embriyo üretiminde de %6.8'lik bir artış kaydedilmiştir. Bu artış 2003'den beri Dünya toplam sığır embriyosu artışının en büyüğü olmuştur. Toplam transfer edilebilir sığır embriyolarının %79.7'si, yıllardır embriyo üretiminde üst sıralarda olan 10 ülke tarafından üretilmiştir (Viana 2022).

2022 yılında dünya genelinde dondurulmuş-çözdürülmüş IVP embriyoların transfer oranı %44.2 ile 2021 yılına (%41.3) göre biraz artmıştır. Orantısal olarak daha fazla donmuş-eritilmiş IVD embriyolar (%64.8), IVP emsallerine göre (%44.2) transfer edilmiştir.

Embriyo verimliliği bir önceki yıla göre nispeten sabit kalmıştır. Dünya genelinde flush başına ortalama 8.8 oosit-embriyo ile 5.7 transfer edilebilir embriyo elde edilmiştir (2021 yılında sırasıyla; 9.4 ve 5.8 idi). Ayrıca sütçü ırkların flush'ının %31.9'unda cinsiyeti belli sperma kullanılmıştır (Viana 2023).

Çizelge 2.1. Kıtalara göre sığırlarda, 2022-2018 yılları arasındaki toplam IVD (*in vivo* embriyo üretimi) ve IVP (*in vitro* embriyo üretimi) embriyo üretimi (Viana 2023)

Yıl	2022		2021		2020		2019		2018	
Kıtalar	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP
Afrika	2,027	7,377	0	5,421	2763	4977	4,413	3,645	6,651	3,741
Asya	1,764	14,733	0	0	0	0	94	0	162	0
Avrupa	137,036	43,749	134,386	42,410	126,491	47,470	124,892	62,009	141,209	61,816
Kuzey Amerika	204,682	842,064	215,745	764,650	196,704	578,995	218,929	525,078	270,187	503,718
Okyanusya	12,455	20,633	13,414	17,681	4,211	14,345	0	10,480	4,445	11,997
Güney Amerika	36,545	688,415	22,829	690,856	31,559	500,397	39,444	430,355	47,313	448,128
Toplam	394,509	1,616,971	386,374	1,521,018	361,728	1,156,422	387,769	1,031,567	469,967	1,029,400

Çizelge 2. 2. 2022 Yılı Avrupa sığır IVD (*in vivo* embriyo) embriyo üretimi (Quinton 2023)

Ülkeler	Toplam Flushing	Toplam Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı	Ortalama Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı
Avusturya	539	3.635	6.7
Belçika	665	2.429	3.7
Çek Cumhuriyeti	410	2.043	5
Danimarka	823	4.738	5.8
Finlandiya	367	2.563	7.0
Fransa	6.322	33.542	5.3
Almanya	4.310	28.190	6.5
Yunanistan	4	14	3.5
Macaristan	427	1.754	4.1
İtalya	2.257	20.206	9.0
Litvanya	2	5	2.5
Hollanda	2.466	12.879	5.2
Norveç	380	2.295	6.0
Polonya	238	1.338	5.6
Portekiz	115	524	4.6
Romanya	15	34	2.3
Rusya	1.111	5.412	4.9
Slovenya	17	28	1.6
İspanya	291	1.539	5.3
İsveç	123	655	5.3
İsviçre	441	2.910	7.1
Türkiye	315	1791	5.7
İngiltere	4.044	8.512	2.1
Toplam	25.652	137.036	5.3

AETE'nin 2023 yılındaki 39. yıllık bilimsel toplantısında ülkelere göre bildirilen 2022 yılı toplam IVD sığır embriyo sayıları çizelge 2.2. de gösterilmiştir. Ülkemizde üretilen embriyo verileri uluslararası yayınlanan istatistiklerde ilk kez yer almıştır (Quinton 2023).

2.8. Sığırlarda Süperovulasyon

Sığırlarda süperovulasyonun amacı, gebelik üretme olasılığı yüksek transfer edilebilir kalitede embriyoların sayısını en yüksek düzeye çıkarmaktır (Armstrong 1993). Süperovulasyon yanıtlarındaki ve embriyo kazanımlarındaki büyük değişkenlik ticari embriyo transfer kayıtlarında bildirilmektedir. 2048 etçi donör embriyo toplamasında ortalama 11.5 oosit/embriyo ile 6.2 transfer edilebilir embriyo kazanımı bildirilmiştir (Looney 1986). Hem süperovulasyon yanıtı hem de embriyo kalitesinde ki değişkenlik önemli düzeyde olmaktadır. Embriyo toplamalarının %24'ünde uygun embriyo elde edilememekte, %64'ü ortalama transfer edilebilir embriyo sayısından daha az vermekte,

üretileen embriyoların %70'i donörlerin %30'undan elde edilmektedir. Süperovulasyon yanıtındaki yüksek dereceli tahmin edilemezlik, embriyo transfer programlarının verimliliği ve karlılığını etkileyerek sorun yaratmaktadır (Sartori ve ark. 2009; Bó ve Mapletoft 2014; Hasler 2014).

Süperovulasyona ovaryum yanıtındaki değişkenlik, süperstimulasyon uygulamalarındaki farklılıklar ile ilişkili bulunmuştur bunlar; gonadotropinlerin grubu ve toplam dozu, süperovulasyon uygulama zamanı ve süresi, süperovulatör olmayan üreme hormonlarının birlikte kullanımınıdır. Ayrıca süperovulasyon cevabını etkileyen ve daha önemli olabilecek ilave etmenler de; hayvan ve çevre ile ilgili olanlar, mevsim, donörün besleme ile ilgili durumu, üreme geçmişi, yaş, ırk ve uygulama başlama anındaki ovaryum durumu gibi faktörler süperovulasyon uygulamalarına yanıtı değiştirmektedir. Son yıllarda sığıır üreme fizyolojisini anlamada önemli gelişmeler kaydedilmiş olmasına rağmen süperovulasyon yanıtını etkileyen donör hayvanların doğasında olan faktörler henüz iyi anlaşılmanmıştır (Jahnke ve Youngs 2021).

2.8.1. Süperovulasyon İçin Kullanılan Gonadotropinler

Süperovulasyon cevabını etkileyen etmenlere, ekzojen gonadotropinlerin elde edilmiş kaynağı, içeriği ve biyolojik aktivitesi dahil olmaktadır. Sığıırlarda süperovulasyonu uyarmada kullanılan üç farklı özellikte gonadotropin preparasyonu vardır; domuz ve diğer evcil hayvan hipofizlerinden ekstrakte edilenler (FSH), eCG (equine chorionic gonadotropini) aynı zamanda PMSG yani gebe kısrak serum gonadotropini de denmektedir ve hCG (human menopausal gonadotropin). Bunlardan insan menopoz gonadotropini (hCG) sığıırlarda herhangi bir avantaj sunmadığından ticari olarak kullanılmamaktadır (Murphy ve ark. 1984; Alkemade, Murphy ve Mapletoft 1993; Jahnke ve Youngs 2021).

2.8.1.1. FSH (Folikül Uyarıcı Hormon)

Hipofiz ekstraktları FSH içermektedir. Sığıırlarda FSH'nın biyolojik yarılanma süresinin yaklaşık beş saat olduğu ifade edilmiştir. Bu nedenle başarılı bir şekilde süperstimülasyonu uyarmak için 12 saat arayla günde iki kez enjekte edilmelidir. Klasik FSH uygulama protokollerinde dört ya da beş gün süreyle, günde iki kez 28-50 mg ham hipofiz

ekstraktı ya da 260-400 mg NIH-FSH-PI kısmen saflaştırılmış hipofiz ekstraktı dozunda kas içi enjekte edilmektedir. Uygulamanın başlangıcından 48-72 saat sonra PGF2 α luteolizisi uyarmak için yapılmakta, östrus da 36-48 saat içinde meydana gelmektedir (Bo ve ark. 2006; Mapletoft ve Bó 2012). Günümüzde domuz ve koyun hipofizlerinden ekstrakte edilen saflaştırılmış FSH, sığırların süperovulasyon protokollerinde en sık kullanılan hormondur. eCG'nin uzun yarılanma süresi (40 saat) ve yüksek LH aktivitesi uzamış ovaryum uyarımı, endokrin profillerde sapma, ovule olmamış foliküller ve embriyo kalitesini tehlikeye atma gibi bazı sorunlara sebep olmaktadır. Bu dezavantajlar nedeniyle 1970'lerin sonlarında sığırların süperovulasyonu için standart bir yaklaşım olarak eCG'nin yerini FSH almıştır. Bazı çalışmalarda düşük LH içeriğine sahip saflaştırılmış FSH'nın, süperovulasyon uygulamalarındaki yüksek LH içerikli olanlarla kıyaslandığında embriyo kalitesi için faydalı olduğu bildirilmiştir (Bo ve Mapletoft 2014). Kullanılan gonadotropinlerin özelliğine ilave olarak, protokol uygulama faktörleri de süperovulasyon sonuçları üzerine etkiye sahiptir. Standart yaklaşım FSH'nın dört-beş gün süreyle uygulanmasıdır. Fakat altı-yedi güne kadar uygulama süresini uzatmanın faydalı olduğunu bildiren çalışmalarda vardır (Guerra ve ark. 2015; Cirit ve ark. 2019).

Mikkola ve Taponen (2017) sığırlarda süperovulasyon protokollerinde kullanılan farklı LH içeriğine sahip iki ticari FSH ürünü olan Folltropin (LH:FSH oranı yaklaşık olarak 0.12) ve Pluset (LH:FSH oranı 1)'in süperovulasyon sonuçlarına etkisini karşılaştırdıkları, 2000-2015 yılları arasında yapılmış 3.990 süperovulasyon çalışmasını kapsayan verileri analiz ettikleri çalışmalarında, eşit kalitede transfer edilebilir embriyo sayıları ve eşit sayıda gelişimsel aşamada embriyo elde edildiğini Folltropin ve Pluset için toplamda karşılaştırılabilir sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 2.3. Sığır süperovulasyonunda kullanılan Avrupa, Amerika, Fransa ve Japonya da satışı yapılan FSH preparatları (Dequettes ve ark. 2020). (IU:İnternasyonel Ünite; A.U: Armour Ünite)

Preparat İsmi	Dozu	LH/FSH İçerikleri	Elde Edildiği Hayvan Türü
Folltropin-V®(20ml) (Avrupa ve ABD)	Azalan dozlarda 12 saat arayla 8 enjeksiyon Kas içi	700 IU FSH	Domuz
Pluset® (20ml) (Avrupa)	Azalan dozlarda 12 saat arayla 8 enjeksiyon Kas içi	500 IU FSH, 500 IU LH	Domuz
Stimufol® (10ml) (Fransa)	Azalan dozlarda 12 saat arayla 8 enjeksiyon Kas içi	500 µg FSH, 100 µg LH	Domuz
Antrin-R10 Al® (3 ml) (Japonya)	Tek enjeksiyon Subkutan	40 A.U FSH	Domuz
Antrin-R10 Al® (25 ml) (Japonya)	Azalan dozlarda 12 saat arayla 8 enjeksiyon Kas içi	40 A.U FSH	Domuz

Genellikle başarılı bir süperovulasyon için endojen LH seviyesinin yeterli olmasından dolayı ekzojen LH'nın gerekli olmadığına inanılmaktadır. Looney ve ark. (1988) yaptıkları çalışma ile rekombinant olarak üretilmiş bFSH'nın ekzojen LH ilave edilmeden yüksek süperovulasyon yanıtını uyardığını, ayrıca fertilizasyon oranının %95'i, transfer edilebilir embriyo oranının da %85'i aştığını bildirmişlerdir.

Mapletoft ve ark. (2002), Bos taurus sığırlarda eksojen olarak uygulanan LH'nın süperovulasyon yanıtı üzerine etkisini belirlemek için; yüksek LH grubu (%100 ve %32 LH) ve düşük LH grubu (%16 ve %2 LH) olmak üzere dört gruptan oluşan bir çalışma dizayn etmişler, süperovulasyon uygulaması sonrası, düşük LH grubunda daha fazla fertilize oosit olma eğilimi, daha fazla ovulasyon ve oosit-embriyo sayısı elde edildiğini ayrıca bu deneyde kullanılan dozlar ile oosit-embriyo kalitesi üzerine LH'nın etkisinin olmadığını bildirmişler, sonuç olarak da FSH preparatları içerisindeki LH miktarının süperovulasyon yanıtını etkilediğini, FSH preparatları içerisinde ki LH'nın maksimum kabul edilebilir seviyesinin %15 ile %20 arasında olması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Çizelge 2.4. FSH (400 mg NIH-FSH-P1) ve değişen miktarda LH ile süperstimüle edilen Bos taurus ineklerin süperovulasyon yanıtının karşılaştırılması (Mapletoft ve ark. 2002).

Gruplar	N	CL	Toplam Oosit-Embriyo	Transfer Edilebilir Embriyo
1 (%100 LH)	21	10.2	7.3	4.0
2 (%32 LH)	20	11.1	6.4	3.9
3 (%16 LH)	20	15.6	13.6	7.7
4 (Saf FSH)	20	17.2	13.2	5.5

CL: Korpus luteum

2.8.1.1.1 Süperovulasyonda Çoklu FSH Uygulama Sayılarını Azaltma Çalışmaları

İneklerde hipofiz FSH'nın yarılanma ömrü kısa olduğu için geleneksel süperstimülasyon uygulama protokolleri dört ya da beş gün boyunca günlük 12 saat arayla yapılan iki kas içi enjeksiyondan oluşmaktadır (Looney ve ark. 1981; Mapletoft 2018). Bu yaklaşım çiftlik personeli tarafından sıkı dikkat gerektirmekte ve uygulama protokollerine uyulmama nedeniyle başarısızlık ihtimalini artırmaktadır. Ayrıca günlük iki enjeksiyon uygulaması, donör ineklerde aşırı strese sebep olabilmekte, preovulatör LH salınımını değiştirerek azalmış bir süperovulasyon cevabı ile sonuçlanabilmektedir. Basitleştirilmiş protokoller özellikle hırçın hayvanlarda, donör sığırlarla uğraşı azaltabilmekte ve süperovulasyon yanıtını geliştirebilmektedir (Bo ve ark. 1994; Tríbulo ve ark. 2012).

Yüksek vücut kondisyon skoruna sahip (>3, 1 zayıf-5 obez) etçi ırk sığırlarda, tek doz deri altı ekzojen FSH enjeksiyonu ile geleneksel günlük iki uygulama protokollerine denk bir süperovulasyon yanıtı uyarılabilmektedir (Bo ve ark. 1994). Düşük vücut kondisyon skoruna, az yağ dokuya sahip olan Holştayn ineklerde aynı sonuç alınmamıştır. Fakat bu durum Holştayn ineklerde toplam ekzojen FSH dozunun ikiye bölünmesi; FSH'nın %75'nin ilk uygulama günü deri altı ve kalan %25'nin de 48 saat sonra uygulanması ile süperovulasyon yanıtı geliştirilmiştir (Lovie ve ark. 1994).

Tek bir FSH enjeksiyonu ile tutarlı bir süperovulator yanıtı uyarabilen alternatif bir yöntem, hormonun birkaç gün boyunca yavaş bir şekilde salınmasına sebep olan etmenlerle hipofiz ekstratının birleştirilmesiyle sağlanmıştır. Bu etmenler, hayvanlarda kullanımı kolaylaştıran dokularda biyolojik olarak parçalanabilen ve reaktif olmayan polimerler olmuştur (Sutherland 1991). Vücut kondisyon skorunun etkisinden kaçınmak için, %2 hyaluronan çözeltisinde seyreltilmiş FSH'nın tek bir kas içi enjeksiyonunun uygulandığı bir çalışma ile geleneksel günde iki FSH uygulamalı protokollerle karşılaştırıldığında benzer oosit-embriyo sayılarının üretildiği bildirilmiştir (Tribulo ve ark. 2011). Fakat hyaluronan viskoz (yapışkan) yapıda olduğu için saha şartlarında karıştırmak zordur. Bu nedenle daha seyreltik hyaluronan preparatlarının, tek bir uygulama olarak %2 konsantrasyona göre daha az etkili olmasına rağmen, kullanımları 48 saat arayla iki enjeksiyona bölünerek geliştirilmiştir (Tribulo ve ark. 2012; Hasler ve Hockley 2012).

Bölünmüş kas içi uygulama protokolü, %1 ya da %0.5 hyaluronanın 10 ml'si ile liyofilize toz FSH'nın seyreltilmesinden oluşmakta ve ilk gün toplam FSH dozunun üçte ikisinin uygulanması ardından kalan üçte birlik kısmın 48 saat sonra uygulanması şeklinde tamamlanmaktadır (Tribulo ve ark. 2012). Çapraz tasarımla üç kez süperstimülasyon yapılmış etçi sığırlarda, günde iki kez uygulama protokolü ile kıyaslandığında, bölünmüş enjeksiyon protokolüyle (%1 hyaluronan: 5.0 ± 0.9 ; %0.5 hyaluronan: 6.1 ± 1.3) kontrol (4.0 ± 0.89) grubunun transfer edilebilir embriyo sayıları farklı bulunmamıştır. Elde edilen veriler göstermiştir ki FSH dozunu 48 saat arayla iki kas içi enjeksiyona ayırmanın, etçi sığırlarda geleneksel günde iki kez kas içi enjeksiyon protokolü ile karşılaştırılabilir bir süperovulasyon cevabı ile neticelendiği bildirilmiştir. Ayrıca hyaluronanın daha az konsantrasyonunu saha şartlarında FSH ile karıştırmak zor olmamıştır (Hasler ve Hockley 2012).

Çizelge 2.5. Dört gün boyunca günde iki kez kas içi Folltropin-V ile %2 hyaluronanda dilue edilen ve tek bir kas içi enjeksiyon yapılan etçi donörlerde ortalama oosit-embriyo üretimi (Bo ve ark. 2010).

Uygulama	N	Toplam Oosit-Embriyo	Transfer Edilebilir Embriyo	Transfer Edilebilir Embriyo Alınamayan İnekler
Günlük İki Enjeksiyon	146	12.1 ±0.6	6.7 ±0.4	12 (%8.2)
Tek Enjeksiyon	146	11.2 ±0.8	6.4 ±0.5	19 (%13)

Yeni Zelanda AgResearch Ltd. tarafından, herhangi bir hayvansal ürününün dahil edilmediği ve bir adet 2 ml saline bolus kas içi uygulandıktan sonra dolaşımda uzun bir yarılanma ömrüne sahip olan rekombinant ovine FSH (roFSH) geliştirilmiştir. Araştırma denemeleri göstermektedir ki roFSH'nın tek bir dozunun koyunlarda 60 µg, siyah Angus sığırlarda 300 µg ile süperovulasyonu etkili bir şekilde uyardığı bildirilmiştir. Rekombinant teknolojisinde FSH preparatları LH içermemektedir. Sanderson ve Martinez (2020), uzun etkili roFSH'nın tek enjeksiyon uygulaması ile süperovulasyona aldığı sütçü ve etçi Bos taurus inek ve düvelerde, geleneksel günlük iki enjeksiyon protokolleriyle benzer sonuçlar alınabildiğini, ortalama 11.8 korpus luteum ve 6.1 iyi kalite embriyo topladıklarını ifade etmişlerdir.

2.8.1.1.2. Farklı Uygulama Protokollerinin Ardından pFSH'nın Dolaşımdaki Konsantrasyonları

Demoustier ve ark. (1988) saflaştırılmış hipofiz ekstraktlarının günlük iki kez kas içi enjeksiyonlarının, FSH'nın dolaşımdaki seviyelerinin ilk enjeksiyondan sonraki 6 saatte pike ulaştığını daha sonra takip eden 6 saat içinde bazal düzeye düştüğünü bildirmişlerdir. Bu durum süperstimülasyonu uyarmak için günlük iki uygulama gerektiğini desteklemektedir. İlginç bir şekilde FSH'nın dolaşımdaki pik düzeyi, ineklerde foliküler dalga çıkmasından önce gelen endojen FSH (~1.5 ng/ml) için bildirilen düzeyle benzer bulunmuştur (Bo ve ark. 1994). Dört Holştayn ineğe günlük iki kez FSH enjeksiyonu uygulaması sonrası ölçülen FSH düzeylerinin, Bo ve ark.'nın yaptıkları çalışmaya benzer sonuçlar verdiği başka bir çalışmayla da ortaya konmuştur (Bo, Rogan ve Mapletoft 2018).

Alüminyum hidroksitte seyreltilmiş FSH'nın tek bir kas içi enjeksiyonu ile yüksek süperovulatör yanıt elde edilmiştir (Kimura ve ark. 2007). Bu çalışmada dolaşımdaki FSH 1.5 ng/ml düzeyinde pik seviyeye ulaşmış ve yaklaşık 96 saatte bazal seviyeye düşmüştür.

Bu çalışmayla ekzojen FSH'nın tek uygulaması ile çoklu folikül büyümesini sürdürmek için ideal bir FSH profiline yakın olduğunun bulunduğu ifade edilmiştir (Bó ve Mapletoft 2020).

Bo, Rogan ve Mapletoft (2018) orta düzeyden yüksek düzeye, vücut kondisyon skoruna sahip etçi ineklerde, tek bir subkutan pFSH'nın omuz gerisine (n=25) ve boyun bölgesine (n=23) enjeksiyonları sonrası FSH konsantrasyonlarını ölçtükleri çalışmalarında, dolaşımdaki FSH düzeylerinin 12 saatte 1.2 ng/ml çıktığını ve 60-72 saatte de bazal düzeye indiğini bildirmişler, bu durum yüksek süperovulatr yanıtla ilişkili bulunmuştur. Fakat Holştayn ineklerde, boyun bölgesine (çok az yağ dokusunun olduğu yer) tek i.m ve s.c olarak tuzlu su içerisinde pFSH uygulandığında dolaşımdaki FSH profillerinin benzer bulunduğunu, fakat pik düzeye 2.5 ng/ml'de ulaştığını ve bu durum da azalmış süperovulasyon yanıtı ile ilişkilendirilmiştir.

Ovum pick-up (OPU) için %0.5 hyaluronanda tek i.m enjeksiyon olarak pFSH alan Holştayn ineklerde, 200 mg pFSH uygulaması sonrası dolaşımdaki FSH seviyesi 6-12 saatte 1.5 ng/ml düzeyinde pike ulaştığı yaklaşık 36 saatte bazal düzeye geri döndüğü, 300 mg uygulandığında ise 2.5 ng/ml düzeyinde pike çıktığı bildirilmiştir. Dolaşımdaki FSH'nın pik düzeyindeki artış 200 mg doza göre neredeyse iki kat yüksek olmuştur. Bu durum yüksek kaliteli oosit sayısında azalma ile ilişkilendirilmiştir (Vieira ve ark. 2015).

Ekzojen uygulamaların ardından dolaşımdaki yüksek FSH konsantrasyonları, uygulama yoluna bakılmaksızın tıpkı yetersiz FSH düzeylerinin yaptığı gibi azalmış süperovulasyon yanıtı ile sonuçlanmıştır. Bu durumdan şöyle bir sonuç çıkarılabilir: Bir hipofiz ekstraktının çok yüksek dozu granüloza hücreleri üzerindeki FSH reseptörlerinde doyma ya da duyarsızlaşma ile ya da ovaryum foliküllerinin luteinizasyonuna sebep olan aşırı LH ile sonuçlanabilir. Açık bir şekilde görülmektedir ki, süperovulasyonu tetiklemek için ineklerde foliküler dalga çıkmasından hemen önce normal olarak görülmekte olana yakın dolaşımdaki FSH düzeyleri en az 72 saat devam ettirilmelidir (Bó ve Mapletoft 2020).

2.8.1.2. eCG (equine chorionic gonadotropini)

Gebe kısrak serum gonadotropini PMSG olarak da bilinmekte, plasental kaynaklı gebe kısrakların serumlarından elde edilen bir gonadotropindir. At koryonik gonadotropini (eCG) hem FSH hem de LH aktivitesine sahip, yaklaşık 40 saat yarılanma ömrüne, hayvanın

dolaşımında 10 güne kadar bulunabilme özelliğine sahip glikoprotein yapısında bir hormondur (Bo, Guerrero ve Adams 2008). Kısıraklarda eCG'nin görevine en iyi yaklaşım, erken gebeliği daha iyi desteklemek için aksesör korpus luteumun uyarılmasıdır. eCG'nin evcil türlerde pubertanın uyarılması, anöstrusun düzeltilmesi, süperovulasyon ve son zamanlarda fertilitenin geliştirilmesi dahil olmak üzere çok sayıda uygulaması vardır (Murphy 2018). Süperstimülasyon amacıyla kullanıldığında, hayvan türüne göre değişmekle beraber; 1500, 2500 ve 3000 IU dozlarında tek bir uygulama şeklinde yapılmakta, 48 saat sonra da PGF uygulanmaktadır. eCG'nin yarılanma ömrünün uzun olması, uzamış ovaryum stimülasyonuna, anormal endokrin profillerinin çıkmasına, süperovulasyon sonrası anovulatör folikül sayısında artışa ve embriyo kalitesinde azalmaya neden olmaktadır. Bu sorunlar süperovulasyon protokollerinde östrusun başlamasından 12-18 saat sonra ilk tohumlama sırasında intravenöz anti-PMSG enjeksiyonu yapılmasıyla açılmıştır. Bununla birlikte günümüzde ticari bir anti-PMSG antikoru bulunmamaktadır. Bu nedenle eCG sığır süperstimülasyonlarında nadiren kullanılmaktadır (Dieleman ve ark. 1993; Gonzalez ve ark. 1994).

Baruselli ve ark. (2008)'nin Holştayn sütçü ineklerde eCG'nin süperovulasyon yanıtı üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada; toplam 12 baş yüksek süt verimli inek çapraz deneysel tasarımla 200 mg FSH, 2000 IU eCG ve 2500 IU eCG dozlarının kullanıldığı üç gruba ayrılmışlardır. Transfer edilebilir embriyo sayıları bakımından gruplar arasında önemli fark bulunamamıştır (FSH: 7.9 ± 1.1 , 2000 IU: 6.7 ± 1.1 , 2500 IU: 8.1 ± 0.7).

eCG'nin embriyo üretimi üzerine ardışık uygulamalarının etkinliğini değerlendirmek için 35 gün arayla ardışık dört süperovulasyon uygulamasının etkisinin değerlendirildiği, Baruselli ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışmada, üç ardışık süperovulasyon protokolü boyunca tekrarlı bir şekilde eCG tedavisi alan inekler ile FSH ile süperovulasyon yapılan inekler karşılaştırıldığında benzer embriyo kazanımı edinilmiştir. Fakat eCG uygulanmış donörlerin embriyo üretimi dördüncü süperovulasyon protokolü sırasında azalmıştır. Bu donörlerin başlangıçtaki embriyo verimini yeniden yakalama başarısını değerlendirmek için FSH ile ekstra bir beşinci süperovulasyon protokolüne alınmışlar, eCG uygulanan donörler FSH uygulandığı zaman kontrol grubundakilere benzer embriyo sayıları üretmişlerdir. Bu çalışma ile embriyo üretiminde azalma olmadan üç kez art arda tek doz eCG kullanılarak donörleri süperovulasyona almanın mümkün olduğu gösterilmiştir. Fakat ardışık dördüncü

süperovulasyon protokolünde, embriyo üretimini aynı şekilde devam ettirebilmek için FSH'nın kullanılması gerektiği sonucu çıkarılmıştır.

Süperovulasyon protokollerinde tek bir kas içi eCG enjeksiyon uygulaması; eCG'nin dolaşımında uzun süre kalması, uzamış ovaryum stimülasyonuna, anovule foliküllere, embriyo toplama sırasında büyük foliküllerin olmasına ve embriyo kalitesi üzerine zararlı etki gibi istenmeyen durumlara sebep olmaktadır (Dieleman ve ark. 1993; Gonzalez ve ark. 1994). Süperovulasyon uygulamaları sırasında donör uğraşımı ve hayvanlar üzerindeki çoklu enjeksiyon uygulamalarından kaynaklanan stresi en aza indirmek için FSH'nın azalan sekiz doz uygulaması dört doz şeklinde yapılmakta ve beşinci doz tek bir eCG enjeksiyonu şeklinde tamamlanmaktadır. Bu amaçla Chacon ve ark. (2020). 26 baş Bos taurus x Bos indicus melez multiparous inekleri embriyo donörü olarak kullanmışlar, üç gruptan oluşan çalışmalarında; 1) 455 IU Folltropin+400 IU eCG (n=9), 2) 350 IU Folltropin + 600 IU eCG (n=9) ve 500 IU Pluset + 600 IU eCG (n =8) kullanmışlardır. 1. grupta sekiz azalan dozda folltropin + son 7 ve 8. uygulamada eCG'de yapılmış, 2. ve 3. grupta dört azalan dozda FSH uygulandıktan sonra 5. uygulama tek doz eCG enjeksiyonu şeklinde yapılmıştır. Sonuç olarak grup sırasına göre 7.7 ± 1.2 , 7.5 ± 1.2 ve 7.3 ± 1.3 transfer edilebilir embriyo sayıları elde edilmiştir. Transfer edilebilir embriyo sayılarını azaltmadan, geleneksel sekiz FSH enjeksiyonlu süperovulasyon uygulamalarında ki son dört FSH enjeksiyonun yerine, tek bir doz eCG'nin yer değiştirmesinin Bos taurus x Bos indicus melez ineklerde donör uğraşımı azaltmak için iyi bir alternatif olduğu ifade edilmiştir.

Barros ve ark. (2008)'nin Nelore ineklerde yaptıkları çalışmada, geleneksel dört gün azalan doz FSH uygulamalarıyla, üç gün azalan doz FSH ve son gün de FSH'nın yerine iki enjeksiyon 200 IU eCG uygulamasının süperovulasyon yanıtına etkisini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak, kontrol grubundaki donörlerle kıyaslandığında, eCG'nin önemli ölçüde oosit-embriyo sayısını ve sayısal olarak da transfer edilebilir embriyo sayısını artırdığını bildirmişlerdir.

Çizelge 2.6. Piyasada Kullanılan Bazı eCG Ürünleri (Çetin, Beceriklisoy ve Uçar. 2015).

Ticari Ürün Adı	Firma	1 ml'sinde	Flakondaki toplam doz
Folligon	MSD	200 IU	1.000 IU
Choronogest	MSD	200 IU	6.000 IU
Pregnecol	Aydın İlaç	200 IU	6.000 IU

2.8.2. Sığırlarda Süperovulasyon Başarısını Etkileyen Faktörler

Süperovulasyon ve embriyo kazanımının sonuçlarını birkaçı hayvanla ilişkili, çevresel, teknik ve yönetsel faktörler etkilemektedir. Süperovulasyonun verimliliği neredeyse son kırk yıldır nispeten sabit kalmıştır. Ortalamada bir donörden, altı-yedi transfer edilebilir kalitede embriyo elde edilmekte, embriyo kazanım aralığı da 0 ile 50'den daha fazlasına varan sayıda olabilmektedir. Yaklaşık olarak tüm embriyo toplamalarının %15-20'sinden transfer edilebilir kalitede embriyo elde edilememektedir. Yüksek bireysel değişkenliğe ilave olarak süperovulasyon yanıtlarındaki düşük tekrarlanabilirlik tekniğin özellikleridir ve bugüne kadar nispeten sabit kaldığı ifade edilmektedir. Bu gerçekler embriyo popülasyonunda bir çarpıklığa neden olmakta, elde edilen embriyoların üçte ikisinin süperovulasyon yapılan donörlerin üçte birinden alındığı bildirilmektedir (Looney 1986; Hasler 2014; Mikkola, Hasler ve Taponen 2020).

2.8.2.1. Süperovulasyon Başarısını Etkileyen Hayvanlarla İlgili Faktörler

2.8.2.1.1. Östrus Siklus Günü ve Foliküler Dalganın Aşaması

İlk olarak Phillippo ve Rowson (1975), eCG'nin östrus siklusunun 8 ve 12. günleri arasında uygulandığında siklusun diğer günlerinde uygulanmasına göre daha yüksek süperovulasyon başarısı elde edildiğini bildirmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda, o günlerin ovaryumlarda fonksiyonel dominant folikülün bulunmadığı, ikinci foliküler dalga çıkma günlerine denk geldiğinin anlaşıldığı ifade edilmiştir (Ginther ve ark. 1989). Süperovulasyona başlarken ovaryum üzerinde fonksiyonel dominant folikülün bulunması, dominant folikülün hipofiz ve ovaryum üzerine potansiyel inhibitör etkisi nedeniyle ekzojen FSH'nın etkisiz kalmasına neden olmaktadır (Bo' ve Mapletoft. 2014).

Bir dominant folikülün varlığı ya da yokluğu doğal olarak subordinat foliküllerin durumu ile bağlantılıdır. Fonksiyonel dominantlık sırasında, subordinat foliküller regresedir ve gonadotropin uyarılarına yanıtları zayıf kalmaktadır. Çalışmalarla gösterilmiştir ki süperovulasyona en iyi yanıt, süperovulasyon uygulamasına foliküler dalga çıktığı anda başlanıldığında alınmaktadır. Foliküler dalga çıkmasından 1 gün önce ya da 1 gün sonra gonadotropin uygulamalarına başlamak, süperovulasyon yanıtlarını, foliküler dalga çıkma

günü ile kıyaslandığında önemli ölçüde azaltmaktadır (Nasser ve ark. 1993; Adams ve ark. 1994).

2.8.2.1.2. Gelişmekte Olan Foliküllerin Sayısı ve Anti-müllerian Hormon

Günümüzde süperovulasyon sonuçlarını etkileyen ana faktörün, uygulanan tedavi protokollerinin değil hayvanın kendisi olduğuna dair yaygın bir algı mevcuttur. Yanıtlardaki değişkenliğin ana kaynağı, FSH uygulamalarının başlangıcındaki foliküllerin sayısıdır. Az sayıda büyüyen küçük antral foliküllere sahip ineklerin uygulamaya ovulatör yanıtları düşük olmaktadır (Kawamata 1994; Ireland ve ark. 2007). AMH'daki değişimle antral folikül sayısı ve genç yetişkin sığırların ovaryumlarındaki morfolojik olarak sağlıklı foliküllerin toplam sayısı ile oositlerin histolojik olarak belirlenmesi arasında yüksek pozitif bir ilişki görülmüştür (Ireland ve ark. 2008). Ovaryumlarda AMH sadece dış granüloza ve küçük antral (1-5 mm çaptaki) foliküllerin kumulus hücrelerinde üretilmektedir (Rico ve ark. 2011).

Kandaki AMH konsantrasyonu ile gonadotropine duyarlı foliküllerin sayısı arasında güçlü bir ilişki vardır. Bu yüzden AMH ineklerdeki ovaryum aktivitesini ve süperovulasyona ovaryum yanıtının bir tahmin edicisi olarak güvenli bir markıdır (Rico ve ark. 2009; Souza ve ark. 2015; Abdel Aziz ve ark. 2017). MOET programlarında zayıf yanıt verecek hayvanları çıkarmak için süperovulasyon uygulamalarından önce plazma AMH ölçümlerinden faydalanılabilir. Zayıf yanıt veren inekleri tespit etmek için AMH'nın eşik değerini belirlemek mümkün olmuştur. Gonadotropinlerle uyarılmış inekler, östrusta 15 büyük folikülden daha az verenler 87 pg/ml, MOET protokollerinde 10 embriyodan daha az verenler 74 pg/ml plazma AMH konsantrasyonları olarak belirlenmiş ve bu değerlerin altında olanların verimli bir şekilde çalışmadan çıkarılabileceği gösterilmiştir (Rico ve ark. 2012; Souza ve ark. 2015).

2.8.2.1.3. Yaş

Günümüzde süperovulasyon ve embriyo yıkamasına alınacak hayvanların yaşı çokta alakalı konu değildir. Çünkü genetik seleksiyon yoğunluğundaki artış, yaşlı donörlerden embriyo üretimindeki ilgiyi hızlı bir şekilde azaltmıştır (Mikkola, Hasler ve Taponen. 2020).

Şöyle ki, iki İskandinav ülkesi olan Danimarka ve Finlandiya da 2000'lerin başlarında in vivo embriyo donörlerinin yarısı düvelerden oluşmaktayken son birkaç yıldır tüm donörlerin %96'sını düve donörler oluşturmaktadır (Mikkola, Hasler ve Taponen. 2020).

Düve ve ineklerin embriyo verimlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda genel olarak ineklerin düvelerden fazla embriyo verdiği, Mollo ve ark. (2007)'nin 204 yıkamayı kapsayan çalışmalarında, toplam elde edilen yapılar düve ve ineklerde sırasıyla 9.2 ve 15.2 olurken transfer edilebilir embriyo sayısı olarak da 6.0 ve 8.7 olarak bulunmuştur. Yine Mikkola'nın 7930 ticari yıkamasını içeren çalışmasında, toplam yapılar düve ve inekler için sırasıyla 9.9 ve 10.9 olurken transfer edilebilir embriyo sayısı bakımından 6.4 ve 7.3 olmuştur (Mikkola, Hasler ve Taponen. 2020).

Mikkola ve Taponen (2017)'in, düve ve ineklerde konvansiyonel ve sexed sperma kullanılarak yaptıkları süperovulasyon çalışmaları sonucunda, konvansiyonel sperma ile düve ve ineklerde sırasıyla 7.6 ve 8.6 transfer edilebilir embriyo elde edilmişken, sexed sperma ile 6.2 ve 5.4 embriyo elde edildiğini, sexed sperma ile süperovulasyon çalışmalarında düvelerin sayısal olarak daha fazla embriyo verdiklerini ifade etmişlerdir.

İneklerde özellikle 2-14 arası yaşın, süperovulasyon yanıtı ve elde edilen embriyo sayısı üzerine çok az etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Hasler ve ark. 1983). Fakat 10 yaşından büyük donörlerde gonadotropinlere yanıt veren folikül sayısının yaşla azalması çok muhtemel görülmektedir. 56 Teksas Longhorn ineğin 144 yıkamasını içeren bir çalışmada; 3-9 yaş aralığında transfer edilebilir embriyo sayısı 6.9 olurken, 10-22 yaş aralığında 1.9 olmuştur (Donaldson 1984b).

2.8.2.1.4. Irk

Etçi sığır ırklarının süperovulasyon uygulamalarına daha iyi yanıt verdiği ve sütçü ırklardan daha fazla embriyo ürettiği konusunda yaygın bir anlayış vardır. AMH konsantrasyonu ile ovaryum rezervi ve süperovulasyon yanıtı arasında güçlü bir bağlantı olduğu bilinmektedir. Buna göre genç yetişkin etçi Angus ve Charolais düvelerin, AMH konsantrasyonlarının sütçü Holştayn ve Jersey düvelerden fazla olduğu ifade edilmiştir (Pfeiffer ve ark. 2014). Bu durum dolaylı olarak etçi sığır ırklarının embriyo üretimindeki üstünlüğünü gösterebilir. Fakat 1980'lerde Teksas'ta yaklaşık olarak 2300 etçi ırk donör ile

710 laktasyonda olmayan Holştayn donör ineğin embriyo verimlerinin karşılaştırıldığı çalışmada uygun embriyo sayıları bakımından bir farklılık olmadığı bildirilmiş, fakat Holştayn ineklerin laktasyon stresinde olmamasının bu sonuçları kısmen açıklanabilir kıldığı ifade edilmiştir (Wilson 1988).

İrk farklılıklarının süperovulasyon cevabı ve embriyo üretim kapasitesine etkisinin araştırıldığı, kontrollü bir şekilde yapılan bazı çalışmalarda, sütçü sığırlarda Brown Swiss'lerden Holştayn Frizan'lara göre (9.3 ve 6.8) daha fazla transfer edilebilir embriyo elde edilmiştir (Mollo ve ark. 2007). Etçi ırklarda Simental donörlerden Angus, Charolais ve Polled Hereford donörlerden daha fazla oosit, embriyo ve transfer edilebilir embriyo elde edildiği bildirilmektedir (Breuel ve ark. 1991). Steinhäuser ve ark. (2018)'nın Wagyu sığır ırkının Angus, Beefmaster, Brangus, Charolais, Hereford ve Red Brangus ırklarına göre embriyo verimlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında; Wagyu: 9.1 ve diğerleri sırasıyla: 4.1, 7.9, 7.1, 5.6, 7.0, 7.0 sonuçlarını elde etmişlerdir.

2.8.2.1.5. Laktasyon Durumu ve Süt Üretimi

Laktasyon durumunun etçi sığırların süperovulasyonunda genellikle önemli bir etmen olmadığı, tarihsel olarak bakıldığında sütçü sığırların laktasyon durumunun da önemli bir sorun teşkil etmediği bildirilmektedir. Çünkü 1980'lerde inek başına günlük süt verimi yaklaşık olarak günümüzün yarısı kadardı. 2018 yılında Wisconsin'li bir inek tarafından yıllık süt üretimi 35.000 L' nin üstüne çıkarak rekor kırılmıştır. Sütçü sığırlarda günlük üç kez sağım ve rekombinant somatotropin kullanımı sütçü sığırlarda ek stres yapabilmektedir (Mikkola, Hasler ve Taponen. 2020). Hasler ve ark. (1983), süperovulasyon zamanı günlük 50 kg kadar değişen miktarlarda süt üreten ve postpartum en az 60. günde olan Holştayn ineklerden embriyo üretiminde herhangi bir farklılık gözlenmediğini ifade etmişlerdir.

2.8.2.2. Süperovulasyon Başarısını Etkileyen Teknik Faktörler

2.8.2.2.1. Gonadotropinler

Modern embriyo transfer sektörünün kurulduğu 1970'li yıllarda, sığır süperovulasyonu için eCG kullanılmaktaydı. eCG'nin 40 saatin üzerinde yarılanma

ömrünün olması ve tek doz enjeksiyonunun yeterli olması avantajlarındandı fakat devam eden ovaryum uyarımı, ovulasyonlarda düzensizlik ve başarısızlık, anormal endokrin profilleri ve özellikle tekrarlı uygulamalarda immün yanıtı uyarma riskleri gibi dezavantajlara da sahipti (Murphy ve Martinuk 1991). Bu olumsuz etkilerden dolayı alternatif arayışının sonucu olarak domuz hipofizlerinden saflaştırılmış FSH üretilmesine başlanılmıştır. Bu ürününde 5 saat gibi kısa yarılanma ömrü ve bu yüzden sık uygulama gerektirme gibi dezavantajları mevcuttu. Fakat kullanımı sığır süperovulasyonunda aşamalı bir şekilde standart bir yaklaşım haline gelmiştir (Demoustier ve ark. 1988).

Günümüzde veteriner kullanımı için onay almış ticari FSH preparatları çoğunlukla domuz hipofiz dokusundan üretilmektedir. Saflaştırılmış olmalarına rağmen, bu ürünler arasında LH kontaminasyon seviyeleri değişebilmektedir (Ulloa-Aguirre ve ark. 1995). FSH ürünlerindeki yüksek LH içeriğinin zararlı etkisi birçok çalışmayla gösterilmiştir (Chupin ve ark. 1984; Donaldson ve ark. 1986; Tribulo ve ark. 1991; Yamamoto ve ark. 1993). Geçmişte başarılı bir süperovulasyon için FSH preparatlarında minimum düzeyde LH içeriğinin gerekli olduğuna dair fikir birliği vardı. Fakat günümüzde endojen LH'nın foliküler büyümenin final aşaması için yeterli olduğu ve ekzojen LH'nın gerekli olmadığı açık bir şekilde gösterilmiştir (Kanitz ve ark. 2002). Ekzojen LH'nın pFSH (porcine FSH) ile başarılı süperovulasyon için gerekli olmadığı ve rekombinant sığır FSH'sı (rbFSH) ile LH olmadan karşılaştırılabilir bir süperovulasyon yanıtı alınabildiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Looney ve ark. 1988; Wilson ve ark. 1989; Carvalho ve ark. 2014)

2.8.2.2.2. Süperovulasyon Protokolleri

Sığırların süperovulasyon başarısı ovaryum durumunun oldukça dar bir aralığında gonadotropin enjeksiyonlarına başlamaya bağlıdır. Bos taurus dişilerde östrus uzunluğu yaklaşık olarak 17-24 gün aralığında değişmektedir ve çoğunlukla iki ya da üç foliküler dalgadan oluşmaktadır (Adams ve ark. 1992). Süperovulasyona başlamak için foliküler dalga senkronizasyonlarının yapıldığı uygulamalarda, donör hayvanların sikluslarının kaç dalgalı olduğunu bilmeye gerek yoktur. Üç farklı foliküler dalga senkronizasyon yöntemi vardır bunlar; progesteron + östradiol kullanımı, folikül aspirasyonu ve GnRH-LH ile foliküler dalga senkronizasyonu şeklinde yapılmaktadır. Östrus takibi gerektiren klasik süperovulasyon protokolünde ise siklusun 9-13. günleri ve arasında gonadotropin

uygulamalarına başlama şeklinde yapılmaktadır (Mikkola, Hasler ve Taponen. 2020). (bu konu 2.9. bölümde ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır)

2.8.2.2.3. Tohumlamalar

2.8.2.2.3.1. Süperovulasyon Yapılan Sığırlarda Fertilizasyon Oranı

Tek ovulasyon olan sığırlardaki fertilizasyon oranları genellikle yüksektir ve %90-100 arasındadır. Oysa yüksek verimli sütçü ineklerde bu oran kısmen azalmıştır (Diskin ve Morris 2008). Süperovulasyon protokollerinin belli bir standardı yakaladığı 2000’li yıllardan sonra, pFSH ile süperovulasyon yapılan donörlerde, konvansiyonel ticari dondurulmuş sperma ile standart protokole göre iki kez tohumlamayla, Bos taurus sığırlardaki fertilizasyon oranlarının %70-90 aralığında değiştiği ayrıca süperovulasyon için rbFSH’nın kullanıldığı bazı çalışmalarda da %91-100’e varan fertilizasyon oranlarının yakalandığı bildirilmektedir (Looney ve ark. 1988; Wilson ve ark. 1993; Carvalho ve ark. 2014). pFSH ile 7930 süperovulasyondan elde edilen saha verilerine göre sütçü düve ve ineklerde %80 fertilizasyon oranı elde edilmiştir. Fertilizasyon oranlarının MOET’in (Multiple Ovulation Embryo Transfer) ilk yıllarına göre biraz geliştirilmiş olması, muhtemeldir ki süperovulasyon protokollerindeki gelişmelerden kaynaklanmaktadır (Mikkola, Hasler ve Taponen. 2020).

2.8.2.2.3.2. Tohumlama Zamanı

Süperovulasyon yapılan donörler için en yaygın kullanılan protokol, östrusun başlangıcından sonraki 12 ve 24 saat sonra yüksek kaliteli sperma ile iki kez tohumlama ya da ilk PGF enjeksiyonundan sonraki 60 ve 72. saatlerde tohumlama şeklinde yapılmaktadır (Bo ve ark. 2006). Dalton ve ark. (2000) östrusun başından sonraki 0, 12 ve 24 saat sonra yapılan tohumlamaları karşılaştırdığı çalışmalarında en yüksek fertilizasyon oranlarının 24 saat sonra bir kez yapılan tohumlamadan elde edildiğini bildirmişlerdir.

2.8.2.2.3.3. Sexed Sperma ile Tohumlama

Süperovulasyon yapılan sığırlarda konvansiyonel sperma yerine sexed sperma kullanıldığında genellikle embriyo üretimi düşmektedir. Bu durum ineklerde düvelere göre daha bariz görülmekte (Sa' Filho ve ark. 2014) ayrıca transfer edilebilir embriyoların elde edilemediği daha fazla embriyo toplama başarısızlığı ile karşılaşmaktadır (Mikkola ve Taponen 2017b). Sexed sperma ile yapılan süperovulasyonların başarısının en önemli göstergesi sadece transfer edilebilir embriyo sayısı değil aynı zamanda gebelikler ve sonunda canlı buzağı doğumu ile sonuçlanacak istenilen cinsiyette transfer edilebilir sayıda embriyo elde etmektir. Konvansiyonel ve sexed sperma ile üretilmiş embriyoların transferinde dişi buzağı oranı sırasıyla %50 ve %92 oranında gerçekleşmektedir. 10.697 konvansiyonel ve 1741 sexed embriyo transferinin ardından gebelik sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, konvansiyonelde %44.1 ve sexed sperma ile üretilmiş embriyoda %38.8 gebelik başarısı elde edilmiştir. Sexed sperma ile üretilmiş embriyoların transferinden sonra gebelik oranlarının konvansiyonele göre yaklaşık %6 daha düşük ve sexed sperma kullanımı ile elde edilen transfer edilebilir embriyo sayısında da azalma görülmesine rağmen özellikle düvelerin süperovulasyonunda sexed sperma kullanımının karlı olacağı ifade edilmiştir (Mikkola ve ark. 2015).

Doz başı 10 milyon spermatozoanın eşit dozda kullanıldığı süperovulasyon yapılan Holştayn düvelerde, sexed ve konvansiyonel sperma ile derin kornu uteri tohumlamasının karşılaştırıldığı çalışmada, sexed sperma kullanılan grubun fertilizasyon oranında azalma olduğu ayrıca düvelerden toplanan uygun embriyo sayılarının sexed ile konvansiyonel sperma karşılaştırıldığında daha düşük olduğu bu durumun sexed spermanın fertilitésinin daha zayıf olduğunun göstergesi olduğu ifade edilmektedir (Schenk, Suh ve Seidel. 2006). Aynı çalışmada yüksek sayıda (10 milyon) sexed spermatozoa ile tohumlamayla 40 milyon konvansiyonel spermatozoa ile tohumlanmış kontrol grubundan daha az embriyo elde edilmiştir. Sexed spermanın yüksek maliyeti ve payet başı düşük sayıda spermatozoa içermesi nedeniyle konvansiyonel spermadakine benzer sayılarda spermin üreme kanalına bırakılmasının uygun olmayacağı ifade edilmektedir. Geleneksel olarak sexed spermanın ticari olarak mevcut olan dozu yaklaşık olarak payet başına 2 milyon spermatozodur. 2017 de her payette yaklaşık olarak 4 milyon spermatozoa içeren bir ürün geliştirilmiştir (sexedULTRA 4MTM). Bu yeni ürünün öncekilerle kıyaslandığında daha üstün olduğu bildirilmiştir (Vishwanath ve Moreno 2018). Dell'Eva ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada,

yüksek verimli Holştayn ineklerde sexedULTRA 4M ile embriyo toplama başına 4.5'e kadar transfer edilebilir embriyo elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Tek ovulasyon olan hayvanlarda sexed sperma ile tohumlamayı, ovulasyona yakın bir zamana kadar ertelemenin gebelik oranlarını artırdığına dair birçok çalışma mevcuttur (Schenk ve ark. 2009; Sa' Filho ve ark. 2010; Sales ve ark. 2011; Thomas ve ark. 2017). Süperovulasyon yapılmış donörlerde, başarılı bir embriyo kazanımı için östrus tespitinden 24 saat sonra yeterli sperma dozu ile tohumlamak çok önemlidir. Süperovulasyon yapılan donörlerde tohumlamanın, östrusun başından sonra 12 ve 24 saat yerine 18 ve 30 saat sonraya ertelemenin embriyo kazanımını geliştirdiği bildirilmektedir (Sartori ve ark. 2004; Baruselli ve ark. 2008; Soares ve ark. 2011). Ovulasyon, östrusun başından 30 saat sonra meydana gelmekte ve cinsiyeti belli spermatozoonların dişi genital kanalda daha kısa (yaklaşık 2 saat) kapasitasyon süresine sahip olması, sexed sperma ile süperovulasyon yapılan donörlerin östrusun başından sonra 18 ve 30 saatlerde iki ya da 18, 24 ve 30 saatlerde üç tohumlama yapılmasıyla en iyi embriyo kazanımının elde edildiği ifade edilmektedir (Lu ve Seidel 2004; Schenk ve ark. 2009; Arruda ve ark. 2018).

2.8.2.3. Süperovulasyon Başarısı Üzerine Beslemenin Etkisi

Sığırlarda yem alımı, enerji, protein kaynağı ve miktarı, yağ asitleri, vitamin ve mineral takviyeleri gibi beslenme faktörleri üreme üzerine önemli etkilere sahiptirler. Beslenme faktörlerinin tümü, enerji ve kuru madde alımı (DMI) süperovulasyon yapılmış sığırlarda kilit rol oynamaktadır (Sartori ve ark. 2016).

2.8.2.3.1. Negatif Enerji Dengesi

Laktasyondaki sütçü inekler için fertilité ve sonraki embriyo üretimini etkileyen en önemli beslenme faktörü postpartum negatif enerji dengesidir. Embriyo üretimine başlanılmadan önce donör ineklerde postpartum anöstrüs ve negatif enerji dengesinin ileri aşaması geçilmiş olmalı ve hayvan normal siklus döngüsüne dönmüş olmalıdır. Ciddi negatif enerji dengesinin iki önemli sonucu olmaktadır. Birincisi, embriyo üretim prosedürlerinin ertelenmesi nedeniyle donör ineğin buzağılama aralığı uzamakta ikincisi, oosit kalitesi ve erken embriyo gelişiminin bozulması nedeniyle yetersiz embriyo üretim riskidir (Mikkola,

Hasler ve Taponen 2020). Ayrıca steroid hormonların kandaki düzeylerindeki değişiklikler oosit kalitesini, fertilizasyonu ve embriyo gelişimini bozabilmektedir. Postpartum sütçü ineklerin yüksek besin ihtiyacı kuru madde alımını ciddi oranda artırmakta, bu durum progesteron ve östradiolün karaciğerde metabolize olmasını hızlandırarak kandaki konsantrasyonlarında azalmaya yol açmaktadır (Wiltbank ve ark. 2006).

2.8.2.3.2. Yüksek Enerji ve Kuru Madde Alımı

Süperovulasyon uygulamalarının ilk yıllarında, yüksek süt verimli ineklerde embriyo üretimini üst düzeylere çıkarmak için erken laktasyon döneminde negatif enerji dengesini kontrol etme stratejisi, donör besleme yönetimi için gerekiyordu. Günümüzde ise en önemli donörlerin genç düveler olmasından dolayı zorluk tam tersidir. Pubertenin başlamasını ve donör düvelerin erken olgunlaşmasını hızlandırmak için yüksek bir büyüme oranı arzulmaktadır. Ancak çok yüksek enerjiden kaçınılmalıdır (Mikkola, Hasler ve Taponen. 2020).

İn vitro embriyo üretimi için folikül aspirasyonu yapılan inekler ile süperovulasyona alınan inek ve düvelerde oosit, embriyo kalitesi ve üretimi üzerine aşırı enerji alımının olumsuz etkisi, orta ile yüksek vücut kondisyon skoru (BCS ≥ 3.0) ölçeğinde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Leiva ve ark. 2015; Sales ve ark. 2015). Yüksek enerjili besleme yapılan donörlerden elde edilen embriyolar ile standart düzeyde enerji ile beslenenlerle karşılaştırıldığında daha düşük gebelik oranlarına sahip oldukları görülmüştür (Sartori ve ark. 2016).

Anormal enerji alımının embriyo üretimine müdahale ettiği mekanizmalar bugüne kadar tam olarak bilinmemektedir. Artan kan glikoz, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) 1 konsantrasyonları yüksek enerjili beslemenin bir sonucudur (Diskin ve ark. 2003). Yüksek enerjili beslemenin bir sonucu olarak bozulmuş embriyo üretimini ortaya çıkaran çalışmaların çoğu aynı anda yüksek kan insülin konsantrasyonları bildirmektedir (Bender ve ark. 2014; Sartori ve ark. 2016; Mollo ve ark. 2017). Aşırı enerjinin dezavantajları, donörün metabolik durumuna bağlı olarak değişebilmekte, düşük ve orta BCS (vücut kondisyon skoru)'den ziyade yüksek BCS'li donörlerde daha derin olmaktadır. Aşırı BCS'li donörlerde insülin direnci ifade edilmekte bu durumda hücrelerin glikoz alımı

azalmaktadır. Kandaki uzun süreli yüksek insülin düzeyi, ovaryumların gonadotropinlere duyarlılığını ve oosit kalitesini azaltmaktadır (Adamiak ve ark. 2005; Freret ve ark. 2006). Bender ve ark. (2014)'nın çalışmasında, kan insülin konsantrasyonu ile FSH preparatlarındaki LH içeriği arasında bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Çünkü insülin düzeyleri yüksek olan ineklerin süperovulasyon tedavisinde LH'da yüksek olduğunda, embriyo üretimi olumsuz etkilenmekteydi ama düşük LH'ya maruz kaldığında bu durum olmamaktaydı. Bu bulgu ekzojen gonadotropinleri ve donörün metabolik durumunu yakından ilişkilendirmektedir.

2.8.2.3.3. Besinsel Protein

Yüksek protein alımının zararlı etkilerinin uterus ortamından ziyade ovaryum düzeyinde etki etme olasılığının daha yüksek olduğu öne sürülmektedir. Bu hipotez ET'nin üre seviyelerinde farklılık gösteren donör ve taşıyıcılar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarla desteklenmektedir. Yüksek kan üre nitrojenli (BUN) donörlerden elde edilen embriyoların, taşıyıcıların BUN konsantrasyonlarına bakılmaksızın, embriyolar yüksek veya düşük BUN'lu alıcılara transfer edildiğinde gebelik oranlarında düşme görülmüştür (Rhoads ve ark. 2006). Yüksek üre içeriği ile beslenen taşıyıcılara iyi kaliteli embriyolar nakledildiğinde, taşıyıcılarda üre takviyeli beslenmenin gebelik oranları üzerine hiçbir etkisi olmadan benzer sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Gath ve ark. 1999, 2012).

2.8.2.4. Süperovulasyon Başarısını Etkileyen Çevresel Faktörler

2.8.2.4.1. Mevsim, İklim ve Hava

Hasler ve ark. (1983) 1977 ve 1982 yılları arasında USA'nın üst kuzey doğu çeyreğinde, yılın dört mevsiminde, süperovulasyon yapılmış Holştayn inekler arasında süperovulasyon yanıtları bakımından önemli bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Fakat sonraki yıllarda süperovulasyon sonuçlarında birkaç istisna olarak sıcak yaz sırasında, ciddi kar yağışı ve ani çok düşük sıcaklıkların eşlik ettiği fırtınalı kış aylarında embriyo üretiminin azaldığı bildirilmiştir.

Güney-batı Brezilya'nın tropikal ikliminde, Holştayn inek ve düvelerde yılın soğuk ve sıcak dönemlerinde yapılan süperovulasyon sonuçlarında önemli bir farklılık olduğu

bildirilmiştir. Yılın en soğuk dönemini yansıtan aylar (11.6 °C- 28.0 °C) ile sıcak yaz ayları (19.6 °C-37.1°C) karşılaştırıldığında soğuk dönemde donörlerden daha fazla transfer edilebilir ve dondurulabilir embriyo elde edilmiştir (Vieira ve ark. 2014).

Sıcaklık-nem indeksi (THI), çevre sıcaklığı ile bağıl nemin birleşik etkisini göstermekte ve sütçü sığırlar üzerine sıcaklık stresinin etkisini ölçmede kullanılmaktadır. THI eşik değeri aşıldığında sığırların üreme özellikleri üzerine negatif bir etkiye sahiptir. Sütçü sığırlarda gebelik oranlarında azalmaya neden olan eşik değer 72-73 THI olarak bildirilmiştir (Morton ve ark. 2007; Schuller ve ark. 2014).

Tohumlama gününe göre (tohumlamadan 9, 21 ve 42 gün önce) ısı stresi dönemleri süresince THI ile süperovulasyon yanıtı arasındaki ilişkinin incelendiği, 12 süperovulasyon yapılmış melez Holştayn ineklerden elde edilen 74 veriye göre östrus senkronizasyonu zamanından itibaren süperstimülasyondan tohumlamaya kadar olan süreler, süperovulasyon yanıtını etkileyebilecek ısı yükünün dikkate alınması açısından önemli bulunmuştur. Süperovulasyon cevabındaki düşüşün THI 72’de başladığı ve THI 77’den daha yüksek değerlere çıktığında ise ciddi boyutlara ulaştığı bildirilmiştir (Ratchamak ve ark. 2021).

2.8.2.4.2. Psikolojik Stres

Preovulatör dönem sırasında stresin uyarmış olduğu kortikostereoid artışı, ovulasyon yetersizliğine neden olan gonadotropin salgılanmasını baskılama ve LH salınımının engellenmesine yol açabilmektedir. Süperovulasyon uygulamaları sırasında düvelerin taşınması, kan kortizol düzeylerinde artışa ve ovulasyon oranlarında da azalışa neden olmaktadır (Edwards ve ark. 1987). Macedo ve ark. (2011), Nelore sığırlarda süperovulasyon uygulamaları sırasında vurma, tekmeleme, kuyruğunu kıvrırma, bağırma, hızlı kol hareketleriyle hayvanları korkutma gibi stres oluşturan durumlara maruz bırakılan donörlerde kan kortizol düzeyinin arttığını bu nedenle düşük kortizol konsantrasyonuna sahip hayvanlara göre daha düşük embriyo kalitesine sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Süperovulasyon uygulamaları sırasında insan-hayvan etkileşimini ve hayvan uğraşını en aza indirmek amacıyla klasik sekiz azalan doz FSH enjeksiyonları yerine uzun etkili tek enjeksiyon ya da 48 saat arayla iki deri altı FSH enjeksiyon uygulamaları embriyo verimini tehlikeye atmadan uygulanmaktadır. Bos taurus donörlerde ilave uğraşın ve çoklu

FSH enjeksiyonlarının bir sorun oluşturmadığı ifade edilmiştir (Trı'bulo ve ark. 2012; Hasler ve Hockley 2012).

Biancucci ve ark. (2016) Marchigiana düvelerinde uyguladıkları süperovulasyon protokolünde, sekiz enjeksiyonlu standart protokol ile Pluset FSH'nın 48 saat arayla yapılan yavaş salınımlı iki enjeksiyon uygulamasını karşılaştırdıkları çalışmada, en yüksek süperovulatör yanıtı, iki enjeksiyon uygulanan protokolden aldıklarını bildirmişlerdir. Çoklu enjeksiyon grubunda yükselmiş kortizol konsantrasyonunun hayvanlarla uğraş sıklığının sebep olduğu, en yüksek stres seviyelerini gösterdiği ifade edilmiştir.

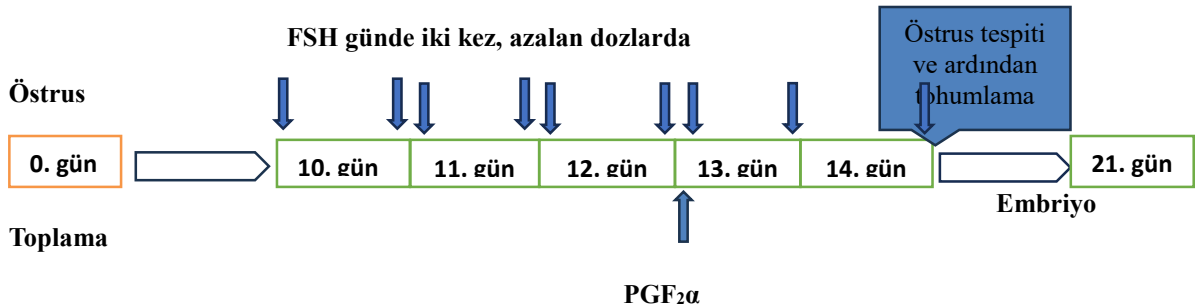
2.9. Sığırlarda Süperovulasyon Yöntemleri

2.9.1. Geleneksel Yöntem

Sığır embriyo transfer uygulamalarının başladığı ilk zamanlarda eCG ile süperovulasyon uygulamaları, hayvanlarda doğal luteolizisin gerçekleştiği (östrus siklisunun yaklaşık 16. günü) yani lutealden foliküler aşamaya geçiş sırasında yapılmaktaydı (Betteridge 1977). Hafez ve ark. (1963)'nın geliştirdiği bir protokol o zamanlar sığır süperovulasyonlarında kullanılan standart bir protokol haline gelmişti. 1970'li yıllarda PGF_{2α} 'nın süperovulasyon protokollerinde kullanılmaya başlamasıyla, siklusun 16. günü yapılan eCG uygulaması yerine, siklusun herhangi bir gününde gonadotropin uygulamalarına başlanması mümkün olmuştur. Uygulayıcıların çoğu orta siklusta başlamayı tercih etmişlerdir. Phillippo ve Rowson (1975) en yüksek süperovulasyon yanıtının eCG'nin östrus siklisunun 8 ve 12. günleri arasında uygulandığında alındığını bildirmişlerdir. Tüm eCG'li protokollerde gonadotropin tedavilerinden 48 saat sonra PGF_{2α} enjeksiyonu ile luteolizis indüklenmektedir. Çoğu uygulayıcı tarafından eCG'den FSH'ya geçişin ana sebebi tek bir eCG enjeksiyonundan sonra ovaryumların uzamış stimülasyonu ile ilişkili sorunlardan kaynaklanmaktadır (Mapletoft 2018). FSH'nın yarılanma ömrünün 5 saat ya da daha az olduğu bildirilmekte bu yüzden süperovulasyonu başarılı bir şekilde uyarabilmek için FSH'yı günlük iki kez kas içi olarak 4 ya da 5 gün uygulamak gerekmektedir. Kullanılacak FSH dozu, ham hipofiz ekstraktları için 28-50 mg ya da kısmen saflaştırılmış hipofiz ekstraktı için 400 mg NIH-FSH-P1 olarak bildirilmiştir (Mapletoft ve Bo 2012; Bo ve Mapletoft 2014; Mapletoft 2018).

Geleneksel olarak süperovulasyon uygulamalarına östrüstan 8-12 gün sonra, ikinci foliküler dalganın başında başlanılmaktadır (Lindsell ve ark. 1986). Sığırlarda foliküler dalga sayısı bireysel olarak değişmektedir (Genelde 2 ya da 3 dalgalı seyir izlemekte). Dalga sayısına göre ikinci dalganın çıkış zamanını 1-2 gün değiştirmektedir. Fakat en iyi süperovulator yanıt, 1-2 gün önce ya da sonradan ziyade foliküler dalganın ortaya çıktığı gün başlanıldığında alınmaktadır (Nasser ve ark. 1993; Adams ve ark. 1994). Bu yüzden geleneksel protokolün iki dezavantajı bulunmaktadır: 1) Östrus tespitini yapacak ve buna yeterli zamanı ayıracak eğitimli bir personelin gerekliliği, 2) Aynı zamanda süperovulasyon işlemine başlamak için tüm donörlerin aynı anda östrüsta olma zorunluluğu (Bo ve Mapletoft. 2014). Bu gibi sebeplerden dolayı östrus takibi gerektirmeyen foliküler dalga senkronizasyon yöntemleri geliştirilmiştir.

Süperstimülasyon için gonadotropin enjeksiyonlarına başlama anında ovaryum üzerinde bulunan dominant folikülün gelişimsel aşaması süperovulasyon sonuçlarını etkilemektedir. İki ve üç dalgalı sıklusa sahip sığırlarda rastgele bir günde, interovulator aralıktaki dominant folikülün fonksiyonel olarak dominant olmama olasılığı (geç-durağan ya da gerileme dönemi) iki dalgalılar için yaklaşık %30 (20 günün 6'sı), üç dalgalılar için %35 (23 günün 8'i) dir. Bu yüzden östrus siklusunun yaklaşık olarak sadece %20 (4-5 gün)'si foliküler dalga çıkma zamanında gonadotropin uygulamalarına başlamak için müsait olacaktır. Bu yüzden östrus siklusunun %80'i optimal bir süperovulasyon yanıtı için uygun görülmemektedir. Bu nedenle günümüzde kullanılan tedavi protokollerinin çoğu foliküler dalga çıkmasının ekzojen kontrolünün ardından süperstimülasyon uygulamalarına başlamayı içermektedir (Mapletoft ve Bo. 2012).



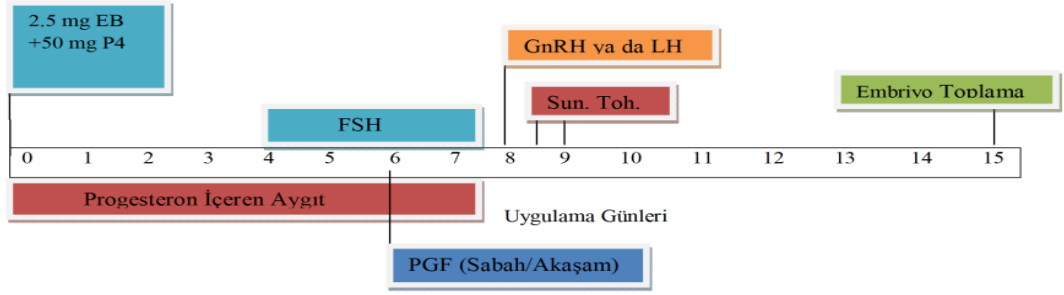
Şekil 2.2. Örnek geleneksel süperovulasyon protokolü (<https://www.hormonuzmani.com>).

2.9.2. Foliküler Dalga Senkronizasyonu

Foliküler dalga senkronizasyonu 3 yöntem kullanılarak yapılmaktadır.

2.9.2.1. Progesteron ve Östradiol kullanımı

Bu yöntemle östrus siklusunun aşamasına bakılmaksızın ve gonadotropin uygulamalarına başlamak için 8-12 gün beklemeye gerek kalmadan etkili bir şekilde süperstimülasyona başlanmaktadır. Süperstimülasyon için yeni bir foliküler dalganın çıkmasını senkronize etmek için kullanılan en yaygın protokol; 2.5-5 mg estradiol-17 β ya da 2-2.5 mg estradiol benzoat ile birlikte 100 yada 50 mg progesteronun, vajina içi progesteron aygıtının yerleştirilmesi anında kas içi enjeksiyon şeklinde yapılmasıyla başlanılmakta, östradiol enjeksiyonları progesteronun varlığında FSH salınımını baskılamakta ve foliküllerde gerilemeye neden olmaktadır. Östradiol metabolize olduğunda FSH salınımı ve yeni foliküler dalga çıkması uygulamadan yaklaşık 4 gün sonra olmaktadır (Bo ve Mapletoft 2014). Bu yöntemle süperstimülasyon sonrası ineklerde transfer edilebilir embriyo sayısı, östrus tespitinden 8-12 gün sonra başlanan geleneksel yöntemden her zaman daha fazla olmamakta fakat östradiol ve progesteron tedavileri sonrası süperstimülasyon yapılmış ineklerdeki fertilizasyon oranları, geleneksel yöntemle göre önemli derecede yüksek bulunmuştur (Bo ve ark. 1995). Östradiol ve progesteron uygulaması ile foliküler dalga senkronizasyonunun sadece süperstimülasyon öncesi östrus senkronizasyonu ile kızgınlık tespiti gereksinimini ortadan kaldırmadığı aynı zamanda oosit-embriyo kalitesini de geliştirdiği ifade edilmektedir (Bo ve Mapletoft 2014). Ancak östradiolün dünyanın birçok yerinde ve ülkemizde kullanımının yasaklanması araştırmacıları östradiolün olmadığı yeni uygulama girişimlerini geliştirmeye yöneltmiştir (Mapletoft ve ark. 2002; Baruselli ve ark. 2006; Bo ve ark. 2006).



Şekil 2.3. Östradiol benzoat+ progesteron ile yapılan foliküler dalga senkronizasyonu ve süperovulasyon uygulaması (Bo ve ark. 2004).

2.9.2.2. Folikül Aspirasyonu

Östrus siklusunun aşamasına bakılmaksızın 5 mm ve daha büyük tüm foliküllerin transvaginal ultrason rehberliğinde aspirasyonu, foliküler dalga senkronizasyonunda kullanılan en etkili yöntemdir (Bergfelt ve ark. 1994; Garcia ve Salaheddine 1998). Bu uygulamaya alternatif olarak dominant folikülün diğer foliküller üzerine baskılayıcı etkisini kaldırmak için transvaginal ultrason rehberliğinde iki en büyük folikülün aspirasyonundan 1-2 gün sonra süperovulasyon işlemine başlanabilmektedir (Bungartz ve Niemann 1994; Bergfelt ve ark. 1997). Bu yöntemde, aspirasyon işleminden sonra foliküler dalga 1-2 gün içinde çıkmaktadır. Folikül aspirasyonunun son derece etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir fakat bu yöntemin kullanılmasında ultrason ekipmanı ve eğitimli personel gerekliliği nedeniyle embriyo üretim merkezlerinin kullanımı için daha uygun olduğu, saha şartlarında uygulanması zor bir yöntem olduğu ifade edilmektedir (Bo ve Mapletoft. 2014).

Folikül ablasyonu (aspirasyonu) sonrası başlanan süperovulasyon protokollerinin neredeyse tamamı östrus siklusunun rastgele bir döneminde 5 mm ve üzerindeki tüm foliküllerin ya da ovaryum üzerindeki iki en büyük folikülün aspirasyonunun ardından 1 ya da 2 gün sonra gonadotropin uygulamalarına başlama şeklinde yapılmaktadır (Mikkola ve ark. 2020). Ancak El-Sherry ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada, siklusun 9 ve 10. günlerinde PG (PGF 2α) enjeksiyonu uygulandıktan 36 saat sonra folikül aspirasyonu ve ardından 1 gün sonra FSH enjeksiyonlarına başlandığında süperovulasyondan aldıkları sonuçların farklı olduğunu bildirmişlerdir. Yani her ne kadar foliküler dalga senkronizasyonunda, folikül aspirasyonu yönteminin östrus siklusunun rastgele bir gününde

iki en büyük folikülün aspirasyonundan sonra başlanır dense de El-Sherry ve ark. (2012)'nin çalışmasında olduğu gibi; siklusun 12. gününde (aspirasyon zamanında) mevcut dominant folikülün çoktan aktivitesini kaybettiği yeni foliküler dalganın çıkmış olduğu ve yeni dalgadan gelmiş olan çok sayıda 5 mm ve daha büyük foliküllerin mevcut olacağı ve bunların hepsinin aspirasyonunun zor olabileceği, aspirasyonu yapılamayan foliküllerden bir tanesinin dominant hale gelip diğer foliküllerin büyüme ve ovulasyonlarını baskılayabileceği tezini doğrulamışlardır. Siklusun 11. gününde yapılan aspirasyondan sonra daha iyi bir yanıtın alınmasını da mevcut dominant folikülün hala aktif olmasına, dominant ve bir subordinant folikülün uzaklaştırılmasının çok daha kolay olmasına bağlamışlardır.

El-Sherry ve ark. (2012) yaptıkları başka bir çalışmada spontan ovulasyondan 1 gün sonra ile (önceki çalışmalarındaki) 11 ve 12. günlerde folikül aspirasyonu sonrası başlanan süperovulasyon protokollerinin sonuçlarını karşılaştırdıklarında, her üç protokolde de dominant folikül ve CL olmadığı halde spontan ovulasyondan 1 gün sonra başlanan protokolde foliküler dalga sonrası ortaya çıkan folikül sayısı daha düşük bulunmuştur. Bunu da FSH'nin salınım profillerinin farklı olmasına bağlamışlardır. Foliküllerin ovulasyonu durumunda FSH iki salınım sahiptir. 1. salınım ovulatör LH salınımı ile ilişkili olan preovulatör salınım, 2. salınım ise foliküler dalga ortaya çıkması için olan periovulatör salınımıdır. CL'siz folikül aspirasyonundan sonra ise FSH muhtemeldir ki bir salınım sahiptir ve bu salınım ovulasyonlu olana göre daha yüksektir. Folikül aspirasyonu sonrası daha yüksek salınan endojen FSH'da foliküler havuzdan daha fazla sayıda folikül çıkarmaktadır.

Cirit ve ark. (2019) laktasyondaki Simental ineklerde, folikül aspirasyonunun ardından 1 ya da 2 gün sonra süperstimülasyona başlamanın ve FSH uygulamasının geleneksel 4 gün yerine 6 güne uzatılmasının süperovulatör yanıt ve embriyo verimine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, uzatılmış süperovulasyon programına başlarken folikül aspirasyonu sonrası 2 gün beklemenin transfer edilebilir ve dondurulabilir embriyo sayısını artırma potansiyeline sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Transfer edilebilir ve dondurulabilir embriyo sayıları da FA1 ile FA2 gruplarında sırasıyla 6.4-3.5 ve 8-5.3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada FSH uygulama süresini uzatma amacı olarak da foliküler dalga içindeki küçük antral foliküllerin büyümesine, onların tohumlama öncesi LH ve ovulasyona yanıt verebilecek olgunluğa ulaşmalarına fırsat vermek olduğu bildirilmiştir.

Surjus ve ark. (2014) ovum pick-up (OPU) dan 1 ya da 2 gün sonra süperovulasyon yapılmış ineklerde in vivo embriyo üretimini karşılaştırdıkları çalışmalarında, 2 gün beklenen grupta 1 gün beklenilene göre daha fazla dondurulabilir kalitede embriyo elde edildiğini (3.2 ± 1.1 ve 1.3 ± 0.5), OPU'dan sonra süperovulasyon yapılacak ineklerden daha fazla sayıda uygun embriyo elde etmek için FSH'ya başlamadan önce en az 2 gün beklenilmesi gerektiği tavsiye edilmiştir.

Dell'Eva ve ark. (2019)'nın süperovulasyondan önce dominant folikülün manuel transrektal ablasyonu, sütçü ineklerde embriyo üretimi ve kalitesini geliştirdiği üzerine yaptıkları, 167 Holştayn ineğin donör olarak kullanıldığı çalışmalarında, donörlerden 57'sini siklusun 7. günü ve 46'sını da siklusun 8. günü, dominant foliküllerin transrektal elle patlatılmasından 1 gün sonra FSH enjeksiyonlarına başlamışlar ve 64'ünü de kontrol olarak siklusun 10. günü geleneksel süperovulasyon protokolüne almışlardır. Süperovulasyon sonrası kontrol grubunda, toplam elde edilen yapılar ve transfer edilebilir embriyo sayıları sırasıyla 7.8 ± 4.5 ve 5.1 ± 3.3 , ablasyon 7 grubunda 9.0 ± 2.5 ve 7.0 ± 1.9 ve ablasyon 8 grubunda ise 9.6 ± 3.4 ve 6.9 ± 2.5 olarak bulunmuştur. Ayrıca ablasyon 8 grubunda 1. kalite embriyo yüzdesi %47.3 ile diğer gruplardan yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, ineklerde siklusun 7. ve 8. günlerinde dominant ovaryum folikülünün transrektal manuel ablasyonu ile embriyo sayı ve kalitesinde iyileşmeler sağlanabildiği, ayrıca makul manuel ablasyonun sonraki üreme performansı ve itlaf oranı üzerinde zararlı bir etkisi olabileceğine dair hiçbir kanıt olmadığı ifade edilmiştir.

2.9.2.3. GnRH-LH Kullanımı

Senkronize yeni bir foliküler dalga oluşturmak için bir diğer alternatif dominant folikülün ovulasyonunu uyarmak için GnRH kullanılmasıdır (Macmillan ve Thatcher 1991). Fakat östrus siklusunun rastgele bir gününde laktasyondaki ineklere $100\mu\text{g}$ GnRH uygulandığında ancak hayvanların %44.3'ünde ovulasyon şekillenmektedir (Colazo ve ark. 2009). Bu durumda GnRH kullanımı ile başlanan metotta folikül aspirasyonu ve östradiol kullanımı sonrası başlanan süperovulasyon uygulamasına göre yanıtın düşük olması şaşırtıcı değildir. Daha sonra yapılan GnRH ile foliküler dalga senkronizasyonu sonrası süperstimülasyona başlama protokollerinde, protokollere bir CIDR, PRID ya da CRESTAR (ekzojen progesteron takviyesi) eklenmiştir. Bu sayede donörlerin GnRH enjeksiyonları

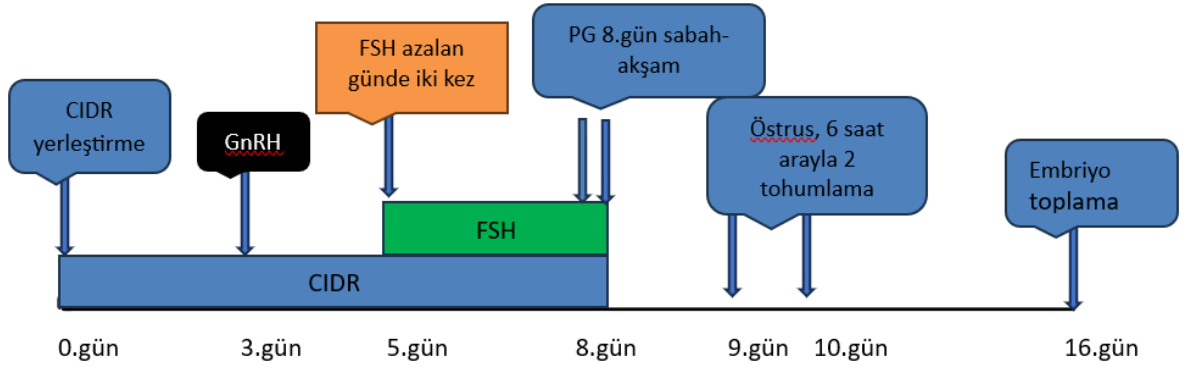
sonrası ovulasyon oranlarının artması sağlanmıştır (Bo ve ark. 2009; Jahnke ve Youngs 2021).

GnRH'nın bir östradiol ikamesi olarak etkinliğinin araştırıldığı ticari embriyo transfer verilerinin retrospektif analizine göre laktasyondaki sütçü ineklerden oluşan donör inekler üç uygulama grubuna ayrılmış 1) kontrol grubu, siklusun 7-14. günleri arasında başlanan 4 gün azalan FSH dozları şeklinde yapılan geleneksel süperovulasyon protokolü, 2) CIDR'lı östradiol-progesteron protokolü ve 3) GnRH protokolü, donörlere östrus siklusunun rastgele bir gününde CIDR yerleştirilmekte ve bu uygulamadan 1.5 gün sonra GnRH enjeksiyonu ve GnRH'dan 60 saat sonra da, 4 gün azalan dozlarda FSH enjeksiyonları yapılma şeklinde devam etmiştir. Her üç uygulamada etkili süperstimülasyonla sonuçlanmıştır. Bu çalışma ile GnRH'nın östrus siklusunun rastgele bir gününde süt sığırlarının süperstimülasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir (Steel ve Hasler 2008).

Çizelge 2.7. Üç farklı protokolle süperstimülasyon yapılmış sütçü ineklerden elde edilen ortalama oosit ve embriyo sayıları (Steel ve Hasler 2008).

Gruplar	Donör (n)	Oosit-embriyo (n)	Transfer edilebilir embriyo (n)	Embriyo alınamayan donör %'si
Kontrol	614	10.5±8.4	5.3±5.5	23.3
Estradiol 17-β	691	12.4±9.1	6.1±6.2	21.3
GnRH	245	10.6±8.6	5.6±6.0	24.9

Wock, Lyle ve Hockett (2008) donör olarak 411 sütçü ineğin kullanıldığı, GnRH'nın CIDR kullanıldığında bir süperstimülasyon protokolünde geleneksel östradiol-17β protokolüne uygun bir alternatif olup olmayacağını araştırdıkları çalışmalarında, CIDR-GnRH protokolü (şekil 2.4) ile geleneksel östradiol-17β protokolü (şekil 2.3)'nün süperovulasyon yanıtları karşılaştırılmıştır. Östradiol ve GnRH grubunda toplam oosit-embriyo sayıları, kalite ve fertilizasyon oranları karşılaştırıldığında; oosit-embriyo sayıları 9.8± 0.58 ve 9.7± 0.65, 1 ve 2. kalite embriyo ortalamaları; 4.7± 0.37 ve 4.5± 0.41 ve fertilizasyon oranları da; %54.1± 2.5 ve %53.2±2.9 olarak bulunmuştur. Her iki grup arasında istatistiksel açıdan bir farklılığın olmadığı ve GnRH'nın bir CIDR ile kombine edilmesi halinde, bir süperstimülasyon protokolünde folikül dalgası oluşumunu senkronize etmenin etkili bir yolu olduğu ifade edilmiştir.



Şekil 2.4. GnRH ile foliküler dalga senkronizasyonu sonrası başlanan protokollerden biri (Wock, Lyle ve Hockett 2008).

2.9.2.3.1. GnRH'ya Ovulasyon Yanıtının İyileştirilmesi

GnRH uygulandıktan ve senkronize bir şekilde ovulasyonların uyarılmasının ardından bir süperstimülasyon protokolü geliştirme hedefiyle bir dizi çalışma yapılmıştır (Bo ve ark. 2010). Bu yaklaşım, GnRH uygulamasından 7-10 gün önce bir progesteron gerecinin yerleştirilmesiyle persiste folikül gelişimine sebep olmak ve böylece GnRH enjeksiyonu ile ovulasyon yanıtı arttırılmış olan önceki çalışmalara dayanmaktadır (Small ve ark. 2009). Ovulasyonlar ve foliküler dalga çıkışı, GnRH enjeksiyonundan sonra 1-2 gün içinde meydana gelmiştir. Bu yaklaşımın rastgele siklustaki donör gruplarında kullanılabileceği gösterilmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda persiste folikül oluşumuna izin vermek (LH-yanıt veren folikül) için süperovulasyon protokolünün başına intravaginal progesteron cihazı yerleştirme zamanında bir PG enjeksiyon uygulaması eklenmiş bu uygulamadan 7 gün sonra GnRH yapılmasıyla hayvanların %95'inden daha fazlasında ovulasyonların meydana gelmesi sağlanmıştır (Bo ve ark. 2008). Bu yöntemle folikül aspirasyonu ve östradiol kullanımı sonrası başlanan karşılaştırmalı çalışmalarda, transfer edilebilir embriyo sayısı bakımından bir fark olmadığı ortaya konmuştur (Wock ve ark. 2008).

2.9.2.3.2. Persiste Ovaryum Folikülü Nasıl Gelişir?

Persiste folikül, uzamış bir fonksiyonel dominantlık sergileyen ve regresyona gidememiş statik fazda kalmış olan bir dominant foliküldür. Bu foliküller östrojen aktif olarak kalırlar yani folikülün granüloza hücrelerinden östrojen sentezi devam eder. Persiste ovaryum foliküllerinin gelişmesi için başlangıçta korpus luteumun lizisi sağlanır ve daha sonra östrus siklisunu kontrol etmek için kullanılan ticari progesteron içeren vajina içi cihazlar (PRID veya CIDR) ile tedavinin sonucu olarak oluşturulan düşük progesteron ortamında (1-2 ng/ml) persiste ovaryum folikülü gelişir. Korpus luteumun olmadığı eksojen progesteron uygulaması sırasında LH'nın salgılanma biçimi östrus siklusunun foliküler fazı ile benzerdir (Kinder ve ark. 1996). Bir folikülün persiste olmasına artmış pulzatil LH sekresyonu sebep olmaktadır. LH'nın pulzatil salınım sıklığı dolaşımdaki progesteron seviyelerinden etkilenmektedir. Bir korpus luteumun yokluğunda en yaygın olarak kullanılan progesteron kaynakları, normal östrus siklusu sırasında var olan korpus luteumdan üretilen miktardan çok daha düşük seviyede progesteron salgılamaktadır. Progesteronun subluteal seviyeleri preovulatoer LH salınımını engellemektedir fakat LH'nın gelişmiş pulzatil sekresyonunu baskılayamamaktadır. LH'nın artmış puls frekansı da bir dominant folikülün uzamış varlığından sorumludur (Taft ve ark. 1996).

Persiste ovaryum folikülleri, normal dominant foliküle göre granüloza ve teka hücreleri üzerinde çok daha fazla sayıda LH reseptörleri taşır. Persiste ovaryum foliküllerindeki LH reseptör popülasyonunun çok daha fazla olması persiste foliküllü ineklerdeki LH'nın pulsatil salınımının daha büyük frekanslı ve genişliğinin de azalmış olmasından kaynaklanmaktadır. Düşük doz (1-2 ng/ml) eksojen progesteron uygulaması sırasında daha büyük frekanslı pulsatil LH salınımının sonucu olarak normal östrus siklusu sırasında gelişen dominant folikül ile karşılaştırıldığında persiste folikül çok daha fazla miktarda 17- β östradiol üretmektedir (Kinder ve ark. 1996).

GnRH ya da LH uygulamalarından sonra dominant foliküllerin %85'inde ovulasyonlar ortalama 23-54 saatler arasında meydana gelir. Yeni bir foliküler dalganın ortaya çıkması da ortalama 2.10 ± 0.58 gün alır (Picard-Hagen, Nicole ve ark. 2015). Bu aralıktan dolayı GnRH ile başlanan gonadotropin uygulamalarında, uygulamaya GnRH enjeksiyonundan 36, 48 ve 60 saat sonra başlanmaktadır.

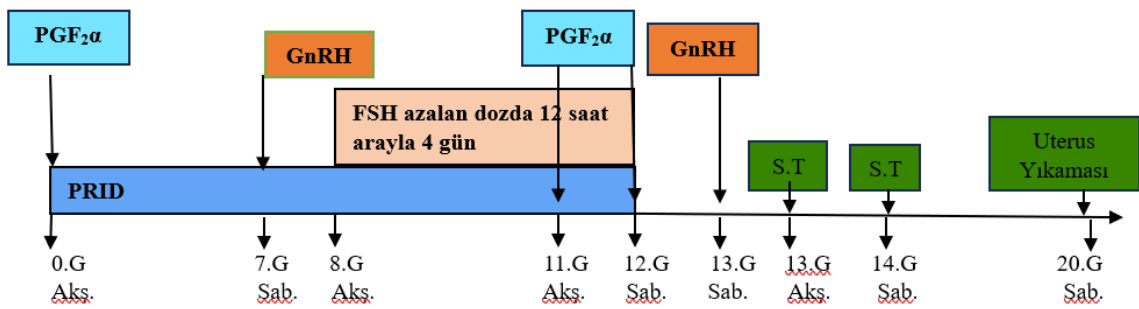
GnRH'lı yapılan bir protokolde, intravaginal progesteron cihazının süperovulasyon uygulaması boyunca GnRH enjeksiyonu sırasında çıkarılmasının gerekli olup olmadığının tespiti yönünde bir çalışma yapılmış ve tüm donörlere östrüs siklusunun rastgele gününde PGF2 α ile beraber Cue-Mate uygulanmıştır. Grup1'de 5 gün sonra Cue-Mate uzaklaştırma anında 2. doz PGF2 α ve 36 saat sonra GnRH enjeksiyonları yapılmıştır. GnRH enjeksiyonundan sonraki 36. saat 0. gün kabul edilip yeni bir Cue-Mate yerleştirilmiştir ve FSH enjeksiyonlarına başlanmıştır. Grup 2'de grup 1'deki aynı tedavi uygulanmış sadece Cue-Mate çıkarılmamış son FSH ile birlikte Cue-Mate uzaklaştırılmış, PGF2 α enjeksiyonu son iki FSH ile birlikte yapılmıştır. Ovulasyon oranları sırasıyla 86.5%- 89.2%, transfer edilebilir embriyo sayıları 4.1 ± 0.6 ve 5.7 ± 0.7 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak GnRH ile ovulasyonu (senkronize foliküler dalga çıkarmak) senkronize etmek için intravaginal cihazın uzaklaştırılmasının gerekli olmadığına karar verilmiştir (Guerrero ve ark. 2009).

Yine yapılan başka bir çalışmada, Cue-Mate yerleştirildiğinde PGF2 α yapılmış bundan 7 gün sonra GnRH ile ovulasyon indüklenmiş GnRH dan 36 saat sonra FSH uygulamasına başlanılmış, GnRH içeren bu protokol progesteron+östradiol ile karşılaştırılmış sonuçlar transfer edilebilir embriyo sayısı bakımından sırasıyla 7.7 ± 1.6 ve 6.8 ± 1.7 olarak bulunmuştur (Guerrero ve ark. 2009).

Süperovulasyon protokollerinde, senkronize foliküler dalga çıkarmak amacıyla GnRH'nın etkinliğinin araştırıldığı, 66 etçi sığırın donör olarak kullanıldığı bir çalışmada; 1) bir progesteron cihazı yerleştirilmesi ile birlikte PGF2 α enjeksiyonu uygulamasından 7 gün sonra GnRH'nın uygulandığı bir protokol ile 2) bir progesteron cihazının yerleştirilmesinden 2 gün sonra uygulanan GnRH ile senkronize foliküler dalga çıkışını takiben süperstimülasyona başlanan bir protokolün süperovulasyon sonuçları oosit/embriyo sayıları, transfer edilebilir embriyo ve 1. kalite embriyo sayıları yönünden karşılaştırılmıştır. 1. grupta; toplam oosit/embriyo: 19.5 ± 1.7 , transfer edilebilir kalitede embriyo: 14.8 ± 1.5 ve 1. kalite embriyo: 8.9 ± 1.2 olarak, 2. grupta; toplam oosit/embriyo: 18.6 ± 1.9 , transfer edilebilir kalitede embriyo: 12.7 ± 1.5 ve 1. kalite embriyo: 7.2 ± 1.3 sonuçları elde edilmiştir. Grup 1'de 2 daha fazla transfer edilebilir embriyo elde edilmesine rağmen farklılıklar önemsiz bulunmuştur. Bu protokol daha sonra 214 etçi inekte uygulanmış, transfer edilebilir embriyo sayıları donör başına 7.9 olarak bulunmuştur. Sonuçlar etçi ineklerin süperstimülasyonu için her iki yaklaşımda etkili olduğunu göstermiştir (Hinshaw ve ark. 2015).

Bir süperstimülasyon başlangıcında korpus luteumun lizisini takiben endojen progesteronun yokluğunda LH'yı baskılayacak düzeyde progesteron olmadığından foliküler dalgaya dahil olan foliküllerin, yüksek progesteronlu ortama göre çapları daha fazla olmakta ve sayıları da artmaktadır. Foliküllerde artan östradiol hipofizden GH (Growth Hormon) salınımını uyarmakta, GH' da büyüyen folikül sayısını artırmakta ve foliküler atreziyeyi baskılamaktadır. GH ve östradiol, insülin like growth factor (IGF-1)'in sekresyonu için karaciğeri uyaramaktadır. Growth hormon aynı zamanda granüloza hücrelerinden IGF-1 sekresyonunu stimüle etmektedir. FSH, E2, GH, ve IGF-1 in etkileşimi foliküler dalgaya yüksek sayıda folikül sağlayabilmektedir. Sonuçta subluteal progesteron (1-2 ng/ml) ortamında östradiolün hem GH hem de IGF-1'i kontrol ederek folikül popülasyonunu artırmada kilit rol oynadığı düşünülmektedir (El-Sherry ve ark. 2010).

Wiley ve ark. (2019) ovaryum foliküllerinin süperstimülasyonu sırasında yüksek endojen progesteron ile subluteal progesteron seviyelerinin embriyo sayı ve kalitesi üzerine etkisini karşılaştırdıkları çalışmalarında, subluteal progesteron ortamında daha fazla 1. kalite embriyo elde edildiğini bu durumu da foliküllerde önemli oranda östradiolün artmış olmasından dolayı folikül maturasyonunun daha uzun bir sürede meydana gelmesine, aksine yüksek plazma progesteron ortamında daha fazla folikülün, folikül havuzuna girdiğini ama tohumlama ve ovulasyondan önce bu foliküllerin daha az süre östradiol ve LH etkisinde kalmasından dolayı tohumlama sırasında yeterli maturasyona uğrayamamasına bağlamışlardır.



Şekil 2.5. GnRH ile ovulasyonun uyarılmasından sonra oluşan ilk foliküler dalga sırasında uygulanan süperovulasyon protokolü (Guerrero ve ark. 2010). Donörlere östrus siklusunun herhangi bir döneminde progesteron salınımı yapan aygıt takılır ve aynı anda PgF₂α İ.m. enjeksiyonu yapılır. 7 gün sonra GnRH uygulanır ve bundan 36 saat sonra süperstimülasyon amacıyla 4 gün süreyle azalan dozda günde iki kez FSH uygulamasına başlanır. Son iki FSH enjeksiyonuyla birlikte PgF₂α enjeksiyonu yapılır ve son FSH enjeksiyonu zamanında progesteron salınımı yapan aygıt uzaklaştırılır. Son FSH enjeksiyonundan 24 saat sonra ovulasyonların uyarılması amacıyla GnRH enjeksiyonu yapılır ve bundan sonraki 12 ve 24. saatlerde donörler tohumlanır ve yedi gün sonra ovum/embriyolar toplanır.

2.10. Embriyoların Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Çizelge 2.8. Embriyo kalite derecelendirme (Stringfellow 2010)

Embriyo Kalite Kodu	Embriyo Kalite Adı
1	Mükemmel/çok iyi
2	İyi
3	Zayıf
4	Ölü/Dejenere

Sığır embriyolarının morfolojik olarak kalite ve gelişim aşamalarına göre sınıflandırılması IETS rehberine göre yapılmaktadır. IETS (Uluslararası Embriyo Teknolojileri Topluluğu) 1974 yılında kuzey Amerika’da, bilimsel keşifleri paylaşma gerekliliğine inanan uygulayıcılar ve bilim adamları tarafından kuruldu. Dünya genelinde ticari embriyo transfer endüstrisi büyüdükçe, embriyo alıcılarının ve satıcılarının pazarlanan embriyoların aşamasını ve kalitesini tam olarak bilmesini sağlayacak şekilde standartlaştırılmış embriyo terminolojisini geliştirmek kritik hale geldi. 1998 yılında IETS kılavuzlarında tavsiye ettiği, embriyoları ve özelliklerini tekdüze ve sistematik olarak tanımlayan iki haneli kodlama sistemini yayınlamıştır (Stringfellow ve Seidel 1998).

Çizelge 2.9. Embriyo gelişim aşamaları ve uluslararası kısaltmaları (Stringfellow 2010)

Gelişim Aşama Kodu	Gelişim Aşaması	Uluslararası Kısaltma
1	Fertilize Olmamış	UFO
2	2-12 Hücreli Aşama	
3	Erken Morula	M
4	Morula (Kompakt Morula)	CM
5	Erken Blastosist	EBL
6	Blastosist	BL
7	Ekspanded Blastosist	ExpBL
8	Hatched Blastosist	HedBL
9	Ekspanded Hatched Blastosist	ExpHedBl

Buna göre bir embriyonun morfolojik değerlendirilmesi tamamlandıktan sonra embriyonik gelişim aşamasına ve embriyo kalite derecesine karşılık gelen kısa çizgiyle ayrılmış iki sayı yer almaktadır. Embriyonik gelişim aşamasını tanımlamak için kullanılan

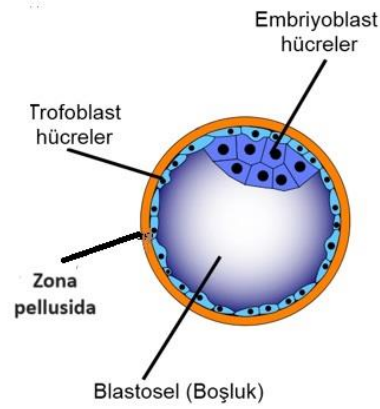
standartlaştırılmış kodlama sistemi, 1'den (döllenenmemiş bir oosit) 9'a (genişleyen zonadan çıkmış blastosist) kadar değişmekte, embriyoların morfolojik özelliklerine dayanan standardize edilmiş embriyo kalite kodu da sayısaldır ve 1 (mükemmel/iyi) ile 4 (ölü/dejenere) arasında değişmektedir (Jahnke ve ark. 2014).

2.10.1. Normal *in vivo* Sığır Embriyo Gelişimi

Bir sığır embriyosunun genel çapı 150-190 µm, bunun yaklaşık olarak 12-15µm'sini zona pellusida kalınlığı oluşturmaktadır. Zona pellusida ile kaplı embriyonun genel çapı, gelişimin 1 hücreli aşamasından blastosist aşamasına kadar neredeyse hiç değişmeden kalır. Çünkü blastomerler her hücre bölünmesinde giderek küçülmektedir. Zona pellusida, bir embriyoyu bir hücreli dönemden ekspanded blastosist aşamasına kadar çevreleyen yarı saydam bir kabuktur. Zona pellusida patojenlere karşı fiziksel bir bariyer görevi görür, sperm için reseptörler içermekte ve fazladan spermlerin ovuma ulaşmasına engel olmaktadır. Bir embriyo ekspanded blastosiste ulaştığında ve büyümeye devam ettiğinde, embriyo o kadar büyür ki zona pellusida'yı yırtar ve serbest kalır (Jahnke ve ark. 2014).

Normal *in vivo* embriyonik gelişim sırasında, blastomerler bir dizi yarıklanma bölünmesi geçirirler. Ovum fertilizasyondan sonra bölünür ve 2 hücreli bir embriyoya dönüşür, 2 hücreli 4 hücreliye, 4 hücreli 8 hücreli bir embriyoya dönüşür ve bu şekilde devam eder. Blastomerler bir salkım üzüm gibi görüldüğünde ve bireysel blastomerler ayırt edilemediğindeki embriyonik gelişim aşaması morula aşaması olarak bilinir. Embriyo dahada geliştikçe blastula oluşumu olarak da bilinen ilk farklılaşma olayına girmeye hazırlanır. Bu farklılaşma olayından hemen önce morula hücreleri sıkılaştır (kompakt) ve embriyonun iç ve dış parçalarına ayrılır (Jahnke ve ark. 2014).

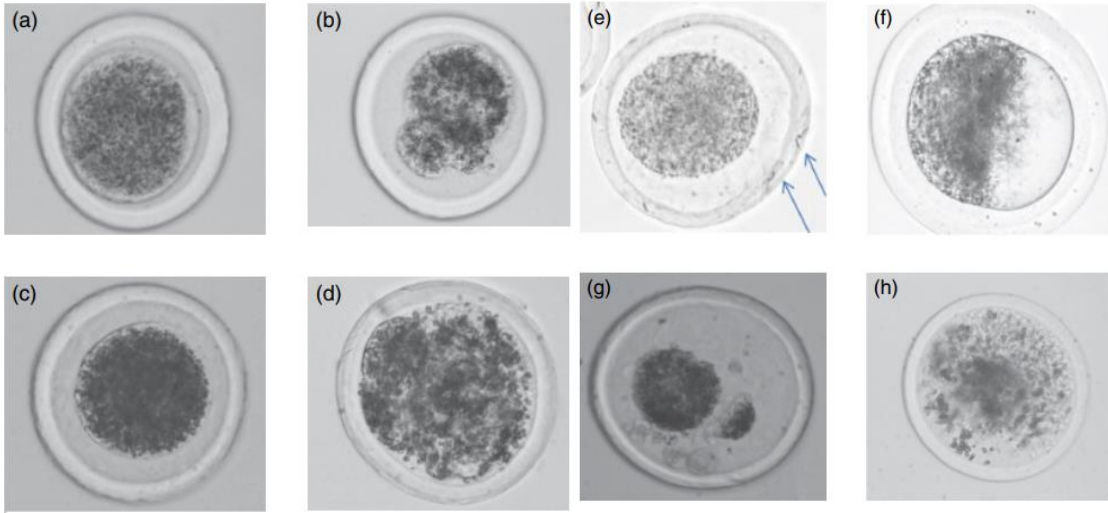
Blastosistler iki farklılaşmış hücre grubu içermektedirler: Trofoblast hücrelerinden oluşan bir dış halka ve iç hücre kümesi olarak bilinen bir iç küme hücre grubundan. Inner cell mass (ICM) olarak ta bilinen iç hücre kümesinden fetus ve plasentanın çoğu katmanı oluşurken trofoblast hücrelerinden plasentanın en dış katmanı oluşacaktır. Embriyonik gelişimin blastosist aşamasının bir diğer ayırt edici özelliği, blastosel boşluğunun bulunmasıdır. İçi sıvı dolu olan blastosel boşluğu, trofoblast hücreleri tarafından çevrelenir ve embriyonun zonadan kurtulmasından önce zona pellusidanın incelmeye yardımcı olmak için giderek büyür.



Şekil 2.6. Bir blastosistin yapısı (www.jinekolojivegebelik.com'dan alınmıştır.)

2.10.2. Embriyoları Gelişim Aşamasına Göre Sınıflandırma

Aşama Kodu 1: 1 Hücreli; Sığırlarda *in vivo* embriyo toplama, östrus ya da ovulasyonun indüksiyonu için GnRH enjeksiyonu uygulamasından 6-8 gün sonra yapılmaktadır. Eğer bu günlerde yapılan uterus yıkamasında tek hücreli bir yapı elde edilirse buna UFO (anfertilize oosit) denmektedir. Deneyimsiz teknisyenler tarafından bir UFO ile kompakt morulayı ayırt etmek zor olabilmektedir. Bir UFO'yu embriyonik gelişimin diğer aşamalarından da ayırt etmek zor olabilmektedir çünkü tüm UFO'lar aynı morfolojik görünüme sahip değildir. Birçok normal UFO mükemmel bir küresel zona pellusida'ya ve vitellin membrana, sitoplazmada nispeten homojen tanecikli ve orta derecede perivitellin alan hacmine sahiptir. Bununla birlikte diğer UFO'lar, bir blastosel boşluğunun yanılması veya hücre bölünmesinin ortaya çıkmasına ve aşırı yoğunlaşma kompakt bir morula ile kafa karışıklığına yol açabilmektedir (Bo ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).



Şekil 2.7. Deneyimsiz embriyo teknisyenleri tarafından doğru ayrımı zor kılan, siklusun 6-8. günlerinde donörlerden elde edilen UFO'lardaki son derece geniş morfolojik değişkenlik. a) pürüzsüz vitellin membranlı ve kompakt morula ile karıştırılabilen granüler sitoplazmalı fertilize olmamış oosit. b) parçalanmış unfertilize oosit. c) koyu sitoplazmaya ve pürüzsüz bir vitellin membrana sahip unfertilize oosit; kompakt bir morula ile karıştırılabilir. d) dejenere unfertilize oosit. e) açık renkli granüler sitoplazmalı unfertilize oosit; zona pellucida'ya bağlı spermere dikkat edin. f) pürüzsüz vitellin membranlı döllenmemiş oosit; ovum bir yarısında granüler diğer yarısında berraktır; blastosist aşamasındaki embriyo ile karıştırılabilir. g) parçalanmış unfertilize oosit. h) dejenere unfertilize oosit; vitellin membranın kaybına dikkat edin (Jahnke ve ark. 2014).

Aşama Kodu 2: 2-12 Hücreli; Morfolojik ve fonksiyonel farklılaşmadan önce bir preimplantasyon embriyosunun hücrelerine blastomer denmektedir. Östrusun başından 6-8 gün sonra elde edilen ve 2-12 blastomer içeren herhangi bir embriyo neredeyse kesinlikle ölü veya dejeneredir. Normal şartlar altında bu gelişim evresi, östrus siklusunun 5. gününden önce ovidukta bulunması gerekirdi. Açıkçası 2-12 hücreli bir embriyo bir şekilde hala canlı olsaydı, gelişimi ciddi şekilde gecikmiş olduğundan transfer ve kriyoprezervasyon için düşünülmemelidir (Bó ve Mapletoft. 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Aşama Kodu 3: Erken morula; 'morula' teriminin kökeni Latince dut kelimesinden gelmektedir. Embriyolar bu aşamada en az 16 hücre grubundan oluşmaktadır. Bazı bireysel blastomerlerin görülmesi kolay olsa da diğerleri kısmen görülebilir. Embriyonik gelişimin bu aşaması kriyoprezervasyon için pek uygun değildir (Bo ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Aşama Kodu 4: Kompakt morula; bu embriyolarda bulunan bireysel blastomerler, sıkıca sıkıştırılmış bir hücre topu oluşturmak için birleşmiştir. Embriyonun bu aşamasında bireysel blastomerleri ayırt etmek imkansızdır. Sıkıştırma işleminin bir parçası olarak, hücreler hücre

topunun iç kısmına ve ayrıca hücre topunun dış kısmına tahsis edilmiştir. Hücre topunun dış tarafındaki hücreler bitişik bir halkada birbirleriyle sıkı bağlantılar oluştururlar. Embriyoyu oluşturan hücreler, zona pellusida içindeki (perivitellin boşluk) boşluğun yaklaşık %60-70'ini doldurur. Embriyonun bu gelişim aşaması bir UFO ile kolaylıkla karıştırılabilir (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Aşama Kodu 5: Erken blastosist; bir erken blastosist aşamasındaki embriyonun en ayırt edici özelliği, blastosel adı verilen küçük sıvı dolu olan bir boşluğun olmasıdır. Blastosel boşluğu ve zona pellusida arasında birkaç farklılaşmış trofoblast hücreleri görülebilse de bu aşamada ICM (inner cell mass) hücrelerinden onları ayırt etmek oldukça sınırlı kalmaktadır. Embriyoyu oluşturan hücreler, perivitellin boşluğun yaklaşık olarak %70-80'nini doldurmaktadır. Bu aşamada zona pellusidanın kalınlığı önceki gelişim aşamalarındakilerle aynı kalınlıkta, değişmemiştir (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Aşama Kodu 6: Blastosist; bir blastosist aşamasındaki embriyo, normal kalınlıkta bir zona pellusida ile birlikte açıkça tanımlanmış bir trofoblast tabakasına, blastosel boşluğuna ve ICM hücre grubuna sahip olacaktır. Embriyonun kısmen kollaps (çökme) olabileceği durumlar hariç çok az perivitellin alanı olacaktır ya da hiç olmayacaktır (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Aşama Kodu 7: Ekspanded blastosist; bir ekspanded blastosist aşamasındaki embriyonun en ayırt edici özelliği genel çapında meydana gelen 1.2-1.5 kat artış ile birlikte zona pellusidanın orijinal kalınlığının üçte bir oranında incelmesidir. Blastosel boşluğundaki sıvı hacminin büyük oranda artması nedeniyle perivitellin boşluk bu aşamada mevcut değildir. İlginç bir şekilde ekspanded blastosist evresi embriyoları çoğunlukla kollabe olmuş şekilde görünmektedirler. Bu olgu kısmı bir blastosel sıvı kaybıyla karakterize edilmekte ve embriyonun zonadan çıkmasına (hatching) katkıda bulunan normal bir fenomen olduğuna inanılmaktadır. Bu aşamadan sonra bir kez incelmiş olan zona pellusida, asla orijinal kalınlığına dönmeyecektir (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Aşama Kodu 8: Hatched blastosist; hatched blastosist aşamasındaki embriyolar, hatching (zonadan çıkmakta olan) sürecine maruz kalabilir ya da zona pellusida dan tamamen kurtulabilir (hatched). Bu aşamadaki embriyolar iyi tanımlanmış blastosel boşluğu ile küresel ya da kollaps olabilir. Eğer embriyo zona pellusidadan tamamen ayrıldıysa ve neredeyse tamamen kollabse olduysa embriyonik gelişimin bu aşamasını sınıflandırması

oldukça zor olabilir. Çünkü bir parça endometrial doku parçası ile kolaylıkla karıştırılabilir. Embriyonik gelişimin bu aşamasındaki embriyolar uluslararası ticarete uygun değildirler (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Aşama Kodu 9: Expanded hatched blastosist; embriyonik gelişimin bu aşamasındaki embriyolar, aşama kodu 8 (hatched)'e tamamen benzer görünmektedir. Fakat bu aşamadaki embriyoların çapı çok daha büyüktür. Östrusun 8. gününden daha geç bir zamanda uterus yıkaması yapılmazsa bu dönem embriyolarla karşılaşmak olası değildir. Bu aşamadaki embriyolarda uluslararası ticarete uygun değildir (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

2.10.3. Embriyo Kalite Derecelendirmesi

Embriyo kalite değerlendirmesi, bir embriyonun morfolojik özelliklerinin görsel olarak değerlendirilmesiyle belirlenmektedir. Bireysel bir embriyonun kalite derecesini belirlemede kullanılan özellikler; blastomerlerin renk, büyüklük ve şekil bakımından homojenliği, ekstrüde hücrelerin (zona ile vitellin membran arasında kalmış) varlığı, ölü ya da dejenere blastomerlerin olması, sitoplazmik granülaritenin derecesi, sitoplazmik vakuollerin varlığı ve zona pellusidanın yapısal bütünlüğü bir embriyonun kalitesini belirlemede kullanılan özelliklerdir (Jahnke ve ark. 2014).

Kod 1: Mükemmel ya da çok iyi; 1. kalite embriyolar, büyüklük, renk ve yoğunluk bakımından bir örnek blastomerli, simetrik ve küresel bir embriyo kütesine sahiptirler. Embriyonik gelişim aşamasının donör hayvanın embriyo toplama günündeki östrus siklusunun günüyle uyumlu olması gerekmekte, düzensizlikler nispeten küçük ve embriyonik hücrelerin en az %85'i sağlam, canlı ve uyumlu bir küteden oluşmalıdır. Zona pellusida küresel şekilli, pürüzsüz olmalı ve embriyonun bir petri kabına veya payete yapışmasına neden olabilecek içbükey veya yassı yüzeyler içermemelidir. Kod 1 embriyolar dondurma/çözdürme prosedürlerine iyi dayanır. Bu nedenle bazı uygulayıcılar, Kod 1 embriyoları dondurulabilir embriyolar olarak tanımlamaktadırlar. Kod 1 embriyolar aynı zamanda uluslararası ticaret için tavsiye edilmektedir (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Kod 2: İyi; embriyonik kütlenin genel şeklinde ya da embriyoyu oluşturan bireysel hücrelerin büyüklük, renk ve yoğunluğunda orta düzeyde düzensizlikler vardır. Embriyonik kütlenin en az %50'si sağlam olmalıdır. Bu embriyoların dondurma/çözdürme prosedürlerine dayanıklılığı kod 1 embriyolardan daha düşüktür, fakat embriyolar uygun alıcılara taze olarak transfer edilirse gebelik oranları yeterli düzeydedir. Bu yüzden bu embriyolar genellikle transfer edilebilir olarak adlandırılır buna karşılık dondurulabilir değildirler (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Kod 3: Zayıf; bu embriyolar embriyonik kütlenin şeklinde ya da bireysel hücrelerin büyüklük, renk ve yoğunluğunda büyük düzensizliklere sahiptir. Embriyo kütlelerinin en az %25'i sağlam olmalıdır. Bu embriyolar dondurma-çözdürme işlemleri sonrası sağ kalamazlar ve gebelik oranları da eğer taze transfer için uygun taşıyıcı varsa kod 2 embriyolardan daha düşük olmaktadır (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

Kod 4: Ölü ya da dejenere; bunlar embriyolar, oositler ya da 1-hücreli embriyolar olabilirler. Kod 4 olarak sınıflandırılanlar uygun değildirler ve atılmalıdırlar. Ölü-dejenere embriyolar, son derece koyu sitoplazma, sağlam olmayan hücre zarları ve diğer önemli kusurlar nedeniyle genel olarak bu kategoriye girmektedirler.

Embriyo kalite derecesi ve transfer sonrası gebelik oranları arasında güçlü bir bağlantı olmasına rağmen bazı 1. kalite embriyolar transferden sonra gebelik üretmezken, bazı 3. kalite embriyolar beklenenden daha yüksek bir gebelik oranı sağlamaktadırlar (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014).

2.10.4. Embriyo Değerlendirme Prosedürü

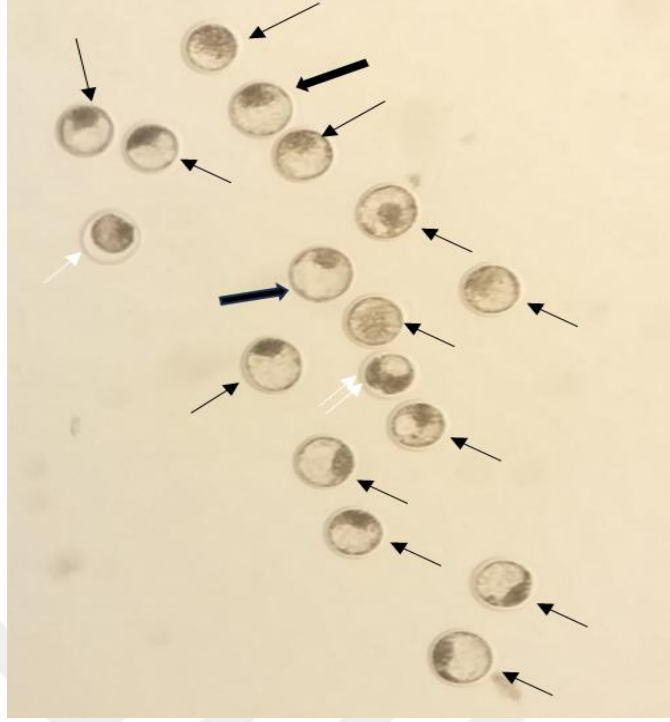
Uterus yıkama prosedürleri sırasında, embriyolar genel olarak flushing (yıkama) medyumunun hacmini azaltmak amacıyla zona filtresi kullanılarak toplanmaktadır. Bu filtrelerin bazıları tabanı çizgilidir ve doğrudan mikroskop altında embriyo aramaya uygundur. Bazıların da ise uterus yıkama içeriğinin filtreleme işleminden sonra petri kabına aktarılması gerekmektedir. Embriyolar önce yıkama medyumunu içerisinde, bir stereo mikroskop kullanılarak 10-15x büyütme altında aranır. Daha sonra embriyolar, embriyo holding medyumunun bulunduğu daha küçük hacimli petri kabına aktarılır. Embriyolar,

gelişim aşaması ve embriyo kalitesi için IETS'nin iki haneli kod sistemiyle ifade edilmeden önce minimum 50x büyütmede değerlendirilmelidir (Jahnke ve ark. 2014).

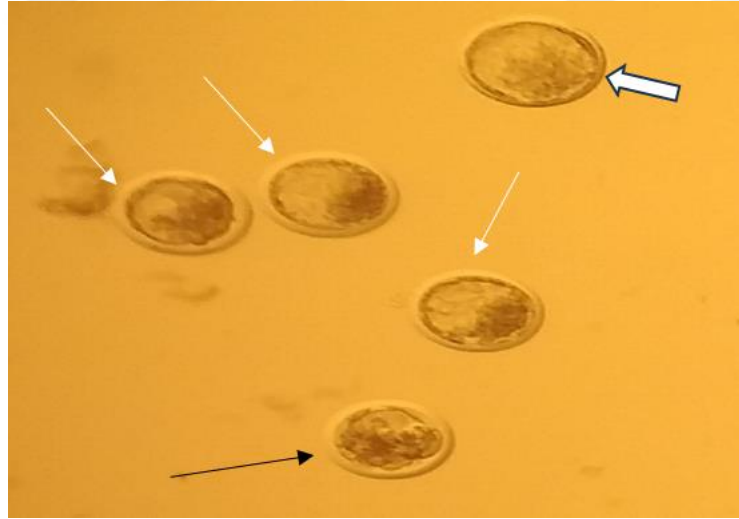
Östrüstan 7 gün sonra genellikle kompakt morula, erken blastosist ve blastosist gelişim aşamaları elde edilmektedir. Ekspanded blastosist genel olarak 8. gün yıkamalarında elde edilir ama bazen 7. gündeki embriyo geri kazanımlarında da bulunmaktadır. Zona pellusidanın yarı saydam oluşu ve ışığı yansıtma kabiliyeti, arama prosedürleri sırasında embriyo ve oositleri teknisyenlerin tanımlamasına yardım eden belirteç yapılarıdır. Bir embriyo hatched blastosist aşamasına ulaştıktan sonra zona pellusida'sız ve çökmüş görüntüsünden dolayı tanımlamak zor olabilir ve petri kabındaki endometrial hücreler veya diğer hücre atıkları ile kolay bir şekilde karıştırılabilir (Jahnke ve ark. 2014).

Bir embriyonun canlılığının en iyi göstergelerinden biri, gelişim aşaması ile östrüstan sonraki yıkama gününün uyumlu olmasıdır. Östrüstan 7 gün sonra aynı flush içinde morula ve hatching blastosist olabilir. Aynı zamanda mükemmel kalitede embriyo ile birlikte unfertilize (UFO) ve dejenere embriyolarda olabilir. Genellikle embriyo kalite ve aşamasındaki bu geniş değişkenlik, mevcut embriyoların tamamıyla normal olmadığını ve gebelik oranlarının hayal kırıklığı yaşatabileceğinin işaretleridir (Mapletoft 1986). Kompakt morula ve blastosist aşamasındaki mükemmel ve iyi kalite embriyolardan en yüksek gebelik oranlarının elde edildiği ifade edilmektedir (Hasler ve ark. 1987).

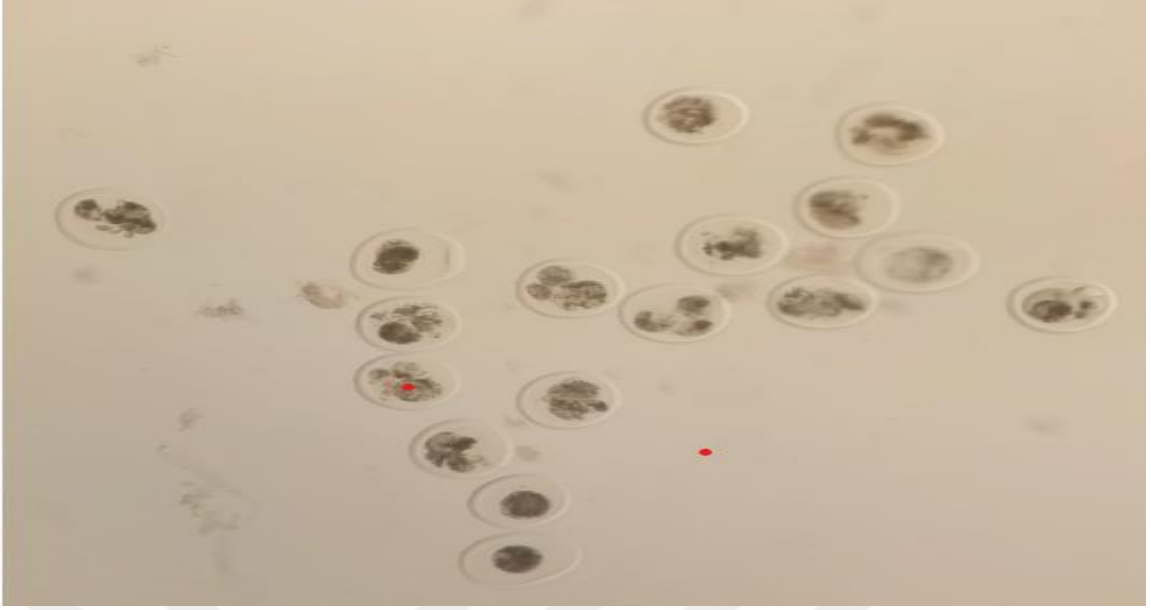
Sonuç olarak embriyo değerlendirme, embriyo transfer prosedürlerinin en kritik aşamalarından biridir. IETS Rehberi, embriyoların gelişim evrelerinin belirlenmesinde 1'den 9'a kadar olan noktalı sistemin, embriyo kalitesinin değerlendirilmesi ise 1 ila 4 arasında bir sistemin kullanılması gerektiğini belirtmektedir. Kod 1 embriyolar, dondurma-çözdürme işlemlerine iyi dayanır ve uluslararası ticaret için tavsiye edilmektedirler. Oysa kod 2 ve kod 3 embriyolar, uygun alıcılara taze olarak transfer edilmelidirler. Bu nedenle bir embriyonun transfere ya da dondurmaya değer olup olmadığını ya da ihracata uygunluğunu belirlemek embriyoyu değerlendiren kişinin uzmanlığına ve deneyimine bağlı kalmaktadır (Bó ve Mapletoft 2013).



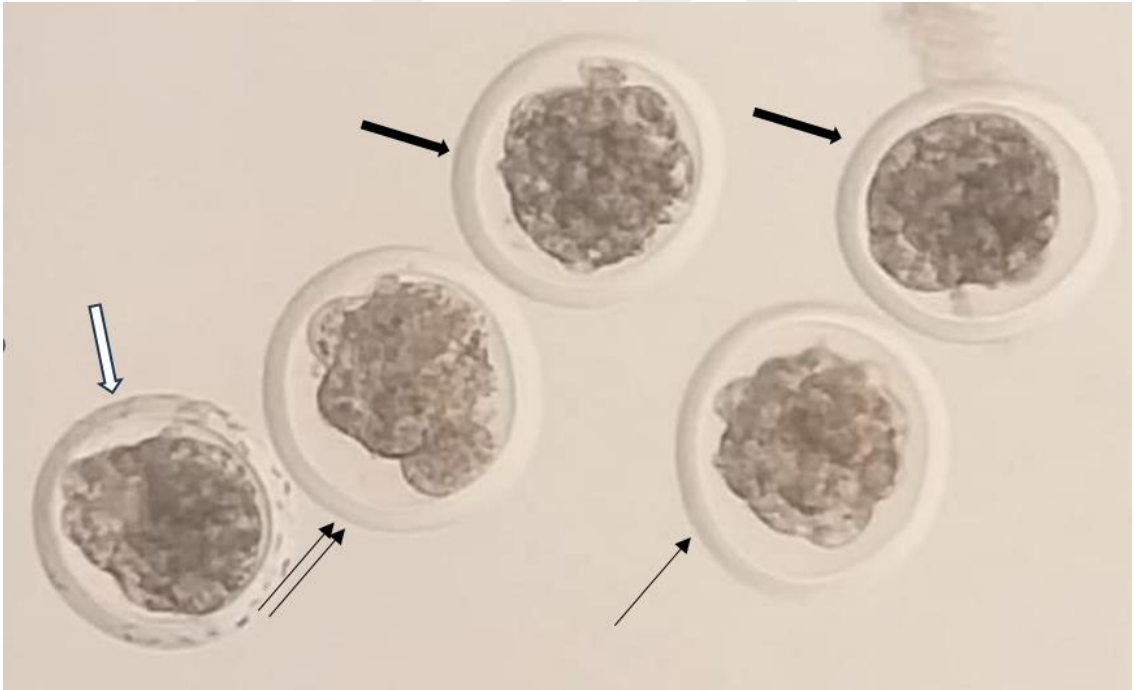
Şekil 2.8. Kod 1 (mükemmel) blastosistler (siyah ince oklar), kod 1 expanded blastosistler (siyah kalın oklar), kod 2 erken blastosist (çift beyaz ok), kod 2 kollabe olmuş expanded blastosist (tek beyaz ok) (Sunulan çalışmadan alınmıştır.)



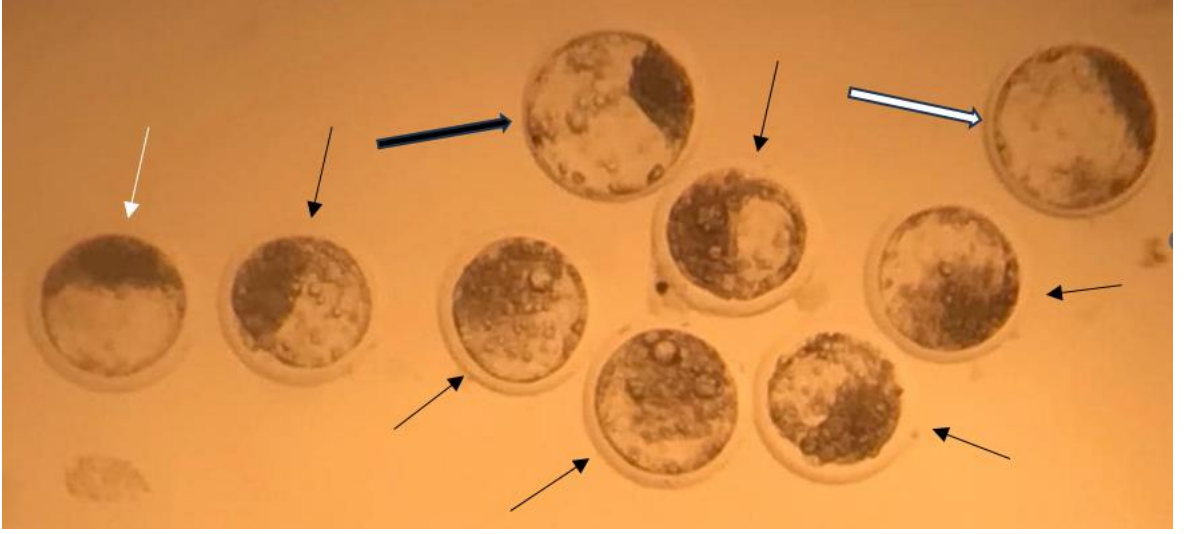
Şekil 2.9. Kod 1 expanded blastosist (kalın beyaz ok), kod 1 blastosistler (ince beyaz oklar), kod 2 blastosist (siyah ok) (Sunulan çalışmadan alınmıştır.)



Şekil 2.10. Farklı morfolojik görünüme sahip (UFO) oositler. (Sunulan çalışmadan alınmıştır.)



Şekil 2.11. Kod 1 (mükemmel) morulalar (siyah oklar), kod 1 kompakt morula (ince ok), kod 2 (iyi) kompakt morula (çift ince ok), kod 1 erken blastosist (beyaz ok) (Sunulan çalışmadan alınmıştır.)



Şekil 2.12. Kod 1(mükemmel) blastosist (beyaz ince ok), kod 1 ekspanded blastosist (kalın beyaz ok), kod 2 ekspanded blastosist (kalın siyah ok), kod 2 (iyi) blastosistler (siyah ince oklar), (Sunulan çalışmadan alınmıştır.)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereç

Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 30.01.2023 tarih ve 3 no.lu kararı ile yapılması uygun görülen sunulan çalışma, Adana Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Hayvancılık İşletmesi'nde mevcut, herhangi bir reproduktif problemi olmayan, düzenli östrus gösteren, sağılan gün sayısı 70-140 gün arasında olan, laktasyon sayısı 1-2 olan ve benzer süt verimine (ortalama 32 kg/gün) sahip, VKS'u 2.75-3.5 arası (ortalama: 3.10±0.30), yaşları 31-42 aylık arasında (ortalama:35.50±2.91) olan, 10'arlı üç grup olmak üzere toplam 30 baş Siyah-Alaca Holştayn ırkı inek donör olarak kullanıldı. Çalışmalar Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün Embriyo Üretim Merkezi'nde yapıldı. Önce hayvanlar belirlendi, sonra her gruba rastgele bir şekilde eşit olarak dağıtıldı. Çalışmalar, 2024 yılı Mart ve Nisan aylarında her gruptan 5'er hayvan olacak şekilde; Mart ayında, 5+5+5 ve Nisan ayında da 5+5+5 adet olarak toplam 30 baş hayvanın süperovulasyonu 2 ayda tamamlandı. Barınak ve bakım şartları; donör inekler yarı açık ahır sisteminde barındırıldı, tüm ahır alanlarında düzenli olarak temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri uygulandı. Ayrıca tüm sürünün sağlık taramaları için kan testleri 6 ay arayla düzenli bir şekilde yapıldı. Çalışmada kullanılan tüm donörler; IBR, BVD, EBL, BL, Brusella ve Tüberküloz hastalıkları yönünden ari durumda olması sağlandı. Donör ineklerin beslenmesi; rasyonlar hazırlanırken grupların ortalama canlı ağırlık, süt verimi, vücut kondisyon skoru değerleri dikkate alınarak National Research Council (NRC) (2001) tarafından tanımlanan formüller aracılığıyla, besin madde gereksinimi ve kuru madde tüketimleri hesaplandı. Hesaplanan bu değerler kullanılarak rasyonlarda kaba/kesif yem oranı çalışma süresince %52 olacak şekilde dengelenerek TMR (Total Mix Rasyon) oluşturuldu. Buna göre TMR içeriğini oluşturan yemler; mısır silajı, buğday samanı, kuru yonca, arpa, mısır, soya küspesi, ayçiçeği küspesi, buğday kepeği, mısır gluteni, mermer tozu, tuz ve vitamin-mineral karışımından oluşmuştur. Hayvanların su ihtiyaçları otomatik musluklardan *ad libitum* olarak sağlandı, sağımları ve yemleme işlemleri de sabah-akşam günde iki kez yapıldı.

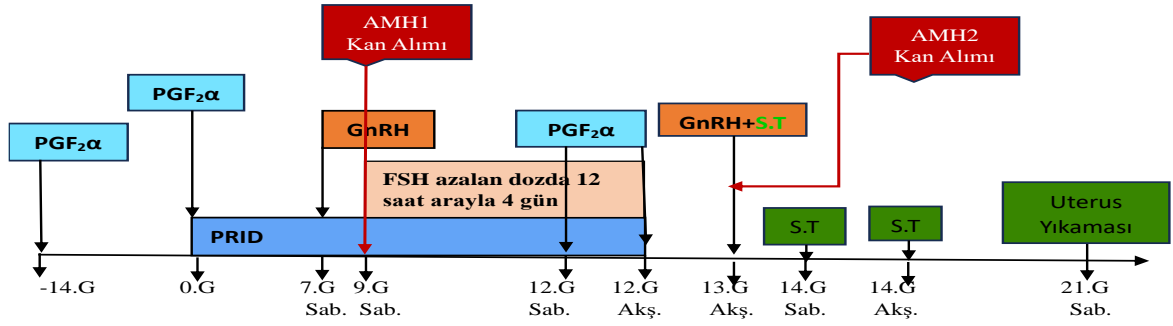
3.2.Yöntem

3.2.1. Süperovulasyon Protokolleri ve Gruplar

Çalışmanın esası protokole diöstrüste PGF2 α + PRID (Progesteron Realising Intravaginal Device) ile başlanıp subluteal progesteron ortamı oluşturmak, bu ortamda dominant folikülün persiste kalmasını yani büyümeye devam etmesini sağlamak, persiste folikülün GnRH enjeksiyonu ile ovulasyonuna ya da bu folikülün büyüklüğünden dolayı aspirasyon işleminin daha kolay bir şekilde yapılmasının sağlanmasıyla yeni bir foliküler dalga çıkmasının uyarılmasıdır. Bu amaçla östrus siklusunun rastgele bir gününde, önce transrektal ultrasonografi (5 MHz, Honda HS-102V, Japan) muayenesi ile ovaryumların kontrolü yapıp korpus luteum (CL) varlığına bakıldı, CL'lar var-yok olarak not edildi ve ardından protokole presenkronizasyon amacıyla 2 ml (150 μ g d-cloprostenol) PGF2 α (Gestavet Prost, Hipra, Türkiye) enjeksiyonu ile başlandı. 14 gün sonra protokolün 0. günü olan PGF2 α +PRID uygulaması sırasında CL'si mevcut olan hayvanlar siklik kabul edildi. Kontrol grubunda ise hayvanın siklusta olması yeterli kabul edildi.

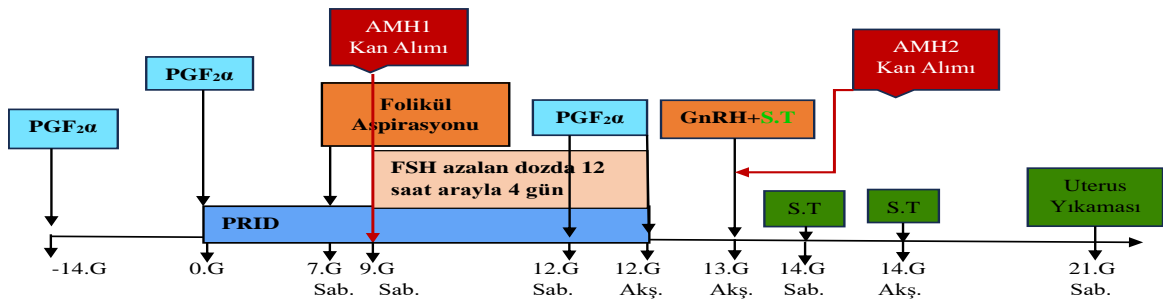
Çalışma, Guerrero ve ark. (2009)'nın bildirdiği orijinal süperovulasyon protokolü (kontrol grubu) çalışma gruplarının temelini oluşturuldu. Çalışılan araştırma ve kontrol gurupları aşağıdaki gibidir;

Grup 1- Modifiye GnRH (10 Adet): Östrus siklusunun rastgele bir döneminde presenkronizasyon amacıyla -14. gün PG uygulaması, protokolün 0. günü PRID+PG uygulaması, 7. gün sabah GnRH enjeksiyonu ile persiste folikülün ovulasyonunun uyarılması, GnRH enjeksiyonundan 48 saat sonra başlayarak azalan dozlarda 12 saat arayla 4 gün FSH enjeksiyonu, son iki FSH ile birlikte PG uygulaması ve son FSH ile birlikte PRID'lerin çıkarılması, ovulasyonların indüklenmesi için PRID uzaklaştırılmasından 24 saat sonra GnRH enjeksiyonu, son GnRH enjeksiyonu ile birlikte başlamak üzere 12 saat arayla toplam üç sabit zamanlı suni tohumlama uygulaması ve 2. tohumlamadan 7 gün sonra (protokolün 21.günü sabahı) uterus yıkaması ile ova-embriyoların toplanması (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Grup 1- Modifiye GnRH süperovulasyon protokolü (G: gün, S.T: suni tohumlama)

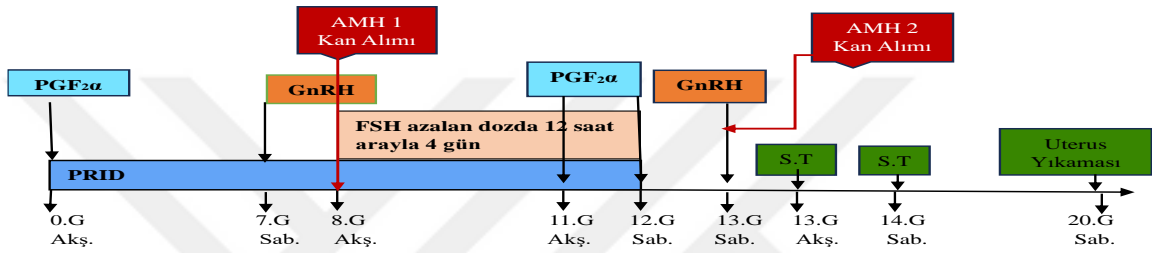
Grup 2- Modifiye Folikül Aspirasyonu (10 Adet): Östrus siklusunun rastgele bir döneminde presenkronizasyon amacıyla -14. gün PG uygulaması, protokolün 0. günü PRID+PG uygulaması, 7. gün sabah vajinadan PRID'lerin çıkarılması ve ultrasonografi rehberliğinde transvaginal folikül aspirasyonunun Kobayashi (2007)'nin tarif ettiği şekilde yapılmasının ardından hemen yeni bir PRID'in vajina içi yerleştirilmesi ve bu işlemden 48 saat sonra azalan dozlarda 12 saat arayla 4 gün FSH enjeksiyonu, son iki FSH ile birlikte PG uygulaması ve son FSH ile birlikte PRID'lerin çıkarılması, ovulasyonların indüklenmesi için PRID uzaklaştırılmasından 24 saat sonra GnRH enjeksiyonu, donörlere GnRH enjeksiyonu ile birlikte başlamak üzere 12 saat arayla toplam üç sabit zamanlı suni tohumlama uygulaması yapılması ve 2. tohumlamadan 7 gün sonra (protokolün 21.günü sabahı) uterus yıkaması ile ova-embriyoların toplanması (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Grup 2- Modifiye folikül aspirasyonu süperovulasyon protokolü (G: gün, S.T: suni tohumlama)

Grup 3- Kontrol Grubu (10 Adet): Grup 1 ve 2'den farklı olarak presenkronizasyon işlemi yapılmadan, Guerrero ve ark. (2009)'nın bildirdiği orijinal protokol uygulandı. Protokol şu şekildedir: Östrus siklusunun rastgele bir döneminde protokolün 0. günü akşam PRID+PG

uygulamasını, 7. gün sabah GnRH enjeksiyonu ile persiste folikülün ovulasyonunun uyarılması, GnRH enjeksiyonundan 36 saat sonra başlayarak azalan dozlarla 12 saat arayla 4 gün FSH enjeksiyonları yapılması, son iki FSH ile birlikte PG uygulaması ve son FSH ile birlikte PRID'lerin çıkarılması, süperstimüle foliküllerin ovulasyonlarının indüklenmesi için PRID uzaklaştırılmasından 24 saat sonra GnRH enjeksiyonu, donörlere bu uygulamadan 12 ve 24 saat sonra sabit zamanlı suni tohumlama uygulamaları yapılması ve 7 gün sonra yani 20. gün sabah flushing uygulaması ile ova-embriyoların toplanması (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Grup 3- Kontrol grubu süperovulasyon protokolü (G: gün, S.T: suni tohumlama)

3.2.1.1. Süperovulasyon Protokollerinin Uygulanması

Grup 1'de protokolün -14. günü presenkronizasyon amacıyla 2 ml (150 µg d-cloprostenol) PGF2α (Gestavet Prost, Hipra, Türkiye) intramusküler (i.m) olarak uygulandı. Protokolün 0. günü transrektal ultrasonografi (5 MHz, Honda HS-102V, Japan) muayenesi ile ovaryumlarda CL (korpus luteum) varlığına bakıldı, kontrol edilen tüm donör ineklerde CL varlığı doğrulandıktan sonra 2 ml PGF2α enjeksiyonu yapıldı ve intravaginal 1.55g progesteron içeren PRID-DELTA (Ceva, Türkiye) yerleştirildi. 7. Gün sabah ovaryumlar, dominant folikülün büyüklüğü ve hangi ovaryumda olduğu yönünden kontrol edildi. Persiste folikülün ovulasyonunun indüklenmesi için GnRH analogu olan 50 µg Lesirelin (Lecibreed, Vetaş, Türkiye) i.m enjeksiyon şeklinde yapıldı. 9. gün sabahtan 12. gün akşama kadar 12 saat arayla azalan dozlar şeklinde 8 adet FSH (Stimufol, Reprobiol, Belgium) enjeksiyon (1. gün 100/100 µg, 2. gün 75/75 µg, 3. gün 50/50 µg, 4. gün 25/25 µg) uygulaması, toplam 500 µg Follitropin i.m olarak uygulandı. Kullanılan FSH preparatı Stimufol 10 ml; Porcine Follitropin: 500 µg ve Porcine Lutropin: 100 µg içeriklidir. FSH enjeksiyon dozları ml

olarak; 2-2 ml, 1.5-1.5 ml, 1-1 ml, 0.5-0.5 ml şeklinde yapıldı. 12. gün sabah ve akşam 7 ve 8. FSH enjeksiyonları ile birlikte 2 ml (150 µg, d-Cloprostenol) PGF2α (Gestavet Prost, Hipra, Türkiye) enjeksiyonları yapıldı. Son FSH enjeksiyonu ile birlikte PRID' ler çıkarıldı. 13. gün akşam süperstimüle edilmiş foliküllerin ovulasyonlarının uyarılması amacıyla 2 ml (50 µg lesirelin) GnRH (Lecibreed, Vetaş, Türkiye) enjeksiyonu ile birlikte 1. suni tohumlama yapıldı. Tohumlamalar daha önce fertilitesi denenmiş olan iki farklı ticari boğa sperması ile son FSH enjeksiyonlarından sonraki 24, 36 ve 48. saatlerde olmak üzere üç kez, donmuş-eritilmiş birer adet 0.25 ml'lik ticari sperma payetleri kullanılarak, rektovajinal suni tohumlama yöntemiyle yapıldı.

Grup 2'de protokolün -14. günü presenkronizasyon amacıyla 2 ml (150 µg d-cloprostenol) PGF2α (Gestavet Prost, Hipra, Türkiye) intramusküler (i.m) olarak uygulandı. Protokolün 0. günü transrektal ultrasonografi (5 MHz, Honda HS-102V, Japan) muayenesi ile ovaryumlarda CL (korpus luteum) varlığına bakıldı, kontrol edilen tüm donör ineklerde CL varlığı doğrulandıktan sonra 2 ml PGF2α enjeksiyonu yapıldı ve intravajinal 1.55g progesteron içeren PRID-DELTA (Ceva, Türkiye) yerleştirildi. 7. Gün sabah önce vajinada bulunan PRID'ler çıkarıldı sonra ovaryum kontrolleri yapıldı, ovaryumlar üzerinde bulunan 10 mm ve daha büyük foliküllerin aspirasyon işlemi, Honda HS-2000 (5 MHz, Honda HS-2000 VET, Japan) ultrasona monte edilmiş ve aspirasyon iğnesi ihtiva eden 7.5 MHz konveks OPU probu ile Kobayashi (2007)'nin tarif ettiği şekilde yapıldı. Folikül içeriğinin tam olarak boşaldığının tespit edilmesi sonrası vajinaya yeni bir PRID yerleştirildi. 9. gün sabahtan 12. gün akşama kadar 12 saat arayla azalan dozlar şeklinde 8 adet FSH (Stimufol, Reprobol, Belgium) enjeksiyon (1. gün 100/100 µg, 2. gün 75/75 µg, 3. gün 50/50 µg, 4. gün 25/25 µg) uygulaması, toplam 500 µg Follitropin i.m olarak uygulandı. Kullanılan FSH preparatı Stimufol 10 ml; Porcine Follitropin: 500 µg ve Porcine Lutropin: 100 µg içeriklidir. FSH enjeksiyon dozları ml olarak; 2-2 ml, 1.5-1.5 ml, 1-1 ml, 0.5-0.5 ml şeklinde yapıldı. 12. gün sabah ve akşam 7 ve 8. FSH enjeksiyonları ile birlikte 2 ml (150 µg, d-Cloprostenol) PGF2α (Gestavet Prost, Hipra, Türkiye) enjeksiyonları yapıldı. Son FSH enjeksiyonu ile birlikte PRID' ler çıkarıldı. 13. gün akşam sabit zamanlı tohumlama ve süperstimüle edilmiş foliküllerin ovulasyonlarının uyarılması amacıyla 2 ml (50 µg lesirelin) GnRH (Lecibreed, Vetaş, Türkiye) enjeksiyonu ile birlikte 1. suni tohumlama yapıldı. Tohumlamalar daha önce fertilitesi denenmiş olan iki farklı ticari boğa sperması ile son FSH enjeksiyonlarından

sonraki 24, 36 ve 48. saatlerde olmak üzere üç kez, donmuş-eritilmiş birer adet 0.25 ml'lik ticari sperma payetleri kullanılarak, rektovajinal suni tohumlama yöntemiyle yapıldı.

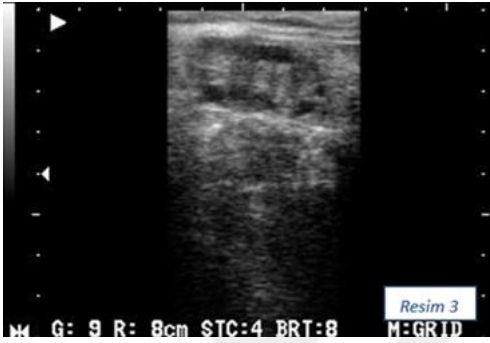
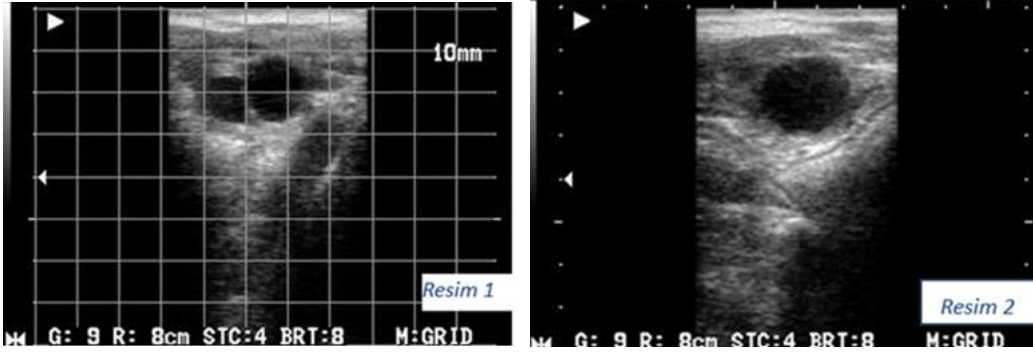
Kontrol grubunda protokolün 0. günü akşam, transrektal ultrasonografi (5 MHz, Honda HS-102V, Japan) muayenesi ile ovaryumlarda CL varlığına bakıldı, sonra 2 ml (150 µg, d-Cloprostenol) PGF2α (Gestavet Prost, Hipra, Türkiye) enjeksiyonu yapıp, intravajinal 1.55 g progesteron içeren PRID-DELTA (Ceva, Türkiye) yerleştirildi. 7. gün sabah ovaryumlar, dominant folikülün büyüklüğü ve hangi ovaryumda olduğu yönünden kontrol edildi. Ovulasyonun indüklenmesi için GnRH analogu olan 50 µg lesirelin (Lecibreed, Vetaş, Türkiye) i.m enjeksiyon şeklinde yapıldı. 8. gün akşam FSH enjeksiyonlarından önce ovaryumlarda 7. gün tespit edilen dominant folikülün ovulasyonu kontrol edildi. Dominant folikülün tespit edilememesi ovulasyon olarak değerlendirildi. 8. gün akşam- 12. gün sabah arası 12 saat arayla azalan dozlar şeklinde 8 adet FSH (Stimufol, Reprobol, Belgium) enjeksiyon (1. gün 100/100 µg, 2. gün 75/75 µg, 3. gün 50/50 µg, 4. gün 25/25 µg) uygulaması, toplam 500 µg Follitropin i.m olarak uygulandı. Kullanılan FSH preparatı Stimufol 10 ml; Porcine Follitropin: 500 µg ve Porcine Lutropin: 100 µg içeriklidir. FSH enjeksiyon dozları ml olarak; 2-2 ml, 1.5-1.5 ml, 1-1 ml, 0.5-0.5 ml şeklinde yapıldı. 7 ve 8. FSH enjeksiyonları ile birlikte 2 ml (150 µg, d-Cloprostenol) PGF2α (Gestavet Prost, Hipra, Türkiye) enjeksiyonları yapıldı. Son FSH enjeksiyonu ile birlikte PRID' ler çıkarıldı. 13. gün sabah süperstimüle edilmiş foliküllerin ovulasyonlarının uyarılması amacıyla 2 ml (50 µg lesirelin) GnRH (Lecibreed, Vetaş, Türkiye) enjeksiyonu uygulandı (0. saat). Bundan 12 ve 24 saat sonra olmak üzere iki kez, dondurulmuş-çözdürülmüş birer adet 0.25 ml'lik ticari sperma payetleri kullanılarak rektovajinal suni tohumlama yöntemiyle tohumlamalar yapıldı.

Grup 1 ve 2'de 21. gün sabah, Grup 3'te (kontrol grubu) ise 20. gün sabah inekler flushing (embriyo toplama, uterus yıkaması) için travaylara alındı. Uterus yıkaması öncesinde ultrason (5 MHz, Honda HS-102V, Japan ve 5 MHz, Honda HS- 2000VET, Japan) ile ovaryum muayeneleri yapıldı ve toplam CL ve anovulatör follikül sayıları tespit edildi. Flushing işlemi, cerrahi olmayan iki yollu balon katater (Foley) ile kesintili akış sistem tekniği ile her bir kornu için ayrı ayrı yapıldı (Noga ve Looney 2021). Donör ineklerin flushing işlemi için önce kuyruk bir tarafa bağlanıp sabitlendi, vulva ve çevresi temiz ılık su ile yıkandı ve kâğıt havlu ile kurulandı. 5-6 ml lidokain (Adokain, 50 ml, Sanovel, Türkiye) ile üst epidural anestezi yapıldı ve uterus yıkaması için çift yönlü Foley kateteri (30 cc,

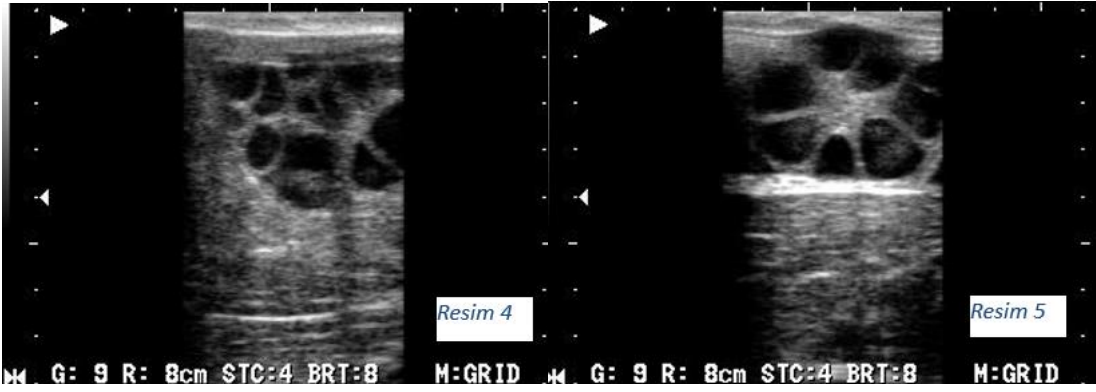
Bioniche, Kanada) kullanıldı. Foley kataterinin kornu uteriye sabitlenmesi için katater içerisine çelik stile (E24A, Agtech, ABD) yerleştirildi ve serviks geçilerek katater ucu yıkama yapılacak kornuya yönlendirildi. Kateterin balonu kornuların bifurkasyo noktasından yaklaşık 5 cm içeri girdikten sonra 15-20 ml hava ile şişirilerek sabitlendi. Yıkama solüsyonunun uterusu verilip alınması için kullanılan üç yollu Y kataterin (E27, Agtech, ABD) bir ucu Foley kataterine, diğer uçları yıkama solüsyonunun toplanacağı 1 lt'lik cam şişe ve yıkama medyumunun bulunduğu serum torbasının uç kısımlarına sabitlendi. Yıkama solüsyonu olarak %1 buzağı serumu (Fotal Bovine Serum Sigma F 9665, Almanya) ve %0.1 Kanamisin (Kanovet, Vetaş Veteriner ve Tarım İlaçları A.Ş. Küçükçekmece/İstanbul) içeren 1000 ml'lik laktatlı-ringer solüsyonu (Ringer-Fleks, Eczacıbaşı-Baxter Hastane Ürünleri San.ve Tic. A.Ş., Ayazağa/İstanbul) kullanıldı. Yıkama sırasında kornuların önce yaklaşık %30'u sonra %50'si daha sonra %70 ve tamamı doldurularak yıkama solüsyonu uterusu verilip alındı. Her bir kornu uterusu yıkaması için yaklaşık 500 ml solüsyon kullanıldı (Noga ve Looney 2021).

Çizelge 3.1. Protokolün 7. gününde, folikül aspirasyon grubundaki donörlerin folikül aspirasyonu öncesi ovaryumlarında bulunan aspire edilen foliküllerin sayı ve büyüklükleri

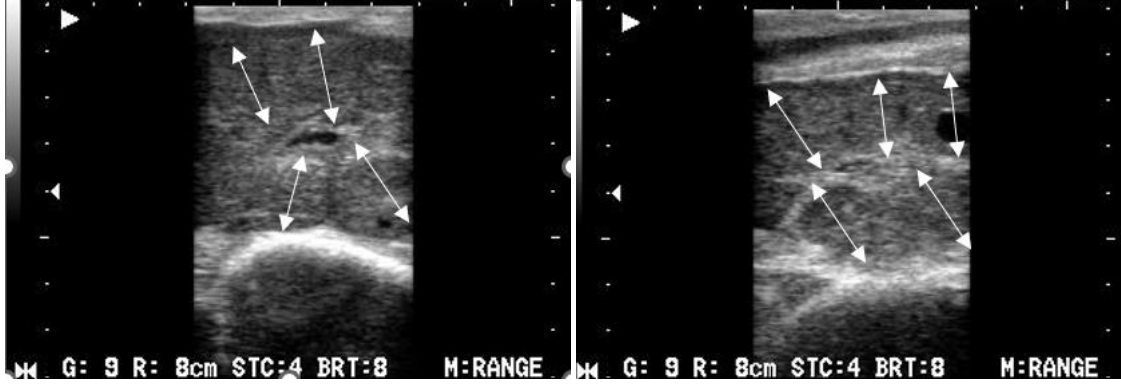
Donör	Sağ ovaryum	Sol ovaryum
1	18 mm	-
2	-	15 mm
3	15 mm ve 10 mm	-
4	17 mm	-
5	-	16 mm
6	20 mm	-
7	19 mm	-
8	17 mm	12 mm
9	18 mm	-
10	-	17 mm
Ortalama	16.16±2.73 mm	



Şekil 3.4. Folikül aspirasyonundan önce ovaryumda bulunan 10 mm ve 15 mm'lik iki folikülün durumu (Resim 1), 10 mm'lik folikülün aspirasyonundan sonraki görüntü (Resim 2), ovaryum üzerinde bulunan iki büyük folikülün aspirasyonundan sonraki görüntü (Resim 3).



Şekil 3.5. Süperstimülasyon uygulaması devam ederken (4. FSH enjeksiyonu) foliküllerin durumu (Resim 4), tohumlama öncesi foliküllerin durumu (Resim 5).



Şekil 3.6. Süperovulasyon uygulanmış bir sığır ovaryumu, flushing öncesi korpus luteumlar (oklar korpus luteum çapları).

3.2.1.2. Uterus Yıkaması Sonrası Yapılan İşlemler

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra donör ineklerin uterusuna rekto-vaginal yoldan 500 mg Sefapirin içeren 19 g'lık tüpler (Metrinew, Alke, Türkiye) enjekte edildi. Ayrıca uterusu kalması muhtemel embriyoların geliştirebileceği istenmeyen gebeliklerin önlenmesi içinde intra muskuler olarak 150 µg, d-Cloprostenol (Gestavet Prost, Hipra, Türkiye) enjeksiyonları uygulandı.

Bir şişede toplanan uterus yıkama içeriği Emcon filtreden (Agtech Zona Filter, Radiated, CAT. #D03) geçirildi, filtrede kalan kısım, tabanı önceden kareler şeklinde çizilmiş petri kaplarına aktarıldı (ISOLAB, 90x17 mm plastik petri kutuları, Türkiye). Stereo mikroskop (Leica, S8APO, Germany) altında embriyolar arandı. Tespit edilen tüm oosit-embriyolar içerisinde % 20 fetal buzağı serumu (Fotal Calf Serum, Sigma F 9665, Almanya), TCM-199 (Medium 199, M7528, Sigma, Almanya) ve % 0.1 kanamisin (Kanovet, Vetaş Veteriner ve Tarım İlaçları A.Ş. Küçükçekmece/İstanbul) içeren holding solüsyonunun bulunduğu daha küçük bir petri kabına (Cellstar, hücre kültür kabı, 35/10 mm, greiner BİO-ONE) alındı, tarama işlemi tamamlanınca, bulunan uygun embriyolar holding medyumun bulunduğu yeni bir 35 mm'lik petriye alındı ve burada Uluslararası Embriyo Teknoloji Derneği (İETS) manuel 2010'a göre embriyolar aşama ve kalitelerine göre sınıflandırıldı (Stringfellow ve Givens 2010).

Çalışmada Flushing sonrası toplanan oosit-embriyoların veri değerlendirmeleri şu şekilde yapıldı;

Toplam oosit-embriyo (hücre) sayısı: Petride bulunan tüm aşama ve kalitedeki embriyolar ayrıca fertilize olmamış oositler,

Transfer edilebilir embriyo sayısı: Kalite derecesi 1, 2 ve 3 olan embriyolar,

Dondurulabilir Embriyo sayısı: Kalite derecesi 1 olan embriyolar,

Gelişim aşamalarına göre embriyo sayıları: 1'den 9'a kadar; 1-unfertilize oosit, 2- 2-12 hücreli embriyo, 3-morula, 4-kompakt morula, 5-erken blastosist, 6-blastosist, 7-expanded blastosist, 8-hatched blastosist, 9-expanded hatched blastosist,

Kalite derecelerine göre embriyo sayıları: Kod 1, kod 2, kod 3, kod 4 (ölü ya da dejenere embriyo, oosit)

UFO (Unfertilize ova) sayısı: Fertilize olmamış oositler

Dejenere embriyo sayısı: Fertilize olmuş ama gelişmemiş ya da dejenere olmuş. Kalite derecesi 4 olan (kullanılamazlar)



Şekil 3.7. Folikül aspirasyonu grubundaki bir donör inekten alınan oosit/embriyolar, üstte kalan kısımda 41 transfer edilebilir embriyo, altta kalan kısımda 7 UFO, 3 dejenere embriyo bulunmaktadır.

3.2.2. AMH (Anti Müllarian Hormon) Testleri için Kan Alımı

Anti Müllarian Hormon analizi için kan alma;

- 1- AMH için kan alımları grup 1 ve 2'de, süperovulasyon protokollerinin aynı noktasında yapıldı. 1. kan alımı (AMH1), süperovulasyon protokolünün 9. gün

sabahına denk gelen 1. FSH enjeksiyonlarından hemen önce, 2. kan alımı (AMH2) süperovulasyon protokolünün 13. gün akşamı, GnRH enjeksiyonlarından hemen önce yapıldı.

- 2- Kontrol grubunda ise 1. kan alımı (AMH1) süperovulasyon protokolünün 8. gün akşamına denk gelen 1. FSH enjeksiyonlarından hemen önce, 2. kan alımı da (AMH2) 13. gün sabah, GnRH enjeksiyonlarından hemen önce yapıldı.

Sonuçta, 1. kan alımları (AMH1) grup 1'de GnRH ile foliküler dalga senkronizasyonundan 48 saat sonra, kontrol grubunda GnRH ile foliküler dalga senkronizasyonundan 36 saat sonra ve grup 2'de folikül aspirasyonu ile foliküler dalga senkronizasyonundan 48 saat sonra alındı. Yani her üç grupta da foliküler dalga çıktıktan sonra ve 1. FSH enjeksiyonlarından hemen önce yapıldı. 2. kan alımları da her üç grup için FSH ile foliküler süperstimülasyonun tamamlanmasından 24 saat sonra ve GnRH ile ovulasyonların uyarılmasından hemen önce yapıldı.

Tüm gruplarda 1. FSH enjeksiyonu öncesi ve son FSH enjeksiyonlarından 24 saat sonra hayvanların kuyruk altı venasından vakumlu 9 ml'lik kırmızı kan tüplerine (Aysel, Adana, Türkiye) kan örnekleri alındı, kan tüpleri +4°C'de 3000 devirde 10 dk. santrifüj edildi ve kan serumları 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine alındı. Serum örnekleri AMH testi yapılncaya kadar derin dondurucuda (-40 °C) muhafaza edildi.

3.2.3. AMH Analizi

Alınan kan örneklerinin serum AMH düzeylerinin ölçümü, elektrokemilüminesans immünolojik test yöntemiyle, AMH Beckman Coulter II ELISA testine göre standardize edilen Elecsys AMH kiti ile tam otomatik immünolojik test analizöründe (Roche, Cobas e 601, Germany, application code number: 782) ölçüldü (Ireland ve ark. 2008; Deeks 2015; Anckaert ve ark. 2019; Jacobs ve ark.2019; Domain ve ark. 2022; Koca ve ark. 2023).



Şekil 3.8. Flushing öncesi ovaryumların muayenesi



Şekil 3.9. Flushing (uterus yıkaması) işlemi



Şekil 3.10. Uterus yıkantı sıvısının zona filtresinden süzülmesi



Şekil 3.11. Zona filtresinde kalan ve petri kabına aktarılmış içerikte mikroskop altında embriyo aranması

3.3. İstatistiki Analizler

İstatistiki değerlendirmelerde SPSS 25.0 paket programı kullanıldı. Araştırma sonucunda elde edilen verilerin ortalama ve standart hata değerleri hesaplandı. Çalışmada üç farklı protokolün gruplara göre; süperovulasyon yanıtları, anovule folikül sayıları, toplam elde edilen hücre sayısı, transfer edilebilir embriyo sayıları, fertilize yapı, UFO sayıları, embriyo gelişim aşamaları ve kalite dereceleri, serum AMH1 ve AMH2 düzeyi karşılaştırılmaları Kruskal Wallis testine göre yapıldı. Serum AMH1 ve AMH2 düzeyleri arasındaki değişim farkının önemini belirtmek için T testi kullanıldı. Ayrıca AMH1, AMH2, CL sayısı, CL+anovule folikül sayısı, toplam oosit-embriyo sayısı, transfer edilebilir ve dejenere embriyo sayıları, UFO sayıları ve kalite derecelerine göre (1, 2, 3, 4. kalite) embriyo sayıları arasında korelasyon analizleri yapıldı. Ortalama değerleri ile standart hata oranları hesaplandı (Ortalama değer± Standart Hata).

4. BULGULAR

4.1. Süperovulasyon Sonrası Ovaryum Bulguları ve Flushing Sonrası Elde Edilen Oosit-Embriyo Sayıları

Sunulan çalışmada 10'arlı gruplardan oluşan iki modifiye grubunda, bir de kontrol grubunda bulunan toplam 30 donöre üç farklı süperovulasyon protokol uygulaması yapıldı. Gruplar sırasıyla; Grup1: Modifiye GnRH, Grup 2: Modifiye folikül aspirasyonu ve Grup 3: Kontrol grubu şeklinde oluşturuldu. Uterus yıkamasından hemen önce yapılan ovaryumların ultrasonografi kontrollerinde ortalama CL ve anovule folikül sayıları sırayla; Grup 1'de (modifiye GnRH grubu) $18,9 \pm 2.45$ ve 1.8 ± 0.49 , Grup 2'de (modifiye folikül aspirasyon grubu) $19,6 \pm 3.72$ ve 4.1 ± 1.07 ve Grup 3'te (orijinal GnRH-kontrol grubu) $11,8 \pm 1.61$ ve 0.3 ± 0.15 olarak tespit edildi. Uterus yıkama işlemi sonrası elde edilen oosit-embriyo sayıları ve bunlara ait değerlendirmelerin sonuçları da gruplara göre sırasıyla; toplam oosit-embriyo (toplam hücre) sayısı; 16.10 ± 2.93 , 17.30 ± 4.01 ve 9.40 ± 1.76 , geri kazanım oranları (%); 81.71 ± 6.75 , 87.17 ± 6.5 ve 73.59 ± 6.83 , transfer edilebilir embriyo sayıları; 14.30 ± 2.77 , 11.70 ± 3.65 ve 8.50 ± 1.85 , dejenere embriyo sayıları; 1.20 ± 0.76 , 1.70 ± 0.47 ve 0.20 ± 0.13 , fertilize oosit sayı ve yüzdeleri; 15.50 ± 2.79 ; $\%96.47 \pm 1.99$, 13.40 ± 3.8 ; $\%73.82 \pm 8.49$ ve 8.70 ± 1.83 ; $\%90.21 \pm 5.9$, infertilize oosit (UFO) sayıları da; $0,6 \pm 0.27$, $3,9 \pm 1.32$ ve $0,7 \pm 0.33$ olarak bulundu (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Grupların süperovulasyon yanıtları, anovule folikül sayıları ve flushing sonrası elde edilen oosit-embriyo sayıları ile bunlara ait değerlendirmelerin uygulanan protokollere göre karşılaştırması (Ort. ± Std. Hata).

İncelenen Özellikler	Gruplar (n=10)				
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	P	
	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)		
CL Sayısı	18.90± 2.45 ^a (12.00-38.00)	19.60± 3.72 ^a (11.00-52.00)	11.80± 1.61 ^b (3.00-20.00)	0.049	*
Anovule Folikül Sayısı	1.80± 0.49 ^b (0.00-4.00)	4.10± 1.07 ^a (1.00-11.00)	0.30± 0.15 ^c (0.00-1.00)	0.001	**
Toplam Hücre (oosit-embriyo) Sayısı	16.10± 2.93 (5.00-37.00)	17.30± 4.01 (7.00-52.00)	9.40± 1.76 (1.00-20.00)	0.106	ÖD
Geri Kazanım Oranı (%)	81.71± 6.75 (41.67-100)	87.17± 6.50 (38.89-100)	73.59± 6.83 (33.33-100)	0.242	ÖD
Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı (1., 2., 3. kalite Embriyo)	14.30± 2.77 (5.00-35.00)	11.70± 3.65 (2.00-42.00)	8.50± 1.85 (1.00-20.00)	0.214	ÖD
Transfer Edilebilir Embriyo (1., 2., 3. kalite Embriyo) (%)	89.50± 4.92 ^a (56.25-100)	62.52± 8.65 ^b (21.05-93.75)	87.96± 6.16 ^a (40.00-100)	0.012	*
Dejenere Embriyo Sayısı	1.20± 0.76 (0.00-7.00)	1.70± 0.47 (0.00-4.00)	0.20± 0.13 (0.00-1.00)	0.052	ÖD
Fertilize Oosit Sayısı	15.50± 2.79 (5.00-35.00)	13.40± 3.80 (3.00-45.00)	8.70± 1.83 (1.00-20.00)	0.154	ÖD
Fertilize Oosit (%)	96.47± 1.99 ^a (80.00-100)	73.82± 8.49 ^b (31.58-100)	90.21± 5.90 ^a (40.00-100)	0.013	*
UFO Sayısı	0.60± 0.27 ^b (0.00-2.00)	3.90± 1.32 ^a (0.00-13.00)	0.70± 0.33 ^b (0.00-3.00)	0.014	*

*: p<0.05; **: p<0.01; ÖD: Önemsiz Değer

a, b, c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.

Geri Kazanım Oranı (%) = Toplam Hücre Sayısı /Toplam CL Sayısı x 100

Transfer Edilebilir Embriyo (%) = Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı/Toplam Hücre Sayısı x 100

Fertilize Oosit (%) = Fertilize Oosit Sayısı/ Toplam Hücre Sayısı x 100

Çizelge 4.1’de gösterildiği gibi süperovulasyon cevabı (CL sayıları) bakımından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu (p<0.05). Modifiye süperovulasyon protokollerinin uygulandığı grup 1 ve 2’de orijinal süperovulasyon protokolü uygulanan gruba göre daha iyi süperovulasyon yanıtı alındı. Gruplar arası anovulatör folikül sayısı bakımından yüksek düzeyde anlamlı fark bulundu (p<0.01). Modifiye folikül aspirasyonu grubu (grup 2) 4.10± 1.07 ovulasyona gitmemiş folikül ortalamasıyla diğer iki gruptan ayrıldı. Modifiye grup 1’de 1.80± 0.49 olurken, kontrol grubunda (grup 3) 0.30± 0.15 ortalama ile çok daha düşük anovule folikül sayıları elde edildi. Anovule folikül sayıları bakımından kontrol grubunun daha iyi olduğu görüldü. Elde edilen toplam hücre sayısı (oosit-embriyo) yönünden gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamasına rağmen grup 1 (16.10± 2.93) ve grup 2’de (17.30± 4.01) grup 3’e (9.40±

1.76) göre sayısal olarak önemli sayılabilecek bir üstünlük bulundu ($p>0.05$). Dejenere embriyo sayıları bakımından gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamasına rağmen ($p=0.052$), grup 3’de dejenere embriyo sayılarının (0.20 ± 0.13) daha düşük olduğu grup 1 (1.20 ± 0.76) ve grup 2 (1.70 ± 0.47) ile aralarında anlamlı farka yakın olduğu görüldü. Gruplar arasında fertilize oosit ve transfer edilebilir embriyo yüzde değerleri yönünden fark önemliydi ($p<0.05$). Grup 1 ($\%96.47\pm 1.99$) ve kontrol grubu olan grup 3 ($\%90.21\pm 5.90$)’ün fertilizasyon yüzdeleri, grup 2 ($\%73.82\pm 8.49$)’den önemli oranda yüksek bulundu. Grup 2’nin fertilizasyon oranlarının diğer iki gruba göre düşük kaldığı görüldü. Transfer edilebilir embriyo yüzdeleri grup 1 ($\%89.50\pm 4.92$) ve grup 3’te (87.96 ± 6.16) birbirine yakın bulunurken, grup 2’de $\%62.52\pm 8.65$ ile diğer gruplardan anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.05$). UFO sayıları bakımından gruplar arasındaki fark anlamlıydı ($p<0.05$) ve UFO sayısı grup 2’de 3.90 ± 1.32 ile grup 1 (0.60 ± 0.27) ve grup 3 (0.70 ± 0.33)’ten önemli oranda fazla bulundu. Gruplar arasında geri kazanım oranları, toplam hücre, fertilize oosit ve transfer edilebilir embriyo sayıları arasındaki fark önemsizdi ($p>0.05$).

4.2. Flushing Sonrası Elde Edilen Oosit-Embriyoların Kalite Sınıflandırılması Değerleri

Çizelge 4.2’de gösterildiği gibi gruplardaki embriyoların kalite derecelerine göre ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında, 4. kalite embriyo sayıları açısından gruplar arasında yüksek düzeyde anlamlı fark bulundu ($p<0.01$). Grup 2’de 5.60 ± 1.38 transfer edilemez embriyo-oosit sayısı ile grup 1 (1.80 ± 0.79) ve grup 3 (0.90 ± 0.38)’ten yüksek bulundu. Gruplar arasında 1. kalite (dondurulabilir kalitede embriyo) embriyo sayıları bakımından istatistiksel bir fark bulunmamasına rağmen sayısal olarak grup 1 (11.90 ± 2.34) ve grup 2 (10.00 ± 3.55)’den grup 3 (6.00 ± 1.14)’e göre sırasıyla 5.9 ve 4 daha fazla dondurulabilir kalitede embriyo elde edildi.

Çizelge 4.2. Gruplardan elde edilen embriyoların kalite derecelerinin uygulanan protokollere göre karşılaştırması (Ort. ± Std. Hata)

İncelenen Özellikler	Gruplar (n=10)				
	Grup 1	Grup 2	Grup 3		
	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)	P	
1. Kalite Embriyo Sayısı	11.90± 2.34 (3.00-28.00)	10.00± 3.55 (2.00-40.00)	6.00± 1.14 (1.00-12.00)	0.119	ÖD
2. Kalite Embriyo Sayısı	1.40± 0.40 (0.00-3.00)	1.50± 0.67 (0.00-7.00)	2.10± 0.95 (0.00-8.00)	0.929	ÖD
3. Kalite Embriyo Sayısı	1.00± 0.47 (0.00-4.00)	0.20± 0.13 (0.00-1.00)	0.40± 0.16 (0.00-1.00)	0.430	ÖD
4. Kalite Embriyo Sayısı (Dejenere Embriyo+UFO)	1.80± 0.79 ^b (0.00-7.00)	5.60± 1.38 ^a (1.00-15.00)	0.90± 0.38 ^b (0.00-3.00)	0.005	**

** : p<0.01; ÖD: Önemsiz Değer
a, b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.

Çizelge 4.3. Gruplardan elde edilen embriyoların kalite derecelerine göre yüzde (%) değerlerinin uygulanan protokollere göre karşılaştırılması (Ort. ± Std. Hata).

İncelenen Özellikler (%)	Gruplar (n=10)				
	Grup 1	Grup 2	Grup 3		
	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)	P	
1. Kalite Embriyo	72.57± 4.98 (50.00-94.12)	52.02± 8.22 (21.05-93.75)	69.94± 7.94 (30.77-100)	0.130	ÖD
2. Kalite Embriyo	11.18± 3.08 (0.00-30.00)	12.83± 5.47 (0.00-53.85)	16.07± 6.38 (0.00-61.54)	0.948	ÖD
3. Kalite Embriyo	6.28± 2.72 (0.00-20.00)	1.26± 0.84 (0.00-6.67)	3.04± 1.30 (0.00-10.00)	0.340	ÖD
4. Kalite Embriyo (Dejenere Embriyo+UFO)	10.50± 4.92 ^b (0.00-43.75)	37.48± 8.65 ^a (6.25-78.95)	12.04± 6.16 ^{ab} (0.00-60.00)	0.012	*
Dejenere Embriyo	6.98±4.45 (0.00-43.75)	11.31±3.39 (0.00-27.27)	2.25±1.51 (0.00-12.50)	0.180	ÖD
UFO	3.53± 1.99 ^b (0.00-20.00)	26.18± 8.49 ^a (0.00-68.42)	9.79± 5.90 ^b (0.00-60.00)	0.013	*

*: p<0.05; ÖD: Önemsiz Değer
a, b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

Çizelge 4.3'te gösterildiği gibi gruplar arası embriyo kalite dereceleri yüzde değerlerinin 1., 2 ve 3. kalite embriyolar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmazken (p>0.05), 4. kalite embriyo ve UFO yüzdeleri yönünden gruplar arası fark anlamlı bulundu (p<0.05). Gruplar arası 4. kalite embriyo oranları grup 1 ve grup 3'te benzer bulunmasına rağmen folikül aspirasyon grubunda (grup 2) %37.48± 8.65 ile her iki grup ortalamasından

yüksekti ($p<0.05$). UFO oranı grup 2’de (26.18 ± 8.49), grup 1 (3.53 ± 1.99) ve grup 3’ten (9.79 ± 5.90) anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$). Sonuç olarak, folikül aspirasyon grubunda (grup 2), 4.kalite embriyo (dejenere embriyo + UFO) oranı GnRH ile foliküler dalga senkronizasyonlarının yapıldığı grup 1 ve grup 3’ten anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$).

4.3. Flushing Sonrası Elde Edilen Embriyoların Gelişim Aşamalarına Göre Değerleri

Çizelge 4.4’te sunulan flushing sonrası elde edilen transfer edilebilir embriyoların gruplara göre gelişim aşamalarının karşılaştırılmasında, morula aşaması yönünden gruplar arasında önemli bir fark bulunmazken ($p>0.05$), kompakt morula aşamasındaki embriyo sayıları bakımından gruplar arasındaki fark ise anlamlıydı ($p<0.05$). Kontrol grubunda 6.90 ± 1.44 ortalama ile grup 1 (2.30 ± 0.67) ve grup 2’den (2.60 ± 0.75) daha fazla kompakt morula aşamasında embriyo elde edildi. Grup 1’de erken blastosist aşamasındaki embriyo sayıları 5.20 ± 1.50 ile grup 2 (1.50 ± 0.48) ve grup 3 (0.60 ± 0.22)’ten belirgin düzeyde yüksekti ($p<0.01$). Blastosist aşamasındaki embriyo sayıları grup 2’de 5.50 ± 3.04 ile grup 1 (3.90 ± 0.96)’den yüksekti ve grup 3’te blastosist aşamasında embriyo elde edilmemesi nedeniyle gruplar arası yüksek düzeyde fark saptandı ($p<0.01$). Grup 1 ve grup 2’de sırasıyla 2.80 ± 1.64 ve 2.00 ± 0.95 ekspanded blastosist aşamasında embriyo benzer sayılarda elde edilirken grup 3’te bu aşamada embriyo elde edilemedi. Bu nedenle ekspanded blastosist aşaması bakımından da gruplar arası fark anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Çizelge 4.4. Gruplardan elde edilen embriyoların gelişim aşamalarının uygulanan protokollere göre karşılaştırılması (Ort \pm Std. Hata).

İncelenen Özellikler (Embriyo Sayısı)	Gruplar (n=10)				
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	P	ÖD
	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)		
Morula	0.10 ± 0.10 (0.00-1.00)	0.10 ± 0.10 (0.00-1.00)	1.00 ± 0.47 (0.00-4.00)	0.115	ÖD
Kompakt Morula	2.30 ± 0.67^b (0.00-7.00)	2.60 ± 0.75^b (0.00-7.00)	6.90 ± 1.44^a (1.00-14.00)	0.036	*
Erken Blastosist	5.20 ± 1.50^a (0.00-14.00)	1.50 ± 0.48^b (0.00-4.00)	0.60 ± 0.22^b (0.00-2.00)	0.010	**
Blastosist	3.90 ± 0.96^b (0.00-11.00)	5.50 ± 3.04^a (0.00-32.00)	0.00 ± 0^c (0.00-0.00)	0.002	**
Ekspanded Blastosist	2.80 ± 1.64^a (0.00-17.00)	2.00 ± 0.95^a (0.00-8.00)	0.00 ± 0^b (0.00-0.00)	0.018	*

*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ÖD: Önemsiz Değer

a, b, c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.

Çizelge 4.5. Gruplardan elde edilen embriyoların gelişim aşamalarına göre yüzde (%) değerlerinin uygulanan protokollere göre karşılaştırılması (Ort ± Std. Hata).

İncelenen Özellikler (%)	Gruplar (n=10)				
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	P	
	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)		
Morula	0.56± 0.56 (0.00-5.56)	0.59± 0.59 (0.00-5.88)	12.36± 5.28 (0.00-42.86)	0.101	ÖD
Kompakt Morula	16.76± 4.23 ^b (0.00-40.00)	16.62± 5.16 ^b (0.00-41.67)	71.42± 7.24 ^a (25.00-100)	0.000	**
Erken Blastosist	28.96± 6.24 (0.00-66.67)	12.22± 4.17 (0.00-36.36)	17.29± 9.68 (0.00-100)	0.072	ÖD
Blastosist	31.42± 6.86 ^a (0.00-64.71)	21.38± 6.94 ^a (0.00-61.54)	0.00±0 ^b (0.00-0.00)	0.001	**
Ekspanded Blastosist	11.80± 4.59 ^a (0.00-45.95)	11.70± 5.24 ^a (0.00-50.00)	0.00±0 ^b (0.00-0.00)	0.019	*

*: p<0.05; **: p<0.01; ÖD: Önemsiz Değer

a, b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.

Çizelge 4.5'te embriyo gelişim aşamalarının yüzde değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması verilmiştir. Grup 1 ve 2 arasında embriyo aşamaları yüzde değerleri arasında istatistiksel bir fark bulunmazken grup 3'te kompakt morula aşaması bakımından (%71.42± 7.24) diğer iki grupla arasında yüksek düzeyde fark bulundu (p<0.01). Grup 3'te blastosist ve ekspanded blastosist aşamasında embriyo elde edilememesi nedeniyle grup 3 ile diğer iki grup arasında blastosist aşaması bakımından yüksek düzeyde (p<0.01), ekspanded blastosist aşaması yönünden de farkın anlamlı olduğu belirlendi (p<0.05). Kontrol grubunda daha ileri gelişim aşaması olan blastosist ve ekspanded blastosist aşamasında embriyo elde edilemedi. Embriyo gelişim aşamaları yüzdelerik dağılım oranları bakımından grup 1 ve 2 arasında istatistiksel bir fark bulunmazken (p>0.05) her iki gruptan da morula, kompakt morula, erken blastosist, blastosist ve ekspanded blastosist aşamalarında embriyolar elde edildi.

4.4. Serum AMH1 ve AMH2 Düzeyleri Arasındaki Konsantrasyon Değişim Değeri

Sunulan çalışmada foliküler dalga senkronizasyonu sonrası elde edilen AMH kan serumu konsantrasyonları AMH1 olarak, tohumlama öncesi (muhtemel östrus) GnRH enjeksiyon anında alınan serum AMH düzeyleri de AMH2 olarak sınıflandırıldı. Gruplardaki donör ineklerin serum AMH1 konsantrasyonu ortalama değerleri sırasıyla; 0.23±0.03 ng/ml, 0.29±0.06 ng/ml ve 0.18±0.02 ng/ml olarak ölçüldü. Gruplar arasında AMH1 düzeyleri

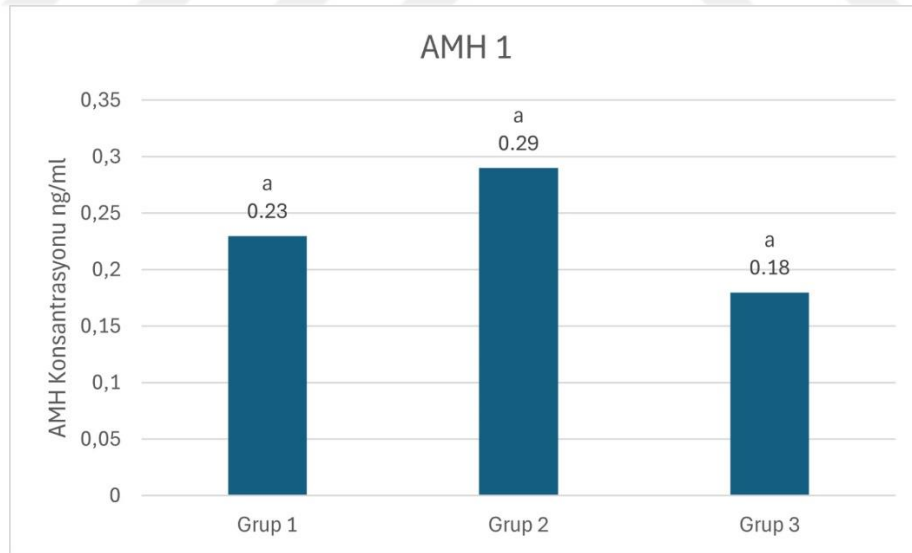
bakımından istatistiksel fark bulunmadı ($p>0.05$). Grup 1 ve 2'deki donörlerin AMH2 düzeyleri (0.42 ± 0.05 ng/ml ve 0.56 ± 0.11 ng/ml) ile AMH (%) değişim oranları ($\%91.05\pm 14.60$ ve $\%97.22\pm 13.69$) benzer bulundu ($p>0.05$). Kontrol grubundaki AMH2 düzeyi (0.27 ± 0.04 ng/ml) ile AMH (%) değişim oranının ($\%50.15\pm 11.28$) grup 1 ve 2'den anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Gruplara göre AMH1, AMH2 ve AMH (%) değişim değerlerinin uygulanan protokollere göre karşılaştırması (Ort \pm Std. Hata).

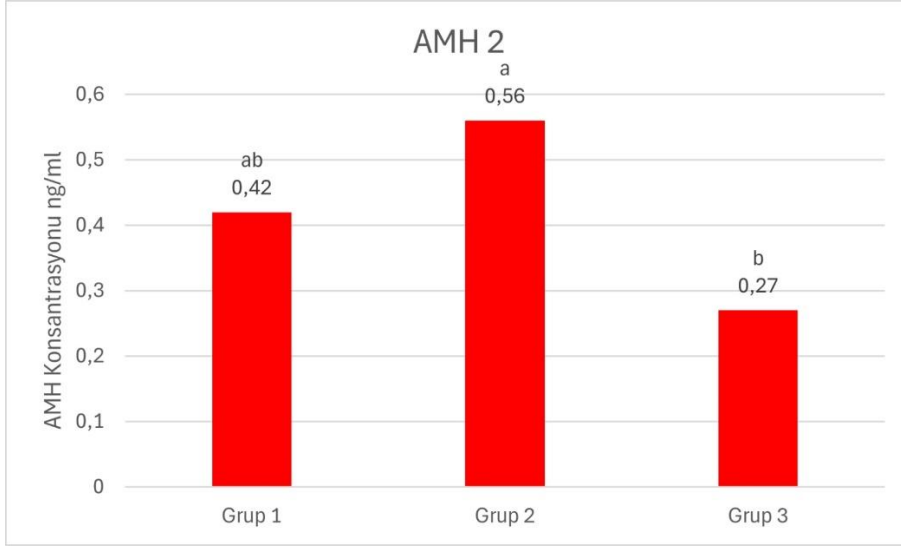
İncelenen Özellikler	Gruplar			P	
	Grup 1	Grup 2	Grup 3		
	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)	Ortalama (Min.-Mak.)		
AMH 1	0.23 ± 0.03 (0.06-0.34)	0.29 ± 0.06 (0.13-0.73)	0.18 ± 0.02 (0.04-0.28)	0.237	ÖD
AMH 2	0.42 ± 0.05^{ab} (0.16-0.65)	0.56 ± 0.11^a (0.25-1.37)	0.27 ± 0.04^b (0.07-0.47)	0.048	*
AMH (%) Değişim	91.05 ± 14.60^{ab} (31.82-166.67)	97.22 ± 13.69^a (14.81-182.35)	50.15 ± 11.28^b (-13.33-104.89)	0.033	*

*: $p<0.05$; ÖD: Önemsiz Değer

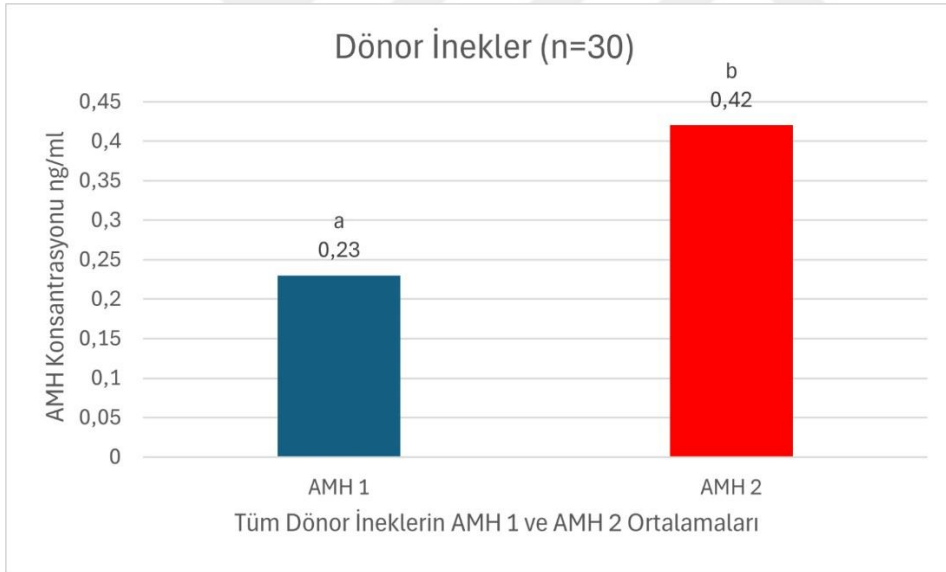
a, b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir.



Şekil 4.1. Ortalama serum AMH 1 düzeylerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.



Şekil 4.2. Ortalama serum AMH 2 düzeylerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.



Şekil 4.3 Gruplardan bağımsız olarak tüm donör ineklerin ortalama serum AMH düzeylerinin AMH1 ve AMH2'deki değişimi.

Gruplardan bağımsız tüm donörlerin (n=30) AMH1 ile AMH2 arasındaki konsantrasyon değişimi %78.87 olarak bulundu. AMH1 ve AMH2 arasındaki konsantrasyon değişim farkının önemli düzeyde olduğu ($p < 0.0001$) yapılan *t*-test ile belirlendi (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Gruplardan bağımsız AMH 1 ve AMH 2 arasında yapılan *t*-test

AMH	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	P
AMH 1	30	0.23	0.13	0.02	0.0000009***
AMH 2	30	0.42	0.26	0.05	

Sütunlar arasındaki ortalama farkı gösterir ***: $P < 0.0001$

4.5. AMH1, AMH2, CL Sayısı, CL+Anovule Folikül Sayısı, Toplam Oosit-Embriyo Sayısı, Transfer Edilebilir ve Dejenere Embriyo Sayıları, UFO Sayıları ve Kalite Derecelerine Göre Embriyo Sayıları arasındaki İlişki

Gruplardan bağımsız tüm donör inekler beraber değerlendirildiğinde; AMH1, AMH2, CL sayısı, CL+anovule folikül sayısı, toplam oosit-embriyo sayısı, transfer edilebilir ve dejenere embriyo sayıları, UFO sayıları ve kalite derecelerine göre (1, 2, 3, 4. kalite) embriyo sayıları arasındaki ilişkinin derecesini tespit etmek amacıyla korelasyon analizi yapıldı ve Çizelge 4.8’de sunuldu. AMH1 ile AMH2, CL sayısı, CL+anovule folikül sayısı, toplam oosit-embriyo sayısı, transfer edilebilir embriyo sayıları, UFO sayısı, 1. ve 4. kalite embriyo sayıları arasında ilişki anlamlıydı ($p < 0.01$). AMH1 ile dejenere embriyo, 2. ve 3. kalite embriyo sayıları arasında ise ilişki kurulamadı ($p > 0.05$).

Çizelge 4.8. AMH1, AMH2, CL Sayısı, Toplam Oosit-Embriyo Sayısı, Transfer Edilebilir ve Dejenere Embriyo Sayıları, UFO Sayıları ve Kalite Derecelerine Göre (1, 2, 3, 4. kalite) Embriyo Sayıları Arasındaki İlişkinin Dereceleri (korelasyonları)

	CL Sayısı	Top Oosit-Embriyo Sayısı	Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı.	Dejenere Embriyo Sayısı	UFO Sayısı	1. Kalite Embriyo Sayısı	2. Kalite Embriyo Sayısı	3. Kalite Embriyo Sayısı	4. Kalite Embriyo Sayısı	AMH1 Düzeyi	AMH2 Düzeyi
Toplam Oosit-Embriyo Sayısı	0.957**	1									
Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı	0.881**	0.934**	1								
Dejenere Embriyo Sayısı	0.240	0.306	0.106	1							
UFO Sayısı	0.388*	0.332	0.020	0.127	1						
1. Kalite Embriyo Sayısı	0.887**	0.924**	0.958**	0.108	0.116	1					
2. Kalite Embriyo Sayısı	0.183	0.244	0.351	0.021	-0.270	0.085	1				
3. Kalite Embriyo Sayısı	0.338	0.385*	0.475**	0.030	-0.180	0.327	0.297	1			
4. Kalite Embriyo Sayısı	0.432*	0.419*	0.067	0.586**	0.878**	0.147	-0.210	-0.132	1		
AMH1 Düzeyi	0.759**	0.753**	0.587**	0.316	0.560**	0.654**	-0.013	0.002	0.610**	1	
AMH2 Düzeyi	0.741**	0.707**	0.502**	0.336	0.658**	0.577**	0.091	0.032	0.700**	0.944**	1
CL+ Anovule Folikül Sayısı	0.961**	0.906**	0.767**	0.282	0.545**	0.783**	0.135	0.256	0.581**	0.761**	0.785**

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

5. TARTIŞMA

Sığırlarda süperovulasyon protokollerini geliştirme çalışmalarının amacı, gebelik üretme potansiyeli yüksek olan transfer edilebilir kalitede embriyoların sayısını en yüksek düzeye çıkarmaktır. Süperovulasyon yanıtlarındaki yüksek dereceli tahmin edilemezlik, embriyo transfer programlarının verimliliği ve karlılığını etkileyerek sorun teşkil etmektedir (Armstrong 1993; Sartori ve ark. 2009; Bó ve Mapletoft 2014; Hasler 2014). Son yıllarda sığır üreme fizyolojisi, ovaryum fonksiyonlarının manüplasyonu ve gonadotropinlerin biyokimyası çalışmalarında önemli gelişmeler kaydedilmesine rağmen donör hayvanların doğasında olan ve süperovulasyon yanıtını etkileyen faktörlerin henüz bir kısmı ancak anlaşılabilmiştir. Sığırlarda süperovulasyon uygulamalarında, östrus tespiti gerektiren geleneksel süperovulasyon protokolünden ziyade çok sayıda donörün aynı anda süperovulasyon programına alınabildiği östrus takibi gerektirmeyen foliküler dalga senkronizasyon yöntemlerinin kullanılmasının tercih edilmesi daha avantajlı görülmektedir (Jahnke ve Youngs 2021).

Süperovulasyon uygulamalarının başarısı elde edilen transfer edilebilir embriyo sayısına göre belirlenmektedir. Bu yüzden çalışmamızın amacı flush başına transfer edilebilir embriyo sayısını artırmaktır. Sunulan çalışmada modifiye edilmiş aynı süperovulasyon protokolü üzerinde, foliküler dalga senkronizasyonu için GnRH enjeksiyon veya dominant folikül aspirasyonu yöntemleri kullanılarak *in vivo* embriyo üretimi yapıldı. Bu iki yöntem ile protokolda yapılan değişikliklerin, elde edilen embriyo sayı ve kalitesi üzerine bir etkisinin olup olmadığı değerlendirildi. Ayrıca kullanılan protokollerin iki farklı noktadan alınan kan serum örnekleriyle AMH seviyelerindeki değişimde araştırıldı.

Yapılan çalışmada modifiye süperovulasyon protokolü üzerinde folikül aspirasyon yönteminin kullanılmasındaki amaç, folikül aspirasyon işlemi anında ovaryumlarda 10 mm veya daha büyük folikül yada foliküllerin gelişmesini sağlamak ve bu foliküllerin büyüklüğünden dolayı ultrason rehberliğinde transvaginal aspirasyon işleminin daha kolay yapılmasını sağlamak ve ayrıca CL'siz folikül aspirasyonu sonrası daha yüksek salgılanacak endojen FSH ile foliküler dalgaya daha fazla sayıda folikülün girmesinin temin edilmesiyle daha yüksek süperovülatör yanıt almak amaçlanmıştır (Wiley ve ark. 2019).

5.1. Süperovulasyon Sonrası Ovaryum Bulguları ile Flushing Sonrası Elde Edilen Oosit-Embriyo Sayıları ve Bunlara Ait Verilerin Yorumlanması

Sunulan çalışmada elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; CL sayısı- süperovulasyon yanıtının grup 1 ve 2’de kontrol grubu olan grup 3’ten daha iyi olduğu ($p<0.05$), anovule folikül sayısı ($p<0.01$), UFO sayısı ve yüzdesi ($p<0.05$), 4. kalite embriyo sayısı ($p<0.01$) ve yüzdesi ($p<0.05$) bakımından grup 2’nin grup 1 ve 3’e göre yüksek bulunduğu, fertilize oosit yüzdesi ile transfer edilebilir embriyo yüzdeleri ($p<0.05$) bakımından da grup 1 ve 3’ün grup 2’den iyi olduğu ve aralarındaki farkın önemli olduğu bulundu. Geri kazanım oranları, toplam hücre (oosit-embriyo), dejenere embriyo, fertilize oosit, transfer edilebilir embriyo sayıları ile 1., 2. ve 3. kalite embriyo sayıları açısından ise gruplar arası istatistiksel fark bulunmadı ($p>0.05$) (Çizelge 4.1).

Yapılan çalışmada uterus yıkaması öncesi yapılan ovaryum muayenesinde CL sayıları grup 1, 2 ve 3 için sırasıyla; 18.90 ± 2.45 , 19.60 ± 3.72 ve 11.80 ± 1.61 olarak bulundu. Bu alanda birçok araştırmacı benzer çalışmalar gerçekleştirmiştir. Karaşahin ve ark. (2016)’nın ineklerde siklusun rastgele bir gününde intravaginal CIDR yerleştirdikten 7 gün sonra azalan dozlarda 4 gün FSH enjeksiyonlarıyla süperstimülasyon uyguladıkları çalışmada Holştayn, Esmer ve Simental ırkı inekleri kullanmışlardır. Irklara göre ortalama CL sayıları sırasıyla; 8.36 ± 2.37 , 10.22 ± 2.62 ve 15.92 ± 2.27 olarak bulunmuş ve Simental ineklerin süperovulasyon yanıtının Holştayn ve Esmer ırktan daha iyi olduğu bildirilmiştir. Kara ve ark. (2020) 83 Holştayn donörle toplam 120 uterus flushing uygulamasının gerçekleştirildiği ve geleneksel süperovulasyon yönteminin kullanıldığı çalışmada toplam CL sayısını 10.24 ± 0.57 olarak belirlemişlerdir. Baracaldo ve ark. (2000) melez etçi düve ($n=51$) ve ineğin ($n=12$) kullanıldığı ve östrus siklusunun rastgele bir gününde ovaryumlardaki iki en büyük folikülün aspirasyonu ($n=21$), 5mm’den büyük tüm foliküllerin aspirasyonu ($n=19$) ve östradiol (E-17 β) +progesteron ($n=23$) yöntemlerini çalışmış ve sırasıyla CL sayılarını 23.3 ± 1.9 , 17.9 ± 1.9 ve 20.1 ± 2.6 olarak bulmuşlardır. Guerra ve ark. (2012) etçi sığırlarda çalıştıkları ve süperstimülatör tedavi süresini 7 güne uzatmanın transfer edilebilir embriyo sayısını artırabileceğini hedefleyen çalışmalarında kontrol (4 gün) ve uzun (7 gün) FSH gruplarında CL sayılarını sırasıyla 27.2 ± 2.1 ve 20.8 ± 2.2 olarak belirlemişlerdir. Cirit ve ark. (2019) Laktasyondaki simental ineklerde, folikül aspirasyonunun ardından 1 ya da 2 gün sonra süperstimülasyona başlamanın ve FSH uygulamasının geleneksel 4 gün yerine 6 güne uzatılmasının süperovulatör yanıt ve embriyo verimine etkisini araştırdıkları çalışmalarında

CL sayılarını FA1 (1 gün beklenen) ve FA2 (2 gün beklenen) gruplarında sırasıyla 21.0 ± 1.96 ve 19.0 ± 1.91 olarak tespit etmişlerdir. Sunulan çalışma gruplarında ki CL sayılarının yukarıda Holştayn ineklerde yapılan çalışmalardan (Karaşahin ve ark. 2016; Kara ve ark. 2020) yüksek olduğu, etçi ve Simental inek gruplarıyla benzer (Baracaldo ve ark. 2000; Guerra ve ark. 2012; Karaşahin ve ark. 2016; Cirit ve ark. 2019) ya da daha düşük olduğu görüldü. Bunun nedenleri; çalışmada kullanılan hayvanların ırkı, yaşı, laktasyon durumu, süt verimi, farklı foliküler dalga senkronizasyon ve süperovulasyon yöntemlerinin kullanılması, donör hayvanların farklı doğal AMH düzeyleri, besleme, çevresel, teknik ve yönetsel faktörlerin farklılığının süperovulasyon sonuçlarını etkilemiş olabileceği değerlendirildi (Mikkola, Hasler ve Taponen. 2020).

Sunulan çalışmada anovule folikül sayısı bakımından grup 1 (1.80 ± 0.49), grup 2 (4.10 ± 1.07) ve grup 3 (0.30 ± 0.15) arasında yüksek düzeyde anlamlı fark bulundu ($p < 0.01$). Baracaldo ve ark. (2000)'ı iki en büyük folikül ve ayrıca 5 mm'den büyük tüm foliküllerin aspirasyonundan bir gün sonra süperstimülasyona başlamanın test edildiği çalışmalarında, sırasıyla 2.2 ± 0.5 ve 2.1 ± 0.3 ortalama anovulatör folikül sayıları, Guerra ve ark. (2012) ise folikül aspirasyonundan 1,5 gün sonra süperstimülasyon uygulamalarına başladıkları geleneksel 4 gün veya uzatılmış 7 gün FSH uygulamaları yaptıkları çalışmalarında sırasıyla 3.6 ± 1 ve 3.6 ± 1.2 anovulatör folikül sayıları elde etmişlerdir. Sunulan çalışmada anovule folikül sayıları, foliküler dalga senkronizasyonlarının GnRH ile yapıldığı gruplarda (grup 1 ve 3) folikül aspirasyon grubuna (grup 2) göre daha düşük bulundu. Grup 2'de anovule folikül sayılarının yukarıdaki her iki çalışmadan daha fazla olduğu görülmektedir. Foliküllerin ovulasyonu durumunda FSH iki salınımına sahiptir. 1. salınım ovulatör LH salınımı ile ilişkili olan preovulatör salınım, 2. salınım ise foliküler dalga ortaya çıkması için olan perioovulatör salınımdır. CL'siz folikül aspirasyonundan sonra ise FSH muhtemeldir ki bir salınımına sahiptir ve bu salınım ovulasyonlu olana göre daha yüksektir. Folikül aspirasyonu sonrası daha yüksek salınan endojen FSH'da foliküler havuzdan daha fazla sayıda folikül çıkarmaktadır (El-Sherry ve ark. 2012). Sunulan çalışmanın folikül aspirasyon grubunda anovulatör folikül sayısının GnRH ile foliküler dalga senkronizasyonu yapılan grup 1 ve 3'den yüksek olmasının nedeni grup 2'deki donör ineklerin ortalama serum AMH düzeylerinin daha yüksek olmasına (istatistiksel fark yok) paralel olarak, flushing öncesi yapılan ovaryum kontrollerinde Grup 1, 2 ve 3'de CL+anovule folikül sayıları sırayla 207, 237 ve 121 olarak tespit edildi. Sunulan çalışmanın CL'siz folikül aspirasyon grubunda,

FSH'nın bu salınım profilinden dolayı foliküler havuzdan GnRH'lı grup 1 ve 3'e göre daha fazla folikül çıkmış olabilir. Ayrıca 4 günlük FSH enjeksiyon protokolleri sonrası foliküler dalgadaki 3-5 mm'lik foliküllerin tohumlama zamanına ovulasyon kapasitesini edinmiş olabileceği, foliküler dalgaya dahil olmuş daha küçük (1-2 mm) foliküllerin ise tohumlama zamanında henüz ovulatör kapasiteye ulaşmamış olabileceği ve bu nedenle anovulatör folikül olarak kalabileceği değerlendirildi (Dias ve ark. 2014; Ginther 2016; Cirit ve ark. 2019).

Foliküler dominantlık, türe özgü ovulasyonun oluşturulması için ovaryum foliküler dinamiklerinde kilit bir mekanizmadır (Ginther ve ark. 2001). Sığırlarda dominant bir folikülün ortaya çıkması aynı foliküler dalga içindeki subordinant foliküllerin atrezisine neden olmaktadır (Ginther ve ark. 1996). Foliküler dominantlığın süperovülasyon üzerindeki olumsuz etkileri ve oosit gelişimsel potansiyelini de olumsuz etkilediği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Guilbault ve ark. 1991; Stock, Ellington ve Fortune 1996; Hendriksen ve ark. 2004). Sunulan çalışmada (grup 2) aspire edilen folikül çaplarının en küçüğü 10 mm ve ortalamaları da 16.16 ± 2.73 mm olarak ölçülmüştür ve transvaginal folikül aspirasyonu tamamlandıktan hemen sonra folikül içeriğinin tamamen boşaldığı ultrasonografi kontrolü ile folikül antrumunun kaybolmasıyla doğrulanmış ve folikülün durumu bir daha izlenmemiştir. Fakat Viana ve ark. (2013) çalışmalarında, 8 ve 12 mm olan foliküllerdeki Re-filled (folikülün yeniden sıvı ile dolması) olgusunun 12 mm olan grupta daha yüksek olduğunu, foliküllerin aspirasyondan 12-24 saat içerisinde yeniden dolabildiği ve aspirasyondan 48 saat sonra rezidüel folikül çaplarının ortalama 9-10 mm olduklarını ayrıca rezidüel foliküllerin östrojen aktif olarak kaldıkları ifade edilmiştir. Ghetti ve ark. (2016) sığırlarda transvaginal folikül aspirasyonundan sonra rezidüel folikül oluşumu üzerine kan akış özellikleri ve ekzojen östradiol benzoatın etkisini araştırdıkları çalışmalarında, siklisun 8. günü ortalama 13.1 ± 0.9 mm çapındaki foliküllerin transvaginal folikül aspirasyonundan 12 saat sonra, 19 inekten 10'unda çapları 8-9.3 mm arasında değişen rezidüel foliküllerin oluştuğu, aspire edilen folikül duvarının kollapsından sonra kalan folikül duvarında vaskülarizasyonun devam ettiğini ve bu durumun rezidüel folikül oluşumuna katkıda bulunabileceğini ifade etmişlerdir. Sonuçta süperstimülasyon başlangıcında, folikül aspirasyonu sonrası yeniden dolan bu foliküller dominant folikül etkisi göstermiştir. Süperstimülasyon başlangıcında var olan dominant folikülün hem subordinant foliküller üzerine atrezik etkisi olmuş hem de foliküler dalganın çıkışında

olumsuz etkisi olmuş olabileceği bu bağlamda yukarıda bahsedilen atrezik foliküllerin süperstimülasyonla büyüyebileceği ama anovulatör folikül olarak kalma olasılığının yüksek olması (Viana ve ark. 2013), sunulan çalışmanın folikül aspirasyon grubundaki anovule folikül sayılarının yüksek olmasının ($p<0.05$) nedeni olduğu düşünüldü.

Foliküler punksiyondan sonra plazma östradiolünde önemli bir azalma olmaması (Bisinotto ve ark. 2012) ve süperovulasyondan sonra transfer edilebilir embriyo üretiminin iyileştirilememesi (Wolfsdorf ve ark. 1997; Shaw ve ark. 2000) gibi ultrason rehberli aspirasyonla folikül ablasyonunun kullanıldığı önceki çalışmalarda gözlemlenen tutarsızlıkların rezidüel folikül oluşumu ile ilişkili olabileceği de öngörüldü. Ayrıca folikülün delinmesi ile oluşan fiziksel hasarla aspire edilen foliküllerin kaderi arasındaki ilişkinin, aspirasyonda kullanılan iğnenin çapı, vakum basıncı ve aspirasyon prosedürlerinden etkilenebileceği ifade edilmiştir (Viana ve ark. 2013).

Sunulan çalışmada grup 2 (3.90 ± 1.32 ; $\%26.18\pm 8.49$) ile grup 1 (0.60 ± 0.27 ; $\%3.53\pm 1.99$) ve grup 3 (0.70 ± 0.33 ; $\%9.79\pm 5.90$) arasında UFO sayısı ve yüzde oranları yönünden istatistiksel fark önemli bulundu ($p<0.05$). Shaw ve ark. (2000) sadece 8 mm'den büyük foliküllerin aspire edilmesinden iki gün sonra süperstimülasyona başladıkları ve geleneksel süperovulasyon yöntemi ile karşılaştırdıkları çalışmalarında UFO ortalamalarını, aspirasyon grubunda 4.1 ± 0.2 ve geleneksel yöntemin kullanıldığı grupta da 3.4 ± 0.5 olarak saptandığını ve iki grup arasında anlamlı bir fark olduğunu bildirmişlerdir ($p<0.05$). Sunulan çalışmada folikül aspirasyon grubundaki UFO oranı (3.9 ± 1.32) ile Shaw ve ark. (2000) aspirasyon grup ortalamalarının (4.1 ± 0.2) benzer olduğu görüldü. Dell'Eva ve ark. (2019) sütçü sığırlarda süperovulasyon öncesi, siklisun 7 ve 8. gününde dominant foliküllerin rektal yolla elle patlatılmasından 1 gün sonra başladıkları süperstimülatör uygulamaları sonrası, embriyo üretimi ve kalitesini araştırdıkları çalışmalarında, sırasıyla $\%10.3$ ve $\%9.8$ UFO kazanımı elde etmişlerdir. Bu çalışmalarında geleneksel süperovulasyon protokolünü kontrol grubu olarak kullanmışlar ve $\%14.4$ ile diğer iki aspirasyon gruplarından daha yüksek UFO elde edildiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada grup 1'de ($\%3.53\pm 1.99$) UFO oranı daha düşük bulunurken grup 3 ($\%9.79\pm 5.90$) ile benzer ve folikül aspirasyon grubunda ise $\%26.17$ UFO oranı ile Dell'Eva ve ark. (2019)'nın çalışmalarından daha yüksek bulundu. Wiley ve ark. (2019) etçi sığırlarda endojen yüksek progesteron (HP) ve düşük progesteronun (LP) embriyo sayı ve kalitesi üzerine etkisini karşılaştırdıkları, her iki gruba da folikül aspirasyonu yöntemini uyguladıkları çalışmalarında LP grubunda 1.64, HP

grubunda 5.60 ortalama UFO oranı elde edildiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmanın folikül aspirasyon grubundaki UFO oranının (3.90 ± 1.32) Wiley ve ark. (2019)'nın LP ve HP grupları arasında yer aldığı değerlendirilebilir. Sunulan çalışmadaki grup 2 ile Wiley ve ark. (2019) LP Grubu arasında yöntemsel benzerlik bulunmaktadır. Her iki çalışmada da süperstimülasyon öncesi $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu ve folikül aspirasyonu yapılmış ve ekzojen P4 uygulanmıştır. Wiley ve ark. (2019) folikül aspirasyonundan bir gün sonra süperstimülasyona başlamışlar ve etçi donörlerde çalışmışlardır. Buna göre sunulan çalışmanın grup 2'si ile Wiley'in LP Grupları karşılaştırıldığında sunulan çalışmanın UFO oranlarının daha yüksek olduğu görüldü. García-Jiménez ve ark. (2019) süperovülasyon protokollerinden önce foliküler aspirasyon kullanılan Brahman donör ineklerinde süperovülasyon yanıtını geleneksel yöntemle karşılaştırdıkları çalışmalarında, aspirasyon grubunda; %2.88 ve kontrol grubunda: %6.93 UFO oranı bildirmişlerdir. Sunulan çalışmanın aspirasyon grubunda ise %26.17 ile çok daha yüksek UFO oranı tespit edilmiştir. Cirit ve ark. (2019) laktasyondaki simental ineklerde, folikül aspirasyonunun ardından 1 (FA1) ya da 2 (FA2) gün sonra süperstimülasyona başlamanın ve FSH uygulamasının geleneksel 4 gün yerine 6 güne uzatılmasının süperovulatör yanıt ve embriyo verimine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, FA1 ve FA2 gruplarında ortalama UFO sayılarını 1.7 ± 0.72 ve 0.4 ± 0.24 olarak bildirmişler, iki grup arasında istatistiksel bir fark olmadığını ama FA2 grubunda UFO oranında bir azalış olduğunu ifade etmişlerdir. Sunulan çalışmada UFO sayısı, GnRH ile foliküler dalga senkronizasyonu yapılan grup 1 ve 3'de Cirit ve ark. (2019)'dan daha düşük ya da benzer bulunurken folikül aspirasyon grubunda (grup 2) ise 3.90 ± 1.32 ile daha yüksek olduğu görüldü. Mahmood ve ark. (2021) GnRH ya da östradiol benzoat ile CIDR kombinasyonunun subtropik şartlardaki sığırlarda (*Bos indicus* ve *Bos taurus*) in vivo embriyo üretimini geliştireceğine dair yaptıkları çalışmalarında, 42 Holştayn ve 28 melez inek donör olarak kullanılmış hayvanlar önce senkronize edilip siklisun 8. günü GnRH+CIDR, EB+CIDR ve geleneksel süperovülasyon protokolleri uygulamaları yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, UFO yüzdeleri sırasıyla: %3.86, %3.97 ve kontrol grubunda da %28.88 olarak bulunmuştur. Tez çalışmamızın grup 1 ve 3'ü ile Mahmood ve ark. (2021) çalışmalarındaki GnRH+CIDR ve EB+CIDR çalışma gruplarının UFO oranlarının benzer ya da düşük olduğu, geleneksel süperovülasyon yönteminin kullanıldığı kontrol grubunun UFO yüzdeleriyle de sunulan çalışmanın grup 2'sinin benzer olduğu görüldü. Mahmood ve ark. (2021)'nin kontrol grubuyla sunulan çalışmanın folikül

aspirasyon grubundaki UFO yüzdelerinin her iki çalışmanın diğer gruplarından yüksek olmasının sebebi, süperovulasyon uygulamalarına başlarken ovaryumlarda olması muhtemel dominant folikül varlığının süperovulasyon cevabını azaltmış olabileceği değerlendirildi (Guilbault ve ark. 1991; Viana ve ark. 2013; Bo ve Mapletoft 2014; Ghetti ve ark. 2016; Cirit ve ark. 2019; Mikkola, Hasler ve Taponen 2020).

Guerra ve ark. (2012) etçi sığırlarda siklisun 5-8. günleri arasında folikül aspirasyonu yapıldıktan 1,5 gün sonra başlanan geleneksel 4 gün ya da uzatılmış 7 gün FSH enjeksiyonları sonrası süperovulasyon yanıtlarını değerlendirdikleri çalışmalarında, UFO oranlarını sırasıyla 5.8 ± 2.0 ve 5.8 ± 1.5 bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada en yüksek UFO oranına sahip olan folikül aspirasyon grubu ($3,9 \pm 1.32$) ve diğer gruplarda daha düşük UFO oranı elde edildi. Ayrıca Guerra ve ark. (2012)'nin süperovulasyon sonuçları; anovule folikül, UFO sayısı ve fertilizasyon yüzdeleri yönünden beraber değerlendirildiğinde, Viana ve ark. (2013)'nin folikül aspirasyonu sonrası %73.2 oranında karşılaştıkları rezidüel folikül oluşumu ve bunların süperovulasyon cevabı üzerine olumsuz etkileri nedeniyle anovule folikül ve UFO sayılarının yüksek, fertilizasyon yüzdelerinin de bir çok çalışmadan (Baracaldo ve ark.2000; Dalton ve ark. 2000; Sartori ve diğ. 2004b; Cirit ve ark.2019) düşük olmasının sebebi olarak değerlendirilebilir.

Stock ve ark. (1996) süperstimülatör tedavi başında dominant bir folikülün varlığının, sığırlarda süperovülatör FSH dozları ile foliküler alımı etkilemediğini ancak ovulasyonu engelleyebileceğini, Veiga-Lopez ve ark. (2006) ekzojen gonadotropinlerle, süperstimülatör uygulamalarına başlama anında erken atreziyadaki foliküllerin kurtarılabilceğini ve büyümesinin stimüle edilebileceğini fakat bu foliküllerin daha düşük ovulasyon kabiliyetine ve oositlerinin de daha düşük gelişimsel yeterliliğe sahip olacağını ifade etmişlerdir. Tüm bunlarla birlikte sunulan çalışmanın folikül aspirasyon grubundaki UFO oranının, yukarıdaki raporlardan yüksek ya da benzer olması; çalışmadaki donör hayvanların ırkı, yaşı, laktasyon durumu, beslenmesi, iklim, çevre ve yönetsel farklılıklar, kullanılan foliküler dalga senkronizasyon yöntemleri, süperstimülasyona başlama zamanı ve süresi de etkili olmuş olabilir (Bo ve Mapletoft 2014; Cirit ve ark. 2019; Mikkola, Hasler ve Taponen 2020).

Sunulan çalışmada gruplar arasında fertilize oosit yüzde değerleri açısından fark önemli bulundu ($p < 0.05$). Grup 1 (%96.47) ve kontrol grubu olan grup 3 (%90.21)'ün fertilizasyon yüzdeleri, grup 2 (%73.82)'den önemli oranda yüksekti. Süperovüle edilmiş sığırlar uygun

zamanda yüksek kaliteli sperma ile tohumlandığında dölleme oranları %80'den büyük bulunmuştur (Baracaldo ve ark. 2000; Dalton ve ark. 2000; Sartori ve ark. 2004b; Cirit ve ark. 2019). Baracaldo ve ark. (2000) fertilize oosit yüzdelerini iki en büyük folikülün ve 5 mm'den büyük tüm foliküllerin aspirasyonu sonrası başlanan süperstimülasyon uygulamalarında sırasıyla %88.1 ve %83.8 olarak belirlendiği, östradiol+P4 (kontrol) grubu (%90.4) ile aralarında istatistiksel bir farkın bulunmadığını bildirmişlerdir ($p>0.05$). Sunulan çalışmanın GnRH ile foliküler dalga senkronizasyonlarının yapıldığı grup 1 ve grup 3'de Baracaldo ve ark. (2000) çalışmalarından daha iyi ya da benzer sonuçlar alınmışken grup 2'de %73.82 fertilizasyon oranı ile daha düşük bir değer gözlemlendi. Rao ve ark. (2009) Zebu sığırlarında folikül aspirasyonu ve steroid ile foliküler dalga senkronizasyonundan sonra süperstimülasyon yaptıkları çalışmalarında, her iki yöntemde fertilizasyon oranları ve uygun embriyo kazanımını olumsuz etkilemeden kullanılabilmesini ifade etmişlerdir. Cirit ve ark. (2019) laktasyondaki Simental ineklerde, folikül aspirasyonunun ardından 1 (FA1) ya da 2 (FA2) gün sonra süperstimülasyona başlamanın ve FSH uygulamasının geleneksel 4 gün yerine 6 güne uzatılmasının süperovulasyon yanıt ve embriyo verimine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, FA1 ve FA2 gruplarında fertilizasyon yüzdelerini sırasıyla; %84.6 ve %95.8 olarak bildirmişler, iki grup arasında istatistiksel bir fark olmadığını ama FA2 grubunun fertilizasyon oranında bir artış olduğunu, Simental ineklerde folikül aspirasyonundan 2 gün sonra başlanan ve 4 gün yerine 6 güne süperstimülasyon uygulamalarını uzatmanın foliküler dalgadaki daha küçük foliküllerin ovulasyon zamanına kadar ovulasyon kapasiteye ulaşmasına imkan verebileceğini ve böylece fertilize oosit yüzdesi, transfer edilebilir ve dondurulabilir embriyo sayısının artırılabilmesini ifade etmişlerdir. Sunulan çalışmanın GnRH ile foliküler dalga senkronizasyon gruplarında grup 1 (%96.47) ve 3'de (%90.21) Cirit ve ark. (2019) ile benzer (%84.6 ve %95.8) fertilizasyon oranları elde edilmiştir. Fakat grup 2'de %73.82 fertilizasyon oranı ile daha düşük oran elde edildi. Bu durum aspirasyon işlemi için kullanılan OPU cihazının özelliklerinden (aspirasyon iğne ucunun kalınlığı, vakum basıncı) ve farklı OPU prosedürlerinden, aspire edilen folikülün yerinde yeniden folikül sıvısı birikimi ve bu folikül içeriğinin dominant folikül etkisi göstermesinden kaynaklanmış olabileceği değerlendirildi (Viana ve ark. 2013; Ghetti ve ark. 2016). Mahmood ve ark. (2021) GnRH ya da östradiol benzoat ile CIDR kombinasyonunun subtropik şartlardaki sığırlarda (*Bos indicus* ve *Bos taurus*) in vivo embriyo üretimini geliştireceğine dair yaptıkları çalışmalarında, 42 Holştayn ve 28 melez

inek donör olarak kullanılmış hayvanlar önce senkronize edilip siklisun 8.günü GnRH+CIDR, EB+CIDR ve geleneksel süperovulasyon protokolleri uygulamaları yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, fertilizasyon oranları sırasıyla: %96.14; %96.03 ve kontrol grubunda da %57.60 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak ekzojen progesteron ilavesinin embriyo fertilesini ve in vivo embriyo üretimini artırabileceği ifade edilmiştir. Sunulan çalışma da ekzojen progesteron varlığında yapılmış ve GnRH+PRID gruplarında grup 1 (%96.47) ve grup 3 (%90.21)'deki fertilizasyon oranları ile Mahmood ve ark. (2021) sonuçlarına benzer oranlar elde edildi. Mahmood ve ark. (2021) çalışmalarındaki geleneksel süperovulasyon yönteminin kullanıldığı kontrol grubunun fertilizasyon (%57.60) ve UFO yüzdeleriyle de (%28.88) grup 2 (%73.82; %26.17) benzerlik göstermektedir. Mahmood ve ark. (2021)'nin kontrol grubuyla sunulan çalışmanın folikül aspirasyon grubundaki fertilizasyon yüzdelerinin düşük olmasının sebebi, süperovulasyon uygulamalarına başlarken ovaryumlarda olması muhtemel dominant folikül varlığının süperovulasyon cevabını azaltmış olabileceği değerlendirildi (Guilbault ve ark. 1991; Viana ve ark. 2013; Bo ve Mapletoft 2014; Ghetti ve ark. 2016; Cirit ve ark. 2019; Mikkola, Hasler ve Taponen 2020).

Sunulan çalışmada gruplar arasında 1.kalite embriyo sayıları yönünden istatistiksel fark bulunmadı ($p>0.05$). Fakat dondurulabilir embriyo sayısı (1.kalite embriyo) bakımından grup 1 (11.90 ± 2.34) ve grup 2'nin (10.00 ± 3.55) kontrol grubuna (6.00 ± 1.14) göre yaklaşık iki katına yakın sayısal üstünlüğü gözlemlendi. Hinshaw ve ark. (2015)'i 'Süperovülasyon amacıyla Folikül Dalgası Oluşumunu Senkronize Etmek için GnRH Kullanımına Yönelik İki Yaklaşımın Karşılaştırılması' başlıklı çalışmalarında, etçi ırk sığırlarda PGF₂ α enjeksiyonu ve bir progesteron cihazının yerleştirilmesinden 7 gün sonra uygulanan GnRH'lı bir protokol (grup 1) ile bir progesteron aygıtının yerleştirilmesinden 2 gün sonra uygulanan GnRH (grup 2) ile foliküler dalga senkronizasyonlarının ardından elde edilen 1.kalite embriyo sayılarını gruplara göre sırasıyla; 8.9 ± 1.2 ve 7.2 ± 1.3 olarak belirlemişlerdir. Sonuçları karşılaştırdığımızda sunulan tez çalışmasında grup 1 ve 2'de daha yüksek sayıda dondurulabilir embriyo alındığı görülmektedir. Sunulan çalışmanın kontrol grubundan elde edilen 1.kalite embriyo sayısının ise Hinshaw ve ark. (2015)'dan düşük olduğu tespit edildi. Fakat 1.kalite embriyo yüzdeleri bakımından değerlendirildiğinde sunulan çalışmanın kontrol grubunda yaklaşık %70 iken Hinshaw ve ark. (2015)'da ise yaklaşık %45 oranında 1.kalite embriyo elde edildiği görüldü. Cirit ve ark. (2019)

laktasyondaki Simental ineklerde, folikül aspirasyonunun ardından 1 ya da 2 gün sonra süperstimülasyona başlamanın ve FSH uygulamasının geleneksel 4 gün yerine 6 güne uzatılmasının süperovulatör yanıt ve embriyo verimine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, uzatılmış süperovulasyon programına başlarken folikül aspirasyonu sonrası 2 gün bekleminin transfer edilebilir ve dondurulabilir embriyo sayısını artırma potansiyeline sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Dondurulabilir embriyo sayılarını da FA1 (1 gün beklenen) ile FA2 (2 gün beklenen) gruplarında sırasıyla 3.5 ve 5.3 olarak bildirmişlerdir. Wiley ve ark. (2019) MOET programlarının uyarılması sırasındaki subluteal P4 (1-2 ng/ml) konsantrasyonlarının, üretilen 1.kalite embriyoların artmasına neden olduğunu bu arada üretimi engellenmemiş endojen P4 altında ise daha fazla miktarda embriyo üretildiğini görmüşler ve çalışmalarında HP grubunda LP grubuna göre daha fazla sayıda oosit-embriyo elde edildiğini ifade etmişlerdir. Wiley ve ark. (2019) çalışmalarında 1.kalite embriyo sayıları ve 1.kalite embriyo yüzde değerlerini sırasıyla HP Grubunda 7.08 ve %36, LP Grubunda 6 ve %55 olarak bildirilmiştir. Sunulan çalışmada 1.kalite embriyo sayıları ve yüzde değerleri üç grup için sırayla 11.9; %72.57, 10; %52.02 ve 6; %69.94 olarak bulundu. Sonuçlar yukarıdaki çalışmanın LP grubuyla sunulan çalışmanın kontrol grubundaki 1.kalite embriyo sayılarının benzer fakat grup 1 ve 2'deki 1.kalite embriyo sayılarının HP ve LP gruplarından daha yüksek olduğu saptandı. Sunulan çalışmada özellikle grup 1 ve 2'de 1.kalite embriyo sayılarının yukarıdaki çalışmadan daha yüksek olması, çalışmada kullanılan donör hayvanların yaşı, ırkı, laktasyon durumu, süperstimülasyona başlama zamanı, besleme, yönetimsel ve çevresel faktörlerin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Sunulan çalışmada P4 değerleri her ne kadar çalışma süresince ölçülmemiş olsa da protokolün 0.günü CL varlığı, 7.günüde CL'nin olmadığı kontrol grubundaki bir donör hariç ultrasonografi kontrolleriyle ortaya konmuştur. Laktasyonda olmayan Holştayn ineklerde ticari progesteron cihazlarının progesteron salınım profillerinin araştırıldığı bir çalışmada CL'siz ineklerde, P4 aygıtları yerleştirildikten sonra 0-10 gün arası plazma P4 konsantrasyonları değerlendirilmiş ve PRID-Delta (1.55 g)'nın intra vajinal yerleştirilmesinden sonraki 0-10 günlük ortalamasının 1.6 ng/ml P4 olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca aynı cihazların kan progesteron düzeylerinin, günlük ortalama 40 kg süt veren ineklerde artmış kuru madde alımının sonucu olarak artan karaciğer kan akışı ile progesteron ve diğer steroidlerin karaciğerde yıkımlanması nedeniyle yaklaşık olarak %40 düzeyinde düştüğü bildirilmiştir (Silva ve ark. 2021). Bu bilgiler ışığında sunulan çalışmanın donör

ineklerinde süperstimülasyon uygulamalarına subluteal progesteron ortamında başladığı söylenebilir.

Sunulan çalışmada gruplar arasında, toplam oosit-embriyo, transfer edilebilir embriyo sayıları ve geri kazanım oranları arasındaki fark önemsiz çıkmıştır ($p>0.05$). Amerika Embriyo Transfer Derneği'nin (AETA) 2021 Survey raporuna göre, sütçü ırk sığırlardan elde edilen ortalama oosit-embriyo sayısı 7.7, transfer edilebilir embriyo ortalaması 4.9 ve geri kazanım oranı da %63 olarak, etçi ırk sığırlarda da sırasıyla 10.8, 6.0 ve %56 olarak bildirilmiştir (Demetrio 2021). Ayrıca Avrupa Embriyo Teknoloji Derneğinin (AETE) 2023 yılı raporuna göre Avrupa in vivo transfer edilebilir embriyo ortalaması 5.3 olarak bildirilmiştir (Quinton 2023). Sunulan çalışmada gruplara göre ortalama oosit-embriyo sayıları sırasıyla; 16.10, 17.3 ve 9.40 olarak bulundu ve bu sonuçlar AETA'nın 2021 raporundaki sütçü ırk sığır ortalamalarından yüksek, sadece kontrol grubunda etçi ırk ortalamalarından 1.40 düşük bulundu. Yine sunulan çalışmada gruplara göre transfer edilebilir embriyo ortalamaları sırasıyla; 14.30, 11.70 ve 8.50 olduğu belirlendi ve bu değerlerin AETA 2021 ile AETE 2023 survey raporlarında bildirilen ortalamalardan yüksek olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca sunulan çalışmada ki geri kazanım oranları gruplara göre sırasıyla %81.71, %87.17 ve %73.59 değerleri ile AETA 2021 survey ortalamalarından yüksek bulundu.

Tohumlama sonrası 7. gün yıkamalarında daha çok kompakt morula ve blastosist aşamalarında, tohumlama sonrası 8. gün yapılan uterus yıkamalarında ise blastosist ve expanded blastosist aşamalarında embriyolar elde edildiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Tekeli 1994; Mapletoft 2013; Dursun ve Karaşahin 2021). Aynı yıkama gününde farklı gelişim safhalarının birlikte görülmesi; tohumlamadan sonra zigotun oluşma zamanı ve embriyonun gelişme yeteneğine bağlı olduğu, embriyonun iyi geliştiği durumlarda tohumlamadan sonraki 7.günde de expanded blastosist aşamasında embriyoların görülebileceği bildirilmektedir (Dursun ve Karaşahin 2021). Ayrıca embriyo dondurma protokollerine in vivo ve in vitro sığır embriyolarının kompakt morula ve blastosist safhalarının diğer gelişim aşamalarına göre daha iyi sağ kalıma sahip olduğu bildirilmiştir (Yılma 2022). Sunulan çalışmada süperovulasyon sonrası flushing işlemleri kontrol grubunda 7.gün, grup 1 ve 2'de ise 7,5. günde yapıldı. Nedeni de daha ileri gelişimsel aşamada embriyo elde etmek ve bunların morfolojik olarak tanınmasının az deneyimli kişiler tarafından da kolaylıkla yapılabilmesiydi. Sunulan çalışmada embriyo gelişim aşamalarına

göre gruplar karşılaştırıldığında, kompakt morula aşamasındaki embriyo sayılarının grup 3'te grup 1 ve grup 2'den fazla olduğu ($p<0.05$), yüzde farklılık açısından da (71.42 ± 7.24) yüksek oranda anlamlı farklılık olduğu ($p<0.01$) görüldü. Kontrol grubunda blastosist ve ekspanded blastosist aşamalarında embriyo elde edilmedi. Grup 1 ve 2 arasında embriyo gelişim aşamaları yüzde değerleri bakımından istatistiksel fark bulunmadı ($p>0.05$) ve kontrol grubuna göre daha dağınık aşamalarda embriyolar elde edildi. Kompakt morula aşamasındaki embriyoların az deneyimli kişiler tarafından UFO ile karıştırılabileceği ifade edilmektedir (Bó ve Mapletoft 2013; Jahnke ve ark. 2014). Buna göre daha ileri gelişimsel aşamalarda embriyo elde etmek için flushing zamanınının 12 saat kadar ertelenmesi tavsiye edilebilir.

5.2. Ekzojen FSH ile Süperstimülasyonun Dolaşımdaki AMH Düzeyine Etkisi

Sığırlarda AMH kan düzeyleri ölçüldüğünde, bireysel olarak reproduktif dönemler içerisinde küçük değişimler göstermesine rağmen farklı bireyler arasında önemli derecede değişim gösterdiği bildirilmektedir. Center ve ark. (2018) çalışmalarında kullandıkları 79 etçi ineğin serum AMH değerlerinin 0.013-0.898 ng/ml aralığında değiştiğini ve ortalama 0.293 ng/ml olduğunu bildirmişlerdir. Gobikrushanth ve ark. (2018) laktasyondaki Holştayn ineklerin ortalama serum AMH konsantrasyonlarını 191.1±6.3 pg/ml, Shehabeldin ve ark. (2021) 0.174 ng/ml olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada 30 Holştayn inek kullanılmıştır ve foliküler dalga senkronizasyonu sonrası (AMH1) alınan kan serumu AMH değerlerinin 40 pg/ml (0.04 ng/ml) ile 730 pg/ml (0.73 ng/ml) arasında değiştiği, ortalama AMH düzeyinin de 230 pg/ml (0.23 ng/ml) olduğu tespit edildi. Sunulan çalışmadaki donör ineklerin AMH ortalamalarının, Center ve ark. (2018) bildirdikleri ortalamalardan biraz düşük, Gobikrushanth ve ark. (2018) ile Shehabeldin ve ark. (2021)'nin bildirdikleri ortalama değerlerden yüksek olduğu görüldü. Carter ve ark. (2016) farklı sığır ırklarının AMH düzeylerini belirledikleri bir çalışmada Zebu, Avrupa ırkı (Bos taurus) ve melez (Zebu-taurus) ırk sığırların ortalama AMH konsantrasyonlarını sırasıyla; 0.77 ±0.09 ng/ml, 0.33±0.24 ng/ml ve 0.63±0.07 ng/ml olarak bildirmişlerdir. Koca ve ark. (2023) 60 Siyah Alaca Holştayn düvenin AMH konsantrasyonlarının 84-714 pg/ml arasında değiştiğini ve ortalamasının 305 pg/ml olduğunu belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada elde edilen AMH seviyelerinin, Holştayn ırkı ineklerde yapılan ve yukarıda sonuçları verilen çalışmalarla

benzer ölçüm aralığında olduğu görülmekte, farklılıkların daha çok ırk ve parite farklılıklarından kaynaklandığı anlaşılmaktadır (Guerreiro ve ark, 2014; Baldrighi ve ark, 2014; Batista ve ark, 2014). Ayrıca, AMH analiz çalışmalarında kullanılan antikoagülanlı kan alma tüplerinin heparin ya da EDTA'lı olması, plazma ya da serumun kullanılması, örnekleri saklama koşulları, test ölçüm yöntemi ve kullanılan AMH test kitinin de test sonuçlarını değiştirebileceği ifade edilmiştir (Rico ve ark. 2012; Fleming ve ark. 2013; Center ve ark. 2018).

Günümüzde süperovulasyon programları yoluyla üretilen embriyoların çoğunluğu (%70) süperovulasyon çalışmalarına alınan donör sığırların %30'undan alınmıştır. Geri kalan donörlerden ortalamaların altında embriyo elde edilmiş ya da hiç embriyo alınamamıştır. Bu nedenle daha fazla sayıda yüksek AMH konsantrasyonuna sahip donör sığır seçme imkanına sahip olmanın, üstün genetiklerden embriyo üretimini geliştirerek, embriyo başına düşen maliyetlerin azaltılmasına imkân sağlayabileceği ifade edilmektedir (Bo ve Mapletoft 2014; Gobikrushanth ve ark. 2017-2018; Jazmín ve ark. 2023). Serumdaki AMH düzeyinin tek bir ölçümü ile sığırlarda ovaryum folikül rezervinin büyüklüğü tespit edilebilmektedir. Ayrıca AMH düzeyinin süperovulasyon yanıtı, toplam elde edilen embriyo sayısı ile pozitif ilişkili olduğu birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Souza ve ark. 2015; Abdel Aziz ve ark. 2017; Nabenish ve ark. 2017).

Rico ve ark. (2009) AMH konsantrasyonu ile süperovulasyon yanıtı arasındaki ilişkiyi araştırdıkları ve 18 Holştayn ineği değerlendirdikleri çalışmada, plazma AMH konsantrasyonu ile büyük folikül sayısı ve süperovulasyon sonrası CL sayısı arasında güçlü ilişki olduğunu bildirmişler fakat yazar embriyo kazanımıyla ilgili sonuç belirtilmemiştir. Monniaux ve ark. (2010) Holştayn X Normande sütçü ineklerin (n=45) kullanıldığı, plazma AMH konsantrasyonu ile embriyo üretimini karşılaştırdıkları çalışmada, plazma AMH konsantrasyonunun donör başına toplam oosit-embriyo sayısı ve transfer edilebilir embriyo sayısı ile ilişkili bulunduğunu bildirmişlerdir. Souza ve ark. (2015) ortalama AMH konsantrasyonunun, süperovulasyon yanıtı ($p<0.01$), toplam oosit-embriyo ($p<0.01$) ve toplam transfer edilebilir embriyo sayıları ($p<0.02$) ile son derece ilişkili olduğunu bildirmişler fakat fertilize oosit ve dejenere embriyo sayısı arasında ilişki bulunmadığını ifade etmişlerdir. Abdel Aziz ve ark. (2017) Holştayn sağmal ineklerin süperovulasyon öncesi ölçülen dolaşımdaki AMH konsantrasyonu ile süperovulasyon yanıtı arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında; ortalama AMH konsantrasyonu ile CL sayısı, toplam

oosit-embriyo sayısı, transfer edilebilir embriyo ve 1.kalite embriyo sayıları arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir ($p<0.05$). El-Keraby ve ark. (2021) yüksek (0.27 ± 0.02 ng/ml) ve düşük (0.07 ± 0.01 ng/ml) AMH seviyelerine sahip iki gruptan oluşan Holştayn inekleri kullandıkları çalışmada, her iki grup arasında AMH düzeyi ile antral folikül sayısı ($p<0.01$), süperovulasyon yanıtı (CL sayısı) ($p<0.01$) ve toplam oosit-embriyo sayısı ($p<0.05$)'nın son derece ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Marzouk ve ark. (2020) Holştayn ineklerin ($n=19$) süperovulasyon öncesi dolaşımdaki AMH düzeyi ile toplam oosit-embriyo sayısı ($p<0.05$), transfer edilebilir embriyo sayısı ($p<0.05$), 1.kalite embriyo sayısı ($p<0.01$), 2. ve 3.kalite embriyo sayıları ($p<0.05$) ile son derece ilişkili olduklarını, ayrıca diğer çalışmalardan farklı olarak AMH düzeyi ile dejenere embriyo sayıları arasında da ($p<0.05$) ilişki bulunduğu ifade edilmiştir. Sunulan çalışma ile Rico ve ark. (2009), Monniaux ve ark. (2010), Souza ve ark. (2015), Abdel Aziz ve ark. (2017) ve El-Keraby ve ark. (2021)'nin çalışmalarına benzer şekilde serum AMH düzeyi ile süperovulasyon yanıtı, toplam oosit-embriyo sayısı, transfer edilebilir embriyo sayısı, 1.kalite embriyo sayıları arasında pozitif bir ilişki olduğu ($p<0.01$) ortaya konulmuştur. Fakat Marzouk ve ark. (2020)'nin aksine, sunulan çalışmada 2., 3.kalite ve dejenere embriyo sayıları ile AMH düzeyleri arasında ilişki kurulamadı.

Dişi sığırların farklı yaş, reproduktif dönem ve iklim koşullarında plazma AMH seviyelerinde önemli düzeyde değişimin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hirayama ve ark. 2017; Sabuncu ve ark. 2019; Alward, Kayla ve ark. 2021; Contreras-Méndez ve ark. 2024). Aynı östrus siklusu sırasındaki kan AMH düzeylerindeki değişim için ise farklı sonuçlar bildirilmiştir.

İnsanlarda ovaryum östrus siklusu sırasında, AMH endokrin seviyelerini gösteren sonuçlar tutarlı değildir. Bazı çalışmalar menstrual siklus boyunca AMH düzeyinde önemli düzeyde dalgalanma olmadığını söylerken (Hehenkamp ve ark. 2006; La Marca ve ark. 2006; Streuli ve ark. 2008) diğerleri, özellikle yüksek ortalama AMH düzeylerine sahip genç kadınların foliküler faz sırasında en yüksek AMH konsantrasyonuna sahip olduklarını bildirmişlerdir (Wunder ve ark. 2008; Sowers ve ark. 2010). Etçi düvelerde AMH konsantrasyonunun aynı bireylerde, ovulasyondan 4 gün önce ile ovulasyondan 4 gün sonraya dayanan bir zaman diliminde oldukça statik olduğu ifade edilmektedir (Ireland ve ark. 2008, 2011). Buna karşılık Rico ve ark. (2009) sütçü ineklerde AMH konsantrasyonunun östrusta: $0.049 - 0.359$ ng/ml, östrustan 7 gün sonra: $0.026 - 0.212$ ng/ml olarak ölçüldüğünü bildirmişler, sütçü

ineklerde AMH'nın östrus siklusu sırasında belirli bir dinamik profil sergilediğini, östrustan sonra AMH konsantrasyonunda bir azalış olduğunu, siklisun 4-9 günleri arası minimal değerlere ulaştığı ve sonraki östrusa kadar yavaş bir artışın olduğunu, bu durumun özellikle yüksek ortalama AMH konsantrasyonuna sahip olanlarda bariz olduğu ($p<0.05$) ifade edilmiştir. Ayrıca embriyo üretimi için en iyi inekleri seçmek amacıyla kan AMH konsantrasyon değerlerini belirlemeye en uygun olan östrus siklus döneminin, östrusta ve siklisun 12. gününden sonra olduğunun bulunduğu ifade edilmiş ve bu sonuçların insanlardaki verilerle (Wunder ve ark. 2008; Sowers ve ark. 2010) uyumlu olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaların aksine, seksüel siklusun farklı evrelerinde AMH düzeyinin minimum değişiklik gösterdiği ve bu nedenle siklusun herhangi bir döneminde bir kez ölçülen AMH düzeyinin çeşitli amaçlara yönelik olarak güvenli bir şekilde kullanılabileceğini ifade eden çalışmalarda bulunmaktadır. Dolaşımdaki AMH konsantrasyonu ile yüksek verimli sütçü ineklerin süperovulasyon yanıtı arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, bireysel ineklerde AMH düzeyinin tekrarlanabilirliğini belirlemek için 72 Holştayn inekten üç farklı siklus gününde; rastgele bir gün, proöstrus ve diöstruste kan alınarak AMH düzeylerine bakılmıştır. İnekler için analizin test edildiği üç zaman noktasındaki AMH'nın tekrarlanabilirliği ($r= 0.91$) yüksek bulunmuştur. Genel olarak bir analiz değerinin diğer tüm test ve 3 analizin ortalama değerine çok benzer bilgiler sağladığı bildirilmiştir (Souza ve ark. 2015). Senkronize ve doğal östrus siklusu sırasındaki AMH konsantrasyon değişiminin incelendiği, 44 sütçü ve 24 etçi düvenin kullanıldığı çalışmada östrusta: AMH konsantrasyonunun doğal (0.0543 ± 0.01 ng / ml) ve senkronize (0.0428 ± 0.01 ng / ml) östrus döngüleri arasında farklılık göstermediği ($p>0.10$), doğal ve senkronize östrus arasındaki AMH konsantrasyonlarının pozitif korelasyon gösterdiği ($r=0.67$; $p <0.001$) ifade edilmiştir (Pfeiffer ve ark. 2014).

Sunulan çalışmada AMH1 ile AMH2 düzeyleri arasındaki istatistikî verilerin yukarıdaki çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü. AMH1-AMH2 değişim yüzdesi gruplara göre (grup 1, 2, 3) sırasıyla; ortalama %91.05, %97.22 ve %50.15 olarak bulundu. Gruplardan bağımsız ($n=30$) AMH1 ile AMH2 arasında ki toplam konsantrasyon artışı %79.48 oldu ve aralarında yüksek düzeyde anlamlı ilişki bulundu ($p<0.01$). Gruplara baktığımızda daha önce yapılan çalışmalarda ifade edilenlere benzer şekilde (Rico ve ark. 2009, 2011; Sakaguchi ve ark. 2019) süperstimülasyon sonrası AMH konsantrasyonlarındaki artışın yüksek AMH'lı olan gruplarda düşük olan gruptan yüksek olduğu görülmektedir. İnek ve keçilerde

süperovulasyon ve embriyo üretimi için ekzojen FSH uygulandıktan sonra plazma AMH konsantrasyonlarında geçici değişiklikler gözlenmiştir. Hayvanlara süperovülatör bir tedavi uygulandığında bir sonraki kızgınlıkta plazma AMH konsantrasyonlarının açıkça artmış olduğu ve bu artışında ultrasonografi ile tespit edilmeyen küçük foliküllerin gelişmiş büyümesini yansıtabileceği ayrıca gonadotropinler ile süperovülatör tedavinin granüloza hücreleri yoluyla AMH sekresyonunu arttırmış olabileceği ifade edilmektedir (Rico ve ark. 2009-2011; Center ve ark. 2018). Östrüstan sonra dolaşımdaki AMH konsantrasyonunda meydana gelen azalmanın sebebi de ovulasyondan önce meydana gelen preovülatör FSH salınımının granüloza hücreleri tarafından AMH üretiminin engellenmesinden kaynaklandığı ve azalmış folikül popülasyonu ile ilişkili olmadığı varsayılmıştır (Rico ve ark. 2011). Düşük AFS'ye (antral folikül sayısı) sahip olanlarda yüksek olanlara kıyasla dolaşımdaki FSH oranının %15-50 daha fazla olduğu bildirilmektedir (Ireland ve ark. 2007; Mossa ve ark. 2010). Sunulan çalışmada AMH1 için kanlar, endojen FSH ile kısmen AMH sentezinin engellenmesi sonrası alındı. AMH2 için kan alımları ise muhtemel östrüsta, ovaryumlar üzerinde çok sayıda bulunan dominant foliküller tarafından salınan östradiol-17 β ve inhibin konsantrasyonunun en yüksek olduğu ve bunların endojen FSH salınımını baskıladığı bir dönemde alındı. Sunulan çalışmada serum AMH1 ile AMH2 konsantrasyonu arasında ortaya çıkan bu anlamlı farkın nedeni; Rico ve ark. (2009-2011) belirttiği gibi östrüsta AMH konsantrasyonlarının arttığı, östrüstan sonra ani bir düşüş meydana geldiği ayrıca gonadotropinler ile süperovülatör tedavinin granüloza hücreleri yoluyla AMH sekresyonunu arttırmış olabileceği ifadeleriyle açıklanabilir. Sonuç olarak, Holştayn ineklerde AMH konsantrasyonu süperstimülasyon uygulamaları sonrası yüksek düzeyde artmıştır ($p < 0.01$). Sığırların aksine, kadınlarda yapılan çalışmalar da: Kontrollü ovaryum hiperstimülasyonu (COH) nedeniyle serum AMH seviyelerinin çoklu foliküler olgunlaşma sırasında kademeli olarak düştüğünü, bu durumun küçük antral folikül sayısındaki çarpıcı azalmayı ve daha büyük foliküllerdeki AMH ekspresyonunun azlığı bilgisini doğruladığını ifade etmişlerdir (Fanchin ve ark. 2003; Lee ve ark. 2010).

6. SONUÇ

Sunulan çalışmada, aynı modifiye süperovulasyon protokolü üzerinde iki farklı foliküler dalga senkronizasyon yöntemi (GnRH enjeksiyonu ve folikül aspirasyonu) kullanılmasının, elde edilen embriyo sayı ve kalitesi üzerine etkisini karşılaştırmak, ayrıca süperovulasyon protokollerinin iki farklı noktası arasında, dolaşımdaki AMH düzeyinde meydana gelen değişimin tespitiyle süperstimülasyon uygulamasının antimüllerian hormon (AMH) seviyesine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Folikül aspirasyon grubunda (grup 2) UFO, anovule folikül ve 4. kalite embriyo sayıları (dejenere embriyo + UFO) ile 4. kalite embriyo (%) ve UFO (%) değerleri GnRH ile foliküler dalga senkronizasyon gruplarından (grup 1 ve 3) yüksek bulundu. Grup 1 ve 3'te transfer edilebilir embriyo (%) ve fertilize oosit (%) oranları folikül aspirasyon grubundan yüksek bulundu. Folikül aspirasyon grubundaki bu durum, süperstimülasyon enjeksiyonlarına başlamadan önce aspire edilen foliküllerin bazılarının yeniden folikül sıvısı ile dolmasından (rezidüel folikül oluşumu) kaynaklanmış olabileceği değerlendirildi. GnRH ile yapılan foliküler dalga senkronizasyon grupları (grup 1 ve 3) ve folikül aspirasyon gruplarından elde edilen transfer edilebilir ve dondurulabilir embriyo sayıları arasında istatistiksel fark olmaması nedeniyle her iki foliküler dalga senkronizasyon yönteminin de modifiye süperovulasyon protokolleri ile güvenli bir şekilde kullanılabileceği ortaya konuldu.

Fakat transvaginal folikül aspirasyon yönteminin, iş gücü ve zaman kaybı yaşatmasına ilaveten ultrason ekipmanı ve deneyimli personel gerektirmesi nedeniyle sayısal olarak daha fazla transfer edilebilir embriyoların elde edildiği modifiye GnRH ile foliküler dalga senkronizasyon yönteminin kullanıldığı protokolün tercih edilmesinin daha uygun olacağı kanaatine varıldı. Süperovulasyon protokolü olarak orijinal protokolün kullanılması durumunda, flushing sonrası daha ileri gelişimsel aşamada embriyo kazanımı için uterus yıkama işleminin 12 saat kadar ertelenmesi tavsiye edilebilir.

Sunulan çalışma ile süperovulasyon protokollerinin uygulanması sırasında, dolaşımdaki AMH konsantrasyonlarındaki artışın foliküler dalga senkronizasyonu sonrası ile süperstimülasyon sonrası (muhtemel östrus) dönem arasında önemli düzeyde olduğu ortaya konuldu.

Sonuç olarak, GnRH ile foliküler dalga senkronizasyon yönteminin kullanım kolaylığı, fertilize ve transfer edilebilir embriyo (%) oranlarının daha yüksek, 4.kalite (dejenere embriyo + UFO) embriyo sayısı ve (%) oranlarının daha düşük olmasından dolayı folikül aspirasyon yönteminden daha iyi olduğu tespit edildi. Süperstimülasyon sonrası llen AMH değerlerinin de güvenilir bir indikatör olamayabileceği anlaşıldı.



7. KAYNAKLAR

1. **Abdel Aziz RL, Khalil AAY, Abdel-Wahab A, Hassan NY, Abdel-Hamied E ve ark.** Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology*, **2017**, 100, 72-79.
2. **Adamiak S J, Mackie K, Watt RG, Webb R, Sinclair KD.** Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol. Reprod.* **2005**, 73, 918–926.
3. **Adams G, Kot K, Smith C, Ginther O.** Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Can J Anim Sci*, **1993**, 73: 267–275.
4. **Adams G, Kot K, Smith C, Ginther O.** Selection of a dominant follicle and suppression of follicular-growth in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, **1993**, 30: 259–271.
5. **Adams G, Matteri R, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther O.** Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **1992**, 94: 177–188.
6. **Adams G.** Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **1999**, 54: 17–32.
7. **Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ.** Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **1992**, 94, 177–188.
8. **Adams GP, Nasser LF, Bo GA, Garcia A, Del Campo MR ve ark.** Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology*, **1994**, 42(7), 1103-1113.
9. **Adams GP, Singh J.** Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. *Bovine reproduction*, **2021**, 292-323.
10. **Aerts JM, Bols PEJ.** Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in domestic animals*, **2010**, 45(1), 171-179.
11. **Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB.** Apoptosis in the germ line. *Reproduction*, **2011**, 141:139–150.
12. **Akther R.** *Comparison of commercial semen performance following artificial insemination in cows.* Doctoral dissertation, Chittagong Veterinary and Animal Sciences University, Chittagong, 4225, Bangladesh, **2023**.
13. **Alkemade S, Murphy B, Mapletoft R.** Superovulation in the cow: effects of biological activity of gonadotropins. In: Proceedings of the 12th Annual Meeting of the American Embryo Transfer Association. Portland, Maine, **1993**, pp. 1–19.
14. **Alward KJ, Graves WM, Palomares RA, Ely LO, Bohlen JF.** Characterizing Anti-Müllerian Hormone (AMH) concentration and change over time in Holstein dairy cattle. *Theriogenology*, **2021**, 168, 83-89.
15. **Anckaert E, Denk B, He Y, Torrance HL, Broekmans F ve ark.** Evaluation of the Elecsys® anti-Müllerian hormone assay for the prediction of hyper-response to controlled ovarian stimulation with a gonadotrophin-releasing hormone antagonist protocol. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **2019**, 236, 133–138.
16. **Armstrong D.** Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, **1993**, 39: 7–24
17. **Arouche N, Picard JY, Monniaux D, Jamin SP, Vigier B ve ark.** The BOC ELISA, a ruminant-specific AMH immunoassay, improves the determination of plasma AMH concentration and its correlation with embryo production in cattle. *Theriogenology*, **2015**, 84(8), 1397-1404.
18. **Arruda RPD, Celeghini ECC, Alons, MA, Carvalh HF, Lemes KM ve ark.** Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen in vivo and in vitro. *Animal Reproduction (AR)*, **2018**, 9(3), 345-353.
19. **Badinga L, Thatcher W, Diaz T, Drost M, Wolfenson D.** Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, **1993**, 39: 797–810.
20. **Baldrighi JM, Sá Filho MFD, Batista EDOS, Lopes RNVR, Visintin JA ve ark.** Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. *Reproduction in domestic animals*, **2014**, 49(6), 1015-1020.

21. **Bao B, Garverick H.** Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci*, **1998**, 76: 1903–1921
22. **Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ.** Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, **2000**, 53(6), 1239-1250.
23. **Barros CM, Barcelos ACZ, Gouvea LM, Meneghel M, Barcelos DS ve ark.** Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reprod Fertil Dev*, **2008**, 20:152.
24. **Baruselli PS, Martins CM, Sales JNS, Ferreira RM.** Recent advances in bovine superovulation. *Acta Sci. Vet*, **2008**, 36, 433–448.
25. **Baruselli PS, Sá Filho M, Matins CM, Naser LF, Nogueira MFG ve ark.** Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, **2006**, 65, 77–88.
26. **Batista EOS, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MDDV, Sá Filho MFD ve ark.** Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, **2014**, 49(3), 448-452.
27. **Bender RW, Hackbart KS, Dresch AR, Carvalho PD, Vieira LM ve ark.** Effects of acute feed restriction combined with targeted use of increasing luteinizing hormone content of follicle-stimulating hormone preparations on ovarian superstimulation, fertilization, and embryo quality in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci*, **2014**, 97, 764–778.
28. **Bergfelt D, Bo G, Mapletoft R, Adams G.** Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Animal Reproduction Science*, **1997**;49:1–12.
29. **Bergfelt D, Kastelic J, Ginther O.** Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. *Anim. Reprod. Sci*, **1991**, 24: 193–204.
30. **Bergfelt DR, Ginther OJ.** Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, **1993**, 39:781–96.
31. **Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP.** Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, **1994**, 42:895–907.
32. **Berry DP, Wall E, Pryce JE.** Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal*, **2014**, 8, 105–121.
33. **Betteridge K.** An historical look at embryo transfer. *Reproduction*, **1981**, 62(1), 1-13.
34. **Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA.** Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **1989**, 87-98.
35. **Betteridge KJ.** A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim Reprod Sci*, **2003**, 79:203-244.
36. **Betteridge KJ.** Techniques and results in cattle: superovulation. Embryo Transfer in Farm Animals. Monograph 16, Canada Department of Agriculture, Ottawa, ON, Canada, **1977**, p. 1–9.
37. **Bezard J, Vigier B, Tran D, Mauleon P, Josso N.** Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *Reproduction*, **1987**, 80(2), 509-516.
38. **Biancucci A, Sbaragli T, Comin A, Sylla L, Monaci M ve ark.** Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenology*, **2016**, 85(5):914-21.
39. **Bisinotto R, Ibiapina B, Pontes E, Bertan C, Satrapa R ve ark.** Luteal function and follicular growth following follicular aspiration during the peri-luteolysis period in *Bos indicus* and Crossbred Cattle. *Reprod Domest Anim*, **2012**, 47:319–27.
40. Bir blastosistin yapısı. http://www.jinekolojivegebelik.com/#google_vignette. **2024**. Erişim tarihi: 16.07.2024.
41. **Bleach E, Glencross R, Feist SA, Groome NP, Knight PG.** Plasma inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol. Reprod*, **2001**, 64: 743–752.
42. **Bó G, Carballo Guerrero D, Tribulo A, Tribulo R ve ark.** New approaches to superovulation in the cow. *Reprod. Fertil. Dev*, **2010**, 22: 106–112.
43. **Bó G, Hockley D, Nasser L, Mapletoft R.** Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Follitropin-V in beef cattle. *Theriogenology*, **1994**, 42: 963–975.
44. **Bo GA, Adams G, Pierson R, Mapletoft R.** Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, **1995**, 43: 31–40.

45. **Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M ve ark.** Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, **1994**, 41:1555e69.
46. **Bó GA, Baruselli PS, Chesta P, Martins CM.** The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, **2006**, 65, 89–101.
47. **Bó GA, Guerrero DC, Adams GP.** Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*, **2008**, 69(1), 81-87.
48. **Bó GA, Guerrero DC, Tribulo A, Tribulo H, Tribulo R ve ark.** New approaches to superovulation in the cow. *Reproduction, Fertility and Development*, **2009**, 22(1), 106-112.
49. **Bó GA, Mapletoft RJ.** Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, **2013**, 10 (3): 344-348.
50. **Bó GA, Mapletoft RJ.** Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, **2014**, 81(1), 38-48.
51. **Bó GA, Mapletoft RJ.** Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, **2020**, 150, 353-359.
52. **Bó GA, Moreno D, Cutaia L, Baruselli PS.** Hormonal manipulation of the estrous cycle in bovine embryo donors and recipients. *Acta Sci Vet*, **2004**, 32: 1-22.
53. **Bo GA, Rogan D, Mapletoft RJ.** Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: what we have learned. *Theriogenology*, **2018**, 112:26e33
54. **Bo´ GA, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM.** The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, **2006**, 65, 89–101.
55. **Boni R, Roelofsen MWM, Pieterse MC, Kogut J, Kruip T.** Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, **1997**, 48(2), 277-289.
56. **Breuel KF, Baker RD, Butcher RL, Townsend EC, Inskeep EK ve ark.** Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*, **1991**, 36, 241–255.
57. **Brogliatti GM, Salamone DF, Adams GP.** Ovarian follicular wave synchronization and superstimulation in prepubertal calves. *Theriogenology*, **1997**, 47, 1253–1264.
58. **Bungartz L, Niemann H.** Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fertil.*, **1994**, 101, 583–591.
59. **Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight PG, Ireland JJ.** Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*, **2005**, 73, 54–62.
60. **Carballo Guerrero D, Tribulo A, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA.** Superovulatory response in beef cattle treated during the first follicular wave following synchronization of ovulation with a progestin device and GnRH. *Reprod. Fertil. Dev.*, **2009**, 21, 242–243.
61. **Carmichael RA.** History of the International Embryo Transfer Society - Part I. *Theriogenology*, **1980**, 13:3-6.
62. **Carvalho PD, Hackbart KS, Bender RW, Baez GM, Dresch AR ve ark.** Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology*, **2014**, 82, 481–489.
63. **Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM ve ark.** Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, **1986**, 45, 685–698.
64. **Center K, Dixon D, Looney C, Rorie R.** Anti-Mullerian hormone and follicle counts as predictors of superovulatory response and embryo production in beef cattle. *Advances in Reproductive Sciences*, **2018**, 6(1), 22-33.
65. **Chacón FN, Palacios FM, Sedano RC, Ahuja-Aguirre C.** Embryo production after superovulation of bovine donors with a reduced number of FSH applications and an increased eCG dose. *Theriogenology*, **2020**, 141, 168-172.
66. **Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E ve ark.** Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, **1996**, 137, 1447–1456.
67. **Chupin D, Combarrous Y, Procureur R.** Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. *Theriogenology*, **1984**, 21, 229.

68. **Cirit Ü, Özmen MF, Küçükaslan İ, Köse M, Kutsal HG ve ark.** Effect of the interval from follicle aspiration to initiation of lengthened FSH treatment on follicular superstimulatory and superovulatory responses and embryo production in lactating Simmental cows. *Theriogenology*, **2019**, *128*, 218-224.
69. **Claes A, Ball BA, Almeida J, Corbin CJ, Conley AJ.** Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: Developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology*, **2013**, *79*, 1229–1235.
70. **Colazo MG, Gordon MB, Rajamahendran R, Mapletoft RJ, Ambrose DJ.** Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with gonadotropin releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology*, **2009**, *72*, 262–270.
71. **Collado-Fernandez E, Picton HM, Dumollard R.** Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol*, **2012**, *56*(10-12), 799-808.
72. **Contreras-Méndez LA, Medrano JF, Thomas MG, Enns RM, Speidel SE ve ark.** The Anti-Müllerian Hormone as Endocrine and Molecular Marker Associated with Reproductive Performance in Holstein Dairy Cows Exposed to Heat Stress. *Animals*, **2024**, *14*(2), 213.
73. **Cox E, Takov V.** Embryology, ovarian follicle development. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island, **2020**.
74. **Çetin H, Beceriklisoy HB, Uçar EH.** Gebe Kısırak Serum Gonadotropini. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics*, **2015**, *1* (2): 48-54.
75. **Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Saacke RG.** The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J. Anim. Sci*, **2000**, *78*, 2081–2085.
76. **Deeks ED.** Elecsys® AMH assay: A review in anti-Müllerian hormone quantification and assessment of ovarian reserve. *Molecular Diagnosis & Therapy*, **2015**, *19*, 245–249.
77. **Deguettes Q, Fattal E, Moreau M, Lego E, Bochot A.** Controlled delivery of follicle-stimulating hormone in cattle. *International Journal of Pharmaceutics*, **2020**, *590*, 119904.
78. **Dell'Eva G, Merlo B, Iacono E, Bolognini D.** Embryo production and quality in dairy cattle is enhanced by manual transrectal ablation of the dominant follicle prior to superovulation. *Large Animal Review*, **2019**, *25*(4), 127-130.
79. **Demetrio D.** AETA 2021 Survey Report. <https://www.aeta.org/docs/2021>. Erişim tarihi: 3.12.2023.
80. **Demoustier MM, Beckers JF, van der Zwalmen P, Closset J, Gillard J ve ark.** Determination of porcine plasma Follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, **1988**, *30*:379e86.
81. **Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N ve ark.** The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum. Reprod. Update* **2014**, *20*, 370–385.
82. **Dias FCF, Khan MIR, Adams GP, Sirard MA, Singh J.** Granulosa cell function and oocyte competence: Super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. *Animal reproduction science*, **2014**, *149*(1-2), 80-89.
83. **Dieleman SJ, Bevers MM, Vos PLAM, De Loos FAM.** PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment? *Theriogenology*, **1993**, *39*(1), 25-41.
84. **Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM.** Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci*, **2003**, *78*, 345–370.
85. **Diskin MG, Morris DG.** Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.*, **2008**, *43*, 260–267.
86. **Domain G, Buczkowska J, Kalak P, Wydooghe E, Banchi P ve ark.** Serum antiMüllerian hormone: A potential semen quality biomarker in stud dogs? *Animals*, **2022**, *12*(3), 323.
87. **Donaldson LE, Ward DN, Glenn SD.** Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology*, **1986**, *25*, 747–757.
88. **Donaldson LE.** The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. *Theriogenology*, **1984b**, *22*, 97–99.
89. **Driancourt MA.** Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, **2001**, *55*, 1211–1239.
90. **Dursun Ş, Kardeşahin T.** Embriyoların sınıflandırılması ve değerlendirilmesi. Erdem H, editör. Hayvanlarda Embriyo Transferi ve Diğer Yardımcı Üreme Teknolojilerinin Kullanımı. 1. Baskı. Ankara: *Türkiye Klinikleri*, **2021**, p.26-9.
91. **Edwards LM, Rahe CH, Griffin JL, Wolfe DF, Marple DN ve ark.** Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology*, **1987**, *28*(3), 291-299.
92. **Elkamash I, Said M, Aboelneen M, Zaabel S.** The Use of Ultrasound for Monitoring the Relationship Between the Diameter of the Dominant Follicle, The Inter-ovulatory Interval, and Follicular Waves in Dairy Cattle. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, **2023**, *78*(1).

93. **El-Keraby F, Shehabeldin A.** Anti-Müllerian Hormone (AMH) as endocrine marker for embryo production in superovulated Friesian cows. *Egyptian Journal of Animal Production*, **2021**, 58(1), 9-19.
94. **El-Sherry T, Matsui M, Kida K, Miyamoto A, Megahed GH ve ark.** No-CL Superstimulatory Protocol: Developing a New Superovulation Treatment Initiated in the Absence of Corpus Luteum (CL) and Compared with DI and Traditional Superovulation in Cattle. *The Open Reproductive Science Journal*, **2012**, 4(1).
95. **El-Sherry TM, Matsui M, Kida K, Miyamoto A, Megahed GA ve ark.** Ovarian stimulation with follicle-stimulating hormone under increasing or minimal concentration of progesterone in dairy cows. *Theriogenology*, **2010**, 73(4), 488-495.
96. **Evans A, Fortune J.** Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*, **1997**, 138: 2963–2971
97. **Evans ACO, Ireland JLH, Winn ME, Lonergan P, Smith GW ve ark.** Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biology of reproduction*, **2004**, 70(5), 1475-1484.
98. **Evans ACO, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F ve ark.** Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reproduction in Domestic Animals*, **2012**, 47, 31-37.
99. **Fair T.** Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, **2003**, 78, 203–216.
100. **Fanchin R, Schönauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R ve ark.** Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Human reproduction*, **2003**, 18(2), 328-332.
101. **Fleming R, Fairbairn C, Blaney C, Lucas D, Gaudoin M.** Stability of AMH measurement in blood and avoidance of proteolytic changes. *Reproductive biomedicine online*, **2013**, 26(2), 130-132.
102. **Freret S, Grimard B, Ponter AA, Joly C, Ponsart C ve ark.** Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. *Reproduction*, **2006**, 131, 783–794.
103. **Fricke P, Wiltbank M.** Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology*, **1999**, 52: 1133–1143.
104. **Garcia A, Salaheddine M.** Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*, **1998**, 50:575–585
105. **Gath V, Lonergan P, Boland MP, O'Callaghan D.** Effects of diet type on establishment of pregnancy and embryo development in beef heifers. *Theriogenology*, **1999**, 51, 224.
106. **Gath VP, Crowe MA, O'Callaghan D, Boland MP, Duffy P ve ark.** Effects of diet type on establishment of pregnancy and embryo development in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci*, **2012**, 133, 139–145.
107. Geleneksel Süperovulasyon Protokolü. Donör Kontrolü. www.hormonuzmani.com. **2024** Erişim; 10.03.2024
108. **Ghetti AM, Siqueira LGB, Arashiro EKN, Palhao MP, Brandao FZ ve ark.** Characterization of blood flow and the effects of exogenous estradiol benzoate on residual follicles formed after ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration in cattle. *Journal of animal science and biotechnology*, **2016**, 7, 1-6.
109. **Gibbons J, Wiltbank M, Ginther O.** Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol. Reprod*, **1997**, 57: 1066–1073.
110. **Ginther O, Beg M, Donadeu F, Bergfelt D.** Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci*, **2003**, 78: 239–257.
111. **Ginther O, Bergfelt D, Beg M, Kot K.** Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. *Biol. Reprod*, **2001**, 65: 345–350.
112. **Ginther O, Bergfelt D, Kulick L, Kot K.** Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol. Reprod*, **2000**, 62: 920–927.
113. **Ginther O, Kastelic J, Knopf L.** Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci*, **1989**, 20: 187–200.
114. **Ginther O.** Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Cattle, WI: *Equiservices Publishing*, **1998**. 304. Cross Plains.
115. **Ginther O. ve Beg M.** Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. *Biol. Reprod*, **2012**, 86: 170.

116. **Ginther OJ, Bashir ST, Rakesh HB, Hoffman MM.** Two-way coupling between FSH and the dominant follicle in heifers. *Theriogenology*, **2013**,80:463–9.
117. **Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K.** Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod*,**2001**,65:638–47.
118. **Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K.** Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction*, **2002**,124:475– 82.
119. **Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K.** Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod*, **2000**, 63, 383–389.
120. **Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K.** Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology*, **1999**,52:1079–93.
121. **Ginther OJ, Bergfelt DR.** Associations between FSH concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. *Theriogenology*, **1992**, 38:807–21.
122. **Ginther OJ, Rakesh HB, Bashir ST, Hoffman MM.** Minor FSH surge, minor follicular wave, and resurgence of preovulatory follicle several days before ovulation in heifers. *Theriogenology*, **2014**, 81(3), 437-445.
123. **Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K.** Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, **1996**, 55:1187–94.
124. **Ginther OJ.** Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci*, **2000**, 60–61:61–79.
125. **Ginther OJ.** The theory of follicle selection in cattle. *Domestic animal endocrinology*, **2016**, 57, 85-99.
126. **Gobikrushanth M, Dutra PA, Bruinje TC, Colazo MG, Butler ST ve ark.** Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology*, **2017**, 92, 90–94.
127. **Gobikrushanth M, Purfield DC, Colazo MG, Butler ST, Wang Z ve ark.** The relationship between serum anti-Müllerian hormone concentrations and fertility, and genome-wide associations for anti-Müllerian hormone in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, **2018**, 101, 7563–7574.
128. **Gong J, Campbell B, Webb R.** Defining the gonadotrophin requirement for the selection of a single dominant follicle in cattle. *Reprod. Fertil. Dev*, **2020**, 32: 322–334.
129. **Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ.** Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *The Canadian Veterinary Journal*, **1994**, 35(3), 158.
130. **Gonzalez SM, Silva CB, Lindquist AG, Bufalo I, Morotti F ve ark.** Regional distribution and integrity of equine ovarian pre-antral follicles. *Reprod Domest Anim*, **2017**, 0:1–6.
131. **Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM, Carrell DT.** Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four energy metabolism in the oocyte and follicle mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod*, **2006**, 3:2.
132. **Guerrero DC, Tribulo A, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA.** Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four days after progesterone and estradiol administration. *Reproduction, Fertility and Development*, **2009**, 22(1), 358-358.
133. **Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Adams GP, Singh J ve ark.** Lengthened superstimulatory treatment in cattle: Evidence for rescue of follicles within a wave rather than continuous recruitment of new follicles. *Theriogenology*, **2015**, 84(3):467-76.
134. **Guerra AG, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft RJ.** Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology*, **2012**, 78(2), 353-360.
135. **Guerreiro BM, Batista EOS, Vieira LM, Sá Filho MFD, Rodrigues CA ve ark.** Plasma anti-müllerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domestic animal endocrinology*, **2014**, 49, 96-104.
136. **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**, 91:81–9.
137. **Hafez ES, Sugie T, Hunt WL.** Superovulation and related phenomena in the beef cow: effect of oestrogen administration on production of ova. *J Reprod Fertil*, **1963**, 5:381–8.
138. **Hafez, ESE, Hafez B.** Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation. *Reproduction in farm animals*, **2000**, 68-81.
139. **Hasler JF, Hockley D.** Efficacy of hyaluronan as a diluent for a two-injection FSH superovulation protocol in *Bos taurus* beef cows. *Reprod. Domest. Anim*, **2012**, 47, 459.

140. **Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH.** Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, **1987**, 27:139-168.
141. **Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote RH.** Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, **1983**, 19, 83–99.
142. **Hasler JF.** Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, **2014**, 81, 152-169.
143. **Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER ve ark.** Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **2006**, 91, 4057–4063.
144. **Hendriksen PJ, Steenweg WN, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM ve ark.** Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* **2004**, 61:909–20.
145. **Herdoğan M, Çay HA, Kahraman D, İnanç ME, Güngör Ş ve ark.** Suni tohumlamamın tarihsel gelişimi ve dönüm noktaları. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **2023**, 94(1), 84-95.
146. **Hinshaw RH, Switzer ML, Mapletoft RJ, Bó GA.** 351 A comparison of 2 approaches for the use of gnrh to synchronize follicle wave emergence for superovulation. *Reproduction, Fertility and Development*, **2015**, 27(1), 263-264.
147. **Hirayama H, Naito A, Fukuda S, Fujii T, Asada M ve ark.** Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. *Journal of Reproduction and Development*, **2017**, 63(1), 95-100.
148. **Helene Quinton**, 39th Annual Meeting A.E.T.E. – Heraklion, Greece, 7th – 8 th September **2023**, <https://www.aete.eu/publications/>, Erişim; 27.09.2023.
149. **Ireland J, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW ve ark.** Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*, **2007**, 22:1687-1695.
150. **Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK ve ark.** Does size matter in females? An overview of the 80 impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev*, **2011**, 23:1-14.
151. **Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F ve ark.** Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction*, **2008**, 79, 1219–1225
152. **Jacobs MH, Reuter LM, Baker VL, Craig LB, Sakkas D ve ark.** A multicentre evaluation of the Elecsys® anti-Müllerian hormone immunoassay for prediction of antral follicle count. *Reproductive biomedicine online*, **2019**, 38(5), 845-852.
153. **Jahnke MM, West JK, Youngs CR.** Evaluation of In Vivo-Derived Bovine Embryos. *Bovine reproduction*, **2014**, 733-748.
154. **Jahnke MM, Youngs CR.** Superovulation in cattle. *Bovine Reproduction*, **2021**, 1032-1040.
155. **Jaiswal R, Singh J, Marshall L, Adams G.** Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*, **2009**, 72: 81–90.
156. **Jazmín GAA, Gustavo MD, Dominguez AS, Alejandro PHR, Cedillo RS ve ark.** Anti-Müllerian Hormone and Its Utility in Cattle Reproduction. *Open Journal of Veterinary Medicine*, **2023**, 13(1), 1-11.
157. **Josso N, Di Clemente N.** Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-β family. *Trends Endocrinol. Metab*. **2003**, 14, 91–97.
158. **Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N.** Manual of Bovine Embryo Transfer. National Livestock Breeding Center MAFF, JICA-Japan. **1995**, 317-352.
159. **Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C ve ark.** Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr*, **2002**, Dev. 42, 587– 599.
160. **Kara U, Say E, Çoban S, Hızlı H, Mutlu H ve ark.** Effect of embryo quality on pregnancy outcome in recipient cows and heifers. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, **2020**, 71(2).
161. **Karavaşin T, Kızıl SH, Satılmış M, Akyol N, Dursun Ş.** Süperovulasyon uygulamasına farklı ırkların verdikleri cevapların araştırılması. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, **2016**, 1: 1-5.
162. **Kastelic J, Bergfel, D, Ginther O.** Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, **1990**, 33: 1269–1278.
163. **Kastelic JP, Knopf L, Ginther OJ.** Effect of day of prostaglandin F2α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Animal Reproduction Science*, **1990**, 23(3), 169-180.

164. **Kawamata M.** Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *J. Vet. Med. Sci*, **1994**, *56*, 965–967.
165. **Kayacik V, Salmanoğlu MR, Polat B, Özlüer A.** Evaluation of the corpus luteum size throughout the cycle by ultrasonography and progesterone assay in cows. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, **2005**, *29*(6), 1311-1316.
166. **Kaymaz M, Köker A.** Çiftlik hayvanlarında doğum ve jinekoloji, 3. Baskı, Medipress, Malatya, **2019**; 539-613.
167. **Kim IH, Son DS, Yeon SH, Choi SH, Park SB ve ark.** Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, **2001**, *55*, 937–945.
168. **Kimura K, Hirako M, Iwata H, Auki M, Kawaguchi M ve ark.** Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology*, **2007**, *68*:633e9
169. **Kinder JE, Kojima FN, Bergfeld EGM, Wehrman ME, Fike KE.** Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *Journal of animal science*, **1996**, *74*(6), 1424-1440.
170. **Ko J, Kastelic J, Del Campo M, Ginther O.** Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil*, **1991**, *91*: 511–519.
171. **Kobayashi S.** Manual for ovum pick-up and in vitro fertilization. *Japan International Cooperation Agency*. 2007.
172. **Koca D, Nak Y, Sendag S, Nak D, Avclar T ve ark.** Evaluation of serum anti-Müllerian hormone concentrations following treatment with vitamin D in Holstein Friesian heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, **2023**, *58*(12), 1695-1701.
173. **Kohram H, Twagiramungu H, Bousquet D, Durocher J, Guilbault LA.** Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. *Theriogenology*, **1998**, *49*, 1175–1186.
174. **Kumar SS.** Period of luteal dominance determines the follicular wave pattern of Oestrous cycle in crossbred cattle. *Haryana Veterinarian*, **2020**, *59*(Special Issue), 102-104.
175. **La Marca A, Stabile G, Artensio AC, Volpe A.** Serum antiMullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum. Reprod*, **2006**, *21*, 3103–3107.
176. **Lee JR, Kim SH, Kim SM, Jee BC, Ku SY ve ark.** Anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation and optimal timing of measurement for outcome prediction. *Human reproduction*, **2010**, *25*(10), 2597-2604.
177. **Leiva T, Cooke RF, Brandao AP, Marques RS, Vasconcelos JLM.** Effects of rumen-protected choline supplementation on metabolic and performance responses of transition dairy cows. *Journal of animal science*, **2015**, *93*(4), 1896-1904.
178. **Lindsell CE, Murphy BD, Mapletoft RJ.** Superovulatory endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, **1986**, *26*, 209–219.
179. **Looney C, Boutle B, Archibald L, Godke R.** Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for superovulation in beef cattle. *Theriogenology*, **1981**, *15*: 13–22
180. **Looney C.** Superovulation in beef females. Proceedings of the 5th Annual Meeting of the American Embryo Transfer Association, Fort Worth, Texas, **1986**, pp. 16–29.
181. **Looney CR, Bondioli KR, Hill KG, Massey JM.** Superovulation of donor cows with bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology*, **1988**, *29*, 271.
182. **Lopez H, Sartori R, Wiltbank M.** Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. *Biol. Reprod*, **2005**, *72*: 788–795.
183. **Lovie M, Garcia A, Hackett A, Mapletoft R.** The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in Holstein cows. *Theriogenology*, **1994**, *41*: 241.
184. **Lu KH, Seidel GE Jr.** Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology*, **2004**, *62*, 819–830.
185. **Macedo GG, Zu'ccari CESN, de Abreu UGP, Negrao JA, da Costa e Silva EV.** Human–animal interaction, stress, and embryo production in *Bos indicus* embryo donors under tropical conditions. *Trop. Anim. Health Prod*, **2011**, *43*, 1175–1182.
186. **Macmillan KL, Thatcher WW.** Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod*, **1991**, *45*, 883–889.
187. **Mahmood K, Tahir M Z, Butt MA, Qureshi SM, Riaz A** GnRH or estradiol benzoate combination with CIDR improves in-vivo embryo production in bovines (*Bos indicus* and *Bos taurus*) under subtropics. *PeerJ*, **2021**, *9*, e12077.

188. Manns J, Hafs H. Controlled breeding in cattle: a review. *Can. J. Anim. Sci.*, **1976**, 56: 121–131.
189. Mapletoft R, Bó G. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev*, **2012**, 24:278–83.
190. Mapletoft R, Bó G. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod. Fertil. Dev*, **2012**, 24: 278–283.
191. Mapletoft RJ, Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*, **2005**, 24:393-403.
192. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, **2002**, 42(6), 601-611.
193. Mapletoft RJ. Bovine embryo transfer. In: Morrow DA (Ed.). *Current Therapy in Theriogenology II*. Philadelphia, PA: WB Saunders. **1986**. pp. 54-63.
194. Mapletoft RJ. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Anim Reprod*, **2013**, 10(3):168-73.
195. Mapletoft RJ. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction (AR)*, **2018**, 10(3), 168-173.
196. Marciel M, Rodriguez M, Gustafsson H. Fine structure of corpora lutea in superovulated heifers. *Zentralbl. Veterinarmed*, **1992**, A 39: 89–97.
197. Marzouk A, Elbaz H, Abdelrazik E, Zaghoul, A, Genedy T. The Response of Donor Holstein Cows to Ovarian Super-Stimulation Using Two Different Protocols GnRH and Estradiol. *Journal of Current Veterinary Research*, **2020**, 2(2), 71-79.
198. McCracken JA. The role of prostaglandins in luteal regression. *Prostaglandins in fertility control*, **1972**, 2, 234-254.
199. Mihm M, Austin EJ. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol*, **2002**, 23, 155– 166.
200. Mihm M, Bleach E. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci*, **2003**, 78: 217–237.
201. Mihm M, Crowe MA, Knight PG, Austin EJ. Follicle wave growth in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, **2002**, 37, 191–200.
202. Mikkola M, Andersson M, Taponen J. Transfer of cattle embryos produced with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality. *Theriogenology*, **2015**, 84, 1118–1122.
203. Mikkola M, Hasler JF, Taponen J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, **2020**, 32(2), 104-124.
204. Mikkola M, Taponen J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Follitropin or Pluset. *Theriogenology*, **2017**, 88, 84-88.
205. Mikkola M, Taponen J. Quality and developmental rate of embryos produced with sex-sorted and conventional semen from superovulated dairy cattle. *Theriogenology*, **2017**, 87, 135-140.
206. Mollo A, Lora M, Faustini M, Romagnoli S, Cairoli F. Some factors affecting embryo transfer success in dairy cows. *J. Anim. Vet. Adv*, **2007**, 6, 496–499.
207. Mollo MR, Monteiro PLJ, Surjus RS, Martins AC, Ramos AF ve ark. Embryo production in heifers with low or high dry matter intake submitted to superovulation. *Theriogenology*, **2017**, 92, 30–35.
208. Momont HW, Seguin BE. Influence of day of estrous cycle on response to PGF2 alpha products: implications for AI programs for dairy cattle. In *10. international congress on animal reproduction and artificial insemination, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois (USA), 10-14 Jun 1984*, 3.
209. Monniaux D, Barbey S, Rico C, Fabre S, Gallard Y ve ark. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reproduction, Fertility and Development*, **2010**, 22(7), 1083-1091.
210. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S ve ark. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biology of Reproduction*, **2014**, 90, 85
211. Monniaux D, Clemente N, Touzé JL, Belville C, Rico C ve ark. Intrafollicular steroids and anti-müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biology of Reproduction*, **2008**, 79, 387–396
212. Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P ve ark. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development*, **2012**, 25(1), 1-16.
213. Morotti F, Santos GMG, Júnior CK, Silva-Santos KC, Roso VM ve ark. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology*, **2017**, 91, 21–26.
214. Morton JM, Tranter WP, Mayer DG, Jonsson NN. Effect of environmental heat on conception rates in lactating dairy cows: Critical periods of exposure. *J. Dairy Sci.* **2007**, 90, 2271–2278.

215. **Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW ve ark.** Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biology of Reproduction*, **2013**, 88, 1–9.
216. **Mossa F, Ireland JJ.** Anti-Müllerian hormone: a biomarker for the ovarian reserve, ovarian function, and fertility in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, **2019**, 97, 1446–1455.
217. **Mossa F, Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Weber-Nielsen M, Evans ACO ve ark.** Anti-Müllerian hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction*, **2017**, 154 R1-R11, 1741- 7899.
218. **Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F ve ark.** Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **2012**, 95, 2355-61.
219. **Murphy B, Mapletoft R, Manns J, Humphrey W.** Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, **1984**, 21: 117–125. 34.
220. **Murphy BD, Martinuk SD.** Equine chorionic gonadotropin. *Endocr. Rev.*, **1991**, 12, 27–44.
221. **Murphy MG, Boland MP, Roche JF.** The effects of dose and duration of administration of pFSH during the first follicular wave on the ovulation rate of beef heifers. *Theriogenology*, **1998**, 49, 557–569.
222. **Murphy MG, Enright WJ, Crowe MA, McConnell K, Spicer LJ ve ark.** Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *Reproduction*, **1991**, 92(2), 333-338.
223. **Murphy, BD.** Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction (AR)*, **2018**, 9(3), 223-230.
224. **N.R.C.** Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th revised ed. National Academic Science, Washington, DC, USA. **2001**.
225. **Nabenishi H, Kitahara G, Takagi S, Yamazaki A, Osawa T.** Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, **2017**, 60, 19–24.
226. **Nasser LF, Adams GP, Bo GA, Mapletoft RJ.** Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, **1993**, 40, 713–724.
227. **Nawaz MY, Jimenez-Krassel F, Steibel JP, Lu Y, Baktula A ve ark.** Genomic heritability and genome-wide association analysis of anti-Müllerian hormone in Holstein dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, **2018**, 101, 8063–8075
228. **Nelson SM.** Biomarkers of ovarian response: current and future applications. *Fertility and sterility*, **2013**, 99(4), 963-969.
229. **Noga N, Looney C.** Embryo Transfer and Embryo Collection. *Bovine Reproduction*, **2021**, 1041-1060.
230. **Oliveira JFC, Neves JP, Moraes JCF, Goncalves PBD, Bahr JM ve ark.** Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. *Animal Reproduction Science*, **2002**, 73(1-2), 1-10.
231. **Peter A, Levine H, Drost M, Bergfeld D.** Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*, **2009**, 71: 1343–1357.
232. **Pfeiffer KE, Jury LJ, Larson JE.** Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, **2014**, 46, 58–64.
233. **Phillippo M, Rowson LEA.** Prostaglandins and superovulation in the bovine. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* **1975**, 15, 233–240.
234. **Picard-Hagen N, Lhermie G, Florentin S, Merle D, Frein P, Gayrard V.** Effect of gonadorelin, leirelin, and busarelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology*, **2015**, 84(2), 177-183.
235. **Pierson R, Ginther O.** Follicular populations during the estrous cycle in heifers I: influence of day. *Anim. Reprod. Sci.*, **1987**, 124: 165–176.
236. **Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S ve ark.** Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, **2009**;71:690-697.
237. **Rao MM, Umamahes Y, Naidu KV, Rao KB, Misra AK.** Ovarian superstimulation after ablation and steroid induced follicular wave synchronization in zebu cattle. *Indian Journal of Animal Sciences*, **2009**, 79(3), 247-250.
238. **Ratchamak R, Ratsiri T, Chumchai R, Boonkum W, Chankitisakul V.** Relationship of the temperature-humidity index (THI) with ovarian responses and embryo production in superovulated Thai-Holstein crossbreds under tropical climate conditions. *Veterinary Sciences*, **2021**, 8(11), 270.
239. **Rhoads ML, Rhoads RP, Gilbert RO, Toole R, Butler WR.** Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, **2006**, 91, 1–10.

240. **Ribeiro ES, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A ve ark.** Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J. Dairy Sci*, **2014**, 97, 6888-900.
241. **Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbies-Tran R, Jarrier P ve ark.** Determination of anti-Mullerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod. Fertil. Dev*, **2012**, 24, 932–944.
242. **Rico C, Fabre S, Medigue C, Clemente Nd, Clement F ve ark.** Anti-Mu"llerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotrophin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod*, **2009**, 80(1), 50–59.
243. **Rico C, Medigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M ve ark.** Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol. Reprod*, **2011**, 84, 560–571.
244. **Sa' Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Nichi M, Fosado M ve ark.** Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology*, **2010**, 74, 1636–1642.
245. **Sa' Filho MF, Nichi M, Soares JG, Vieira LM, Melo LF ve ark.** Sex-sorted sperm for artificial insemination and embryo transfer programs in cattle. *Anim. Reprod*, **2014**, 11, 217–224.
246. **Sabuncu A, Dal GE, Enginler SO, Kocak O, Arici R.** Association of Anti-Müllerian Hormone concentrations between the pregnancy rates and pregnancy continuity of cows in different age groups. *Veterinärni medicina*, **2019**, 64(7), 302-308.
247. **Sağırkaya H.** Dünya ve Türkiye’de embriyo üretimi ve transferinin dünü, bugünü ve geleceği. Erdem H, editör. Hayvanlarda Embriyo Transferi ve Diğer Yardımcı Üreme Teknolojilerinin Kullanımı. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; **2021**. p.1-7.
248. **Sakaguchi K, Yanagawa Y, Yoshioka K, Suda T, Katagiri S ve ark.** Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2019**, 17, 1-13.
249. **Sales JN, Neves KA, Souza AH, Crepaldi GA, Sala RV ve ark.** Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology*, **2011**, 76, 427–435.
250. **Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Soares JG, Giroto RW ve ark.** Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. *Theriogenology*, **2015**, 83(6), 1093-1100.
251. **Sanderson N, Martinez M.** A single administration of a long-acting recombinant ovine FSH (roFSH) for cattle superovulation. *Theriogenology*, **2020**, 154, 66-72.
252. **Santa Cruz R, Cushman RA, Viñoles C.** Antral follicular count is a tool that may allow the selection of more precocious Bradford heifers at weaning. *Theriogenology*, **2018**, 119, 35–42.
253. **Sartori R, Bastos MR, Wiltbank MC.** Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, **2009**, 22(1), 151-158.
254. **Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC.** Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of dairy science*, **2004**, 87(4), 905-920.
255. **Sartori R, Surjus RS, Prata AB, Monteiro PLJ, Mattos MCC ve ark.** In vivo production, quality and pregnancy of bovine embryos from cows with high or low intake of dry matter or energy. *J. Anim. Sci*, **2016**, 94, 527.
256. **Savio J, Keenan L, Boland M, Roche J.** Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil*, **1988**, 83: 663–671.
257. **Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, De La Sota RL, Wolfenson D.** Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *Reproduction*, **1993**, 97(1), 197-203.
258. **Scheetz D, Folger JK, Smith GW, Ireland J.J.** Granulosa cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. *Reprod. Fertil. Dev*, **2012**, 24, 327–336.
259. **Schenk JL, Cran DG, Everett RW, Seidel GE Jr.** Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*, **2009**, 71, 717–728.
260. **Schenk JL, Suh TK, Seidel GE Jr.** Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*, **2006**, 65, 299–307.
261. **Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Khoo CS, Fischer RL** Maternal growth during pregnancy and the competition for nutrients. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1994**, 60, 183–188.

262. Schuller LK, Burfeind O, Heuwieser W. Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology* **2014**, *81*, 1050–1057.
263. Seidel G.E, Seidel SM. *Training manual for embryo transfer in cattle* (Vol. 77). Rome: FAO. **1991**.
264. Seidel GE Jr. Brief introduction to whole genome selection in cattle using single nucleotide polymorphisms. *Reprod Fertil Dev*, **2010**, *22*:138-144.
265. Seidel GE, Elsden RP, Hasler JF.). *Embryo transfer in dairy cattle*. Hoard's Dairyman Books, **2003**, pp.96.
266. Seneda MM, Zangirolamo AF, González SM, Morotti F. Oogenesis and Folliculogenesis. In *Sustainable Agriculture Reviews 59: Animal Biotechnology for Livestock Production 3*, **2023**, 59-88.
267. Senger PL Pathways to Pregnancy and Parturition. Washington State University Research & Technology Park. 2 revised edition. Current Conception Inc., Washington, **2003**, 284-303.
268. Shaw DW, Good TE. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology*, **2000**, *53*, 1521–1528.
269. Shehabeldin A, El-Keraby F. Anti-Müllerian Hormone (AMH) as endocrine marker for embryo production in superovulated Friesian cows. *Egyptian journal of animal production*, **2021**, *58*(1), 9-19.
270. Silva LO, Valenza A, Alves RLOR, da Silva MA, da Silva TJB ve ark. Progesterone release profile and follicular development in Holstein cows receiving intravaginal progesterone devices. *Theriogenology*, **2021**, *172*, 207-215.
271. Singh J, Adams GP, Pierson RA. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, **2003**, *78*(3-4), 371-399.
272. Singh J, Domínguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, **2004**, *62*:227-243.
273. Singh J, Pierson R, Adams G. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *J. Reprod. Fertil*, **1997**, *109*: 35–44.
274. Small J, Colazo M, Kastelic J, Mapletoft R. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology*, **2009**, *71*: 698–706.
275. Soares JG, Martins CM, Carvalho NA, Nicacio AC, Abreu-Silva AL ve ark. Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donors. *Anim. Reprod. Sci*, **2011**, *127*, 148–153.
276. Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS ve ark. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of dairy science*, **2015**, *98*(1), 169-178.
277. Sowers M, McConnell D, Gast K, Zheng H, Nan B ve ark. Anti-Müllerian hormone and inhibin B variability during normal menstrual cycles. *Fertil. Steril*, **2010**, *94*, 1482–1486.
278. Sönmez M. Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. Fırat Üniversitesi Yayını, Elazığ, **2016**, s. 76-143.
279. Steel RG, Hasler JF. 298 Comparison of three different protocols for superstimulation of dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, **2008**, *21*(1), 246-246.
280. Steinhäuser CB, Looney CR, Hasler JF, Renaud P. Retrospective analysis of superstimulation with Folltropin®-V in Wagyu versus other beef breeds. *Anim. Reprod*, **2018**, *15*(3), 553.
281. Stock AE, Ellington JE, Fortune JE. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology*, **1996**, *45*:1091–102.
282. Stojšin-Carter A, Mahboubi K, Costa NN, Gillis DJ, Carter TF ve ark. Systemic and local anti-Müllerian hormone reflects differences in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. *Animal reproduction science*, **2016**, *167*, 51-58.
283. Streuli I, Fraise T, Pillet C, Ibecheole V, Bischof P, de Ziegler D. Serum antimüllerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertility and sterility*, **2008**, *90*(2), 395-400.
284. Stringfellow D, Seidel S. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3rd edn. Champaign, IL: International Embryo Transfer Society, **1998**.
285. Stringfellow DA, Givens MD. *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)*. 4th ed. Champaign, **2010**, IL: IETS.
286. Stringfellow D. Recommendations for the sanitary handling of in vivo derived embryos. In: Stringfellow DA, Givens MD (eds) *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 4th edn. Champaign, IL: International Embryo Transfer Society, **2010**, pp. 65–68.
287. Stringfellow DA, Givens MD. Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. *Anim Reprod Sci*, **2000**, *60/61*:629-642.

288. **Structure of embryo in the blastocyst stage,** <https://babygest.com/en/wp-content/uploads/2019/09/blastocyst-description.png>, erişim; 1.11.2023
289. **Succu S, Sale S, Ghirello G, Ireland JJ, Evans ACO ve ark.** Exposure of dairy cows to high environmental temperatures and their lactation status impairs establishment of the ovarian reserve in their offspring. *Journal of dairy science*, **2020**, *103*(12), 11957-11969.
290. **Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ.** Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Reproduction*, **1994**, *101*(3), 547-555.
291. **Surjus RS, Prata AB, Borsato M, Mattos FC, da Silveira MCM ve ark.** In vivo embryo production in cows superovulated 1 or 2 days after ovum pick-up. *Reproduction, Fertility and Development*, **2014**, *26*(4), 527-532.
292. **Sutherland W.** Alginate. In: *Biomaterials: Novel Material from Biological Sources* (ed. D. Byrom), Stockton Press, New York, **1991**, 307-333.
293. **Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB ve ark.** Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*, **2003**, 126:27-34.
294. **Taft R, Ahma, N, Inskip EK.** Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *Journal of animal science*, **1996**, *74*(12), 2985-2991.
295. **Taneja M, Bols PEJ, de Velde AV, Ju J-C, Schreiber D, Tripp MW ve ark.** Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod*, **2000**, *62*:206-213.
296. **Teepker G, Keller DS.** Selection of sires originating from a nucleus breeding unit for use in a commercial dairy population. *Can J Anim Sci*, **1989**, *69*:595- 604.
297. **Tekeli T, Alaçam E.** Evcil Hayvanlarda Reprodüsiyon, Sun'ı Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Embriyo nakli. 1. Baskı. Konya, Dizgi Yayınevi, **1994**. p.103-4.
298. **Thomas JM, Locke JWC, Vishwanath R, Hall JB, Ellersieck MR ve ark.** Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology*, **2017**, *98*, 88-93.
299. **Townson DH, Tsang PC, Butler WR, Frajblat M, Griel Jr LC ve ark.** Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *Journal of animal science*, **2002**, *80*(4), 1053-1058.
300. **Tribulo H, Bo GA, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Mapletoft RJ.** The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of Bos indicus heifers. *Theriogenology*, **1991**, *35*, 286.
301. **Tribulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV ve ark.** Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim. Reprod. Sci*, **2011**, *129*(1-2):7-13.
302. **Tribulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Mapletoft RJ ve ark.** Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, **2012**, *77*(8), 1679-1685.
303. **Turzillo AM, Fortune JE.** Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. *J Reprod Fertil*, **1993**, *98*, 113-119.
304. **Quinton H.** Avrupa 2022 Yılı Embriyo Üretim Verileri. <https://www.aete.eu/publications/statistics/Erişim> Tarihi; 15.05.2024
305. **Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ, Padmanabhan V.** Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr. Rev*, **1995**, *16*, 765-787.
306. **Umer S, Zhao SJ, Sammad A, Weldegebrail Sahlu B, Pang Y ve ark.** AMH: could it be used as a biomarker for fertility and superovulation in domestic animals?. *Genes*, **2019**, *10*(12), 1009.
307. **Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC.** Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, **2001**, *56*(2), 307-314.
308. **Veiga-Lopez A, Gonzalez-Bulnes A, Tresguerres JAF, Dominguez V, Ariznavarreta C ve ark.** Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Domestic animal endocrinology*, **2006**, *30*(2), 76-87.
309. **Veiga-Lopez A, Ye W, Padmanabhan V.** Developmental programming: prenatal testosterone excess disrupts anti-Müllerian hormone expression in preantral and antral follicles. *Fertility and Sterility*, **2012**, *97*, 748-756.

310. Verici ineklerde prostoglandin ve FSH kullanılarak östrus senkronizasyonu, <https://www.hormonuzmani.com/reproduction-cattle/oestrus-management/et-intro/et-donor-management/erişim>; 24.10.2023.
311. Viana J. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, **2022**, 40(4), 17.
312. Viana J. 2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, **2023**, 41, 4.
313. Viana JHM, Dorea MD, Siqueira LGB, Arashiro EKN, Camargo LSA ve ark. Occurrence and characteristics of residual follicles formed after transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in cattle. *Theriogenology*, **2013**, 79(2), 267-273.
314. Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA ve ark. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology*, **2015**, 84.
315. Vieira LM, Rodrigues CA, Mendanha MF, Sa' Filho MF, Sales JNS ve ark. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology*, **2014**, 82, 204–212.
316. Vishwanath R, Moreno JF. Semen sexing—current state of the art with emphasis on bovine species. *Animal*, **2018**, 12(s1), s85-s96.
317. Walker BN, Biase FH. The blueprint of RNA storages relative to oocyte developmental competence in cattle (*Bos taurus*). *Biol Reprod*, **2020**, 102:784–794.
318. Wals SW, Mossa F, Butler ST, Berry DP, Scheetz D ve ark. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. *Journal of Dairy Science*, **2014**, 97(7), 4503-4511.
319. Weenen C, Laven JSE, vonBergh ARM, Cranfield M, Groome NP ve ark. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*, **2004**, 10:77–83.
320. Wehrman ME, Fike KE, Kojima FN, Bergfeld EG, Cupp AS ve ark. Development of persistent ovarian follicles during synchronization of estrus influences the superovulatory response to FSH treatment in cattle. *Theriogenology*, **1996**, 45, 593–610.
321. Wiley C, Jahnke M, Redifer C, Gunn PJ, Dohlman T. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. *Theriogenology*, **2019**, 129, 54-60.
322. Wilson JM, Moore K, Jones AL, Looney CR. Recombinant bovine follicle-stimulating hormone: dose and duration regimens for superovulation of embryo donors. *Theriogenology*, **1989**, 31, 273.
323. Wilson JM. Superovulation: FSH update. In 'Proceedings of the Annual Conference of American Embryo Transfer Association', 27–29 October **1988**, Reno, NV, USA. pp. 31–43.
324. Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gümen A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, **2006**, 65(1), 17-29.
325. Wiltbank M, Shiao T, Bergfeld D, Ginther O. Prostaglandin F2 alpha receptors in the early bovine corpus luteum. *Biol. Reprod*, **1995**, 52: 74–78.
326. Wock JM, Lyle LM, Hockett ME. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17 β at the beginning of a superovulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reprod. Fertil. Dev*, **2008**, 20, 228.
327. Wolfsdorf KE, Diaz T, Schmitt EJ, Thatcher MJ, Drost M ve ark. The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development. *Theriogenology*, **1997**, 48:435–47.
328. Wrathall AE, Simmons HA, Bowles DJ, Jones S. Biosecurity strategies for conserving valuable livestock genetic resources. *Reprod Fertil Dev*, **2004**, 16:103-112.
329. Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhauser MH. Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil. Steril*, **2008**, 89, 927–933.
330. Yamamoto M, Ooe M, Fujii C, Suzuki T. Superovulation of Japanese black heifers treated with FSH-P and FSH-R. *J. Vet. Med. Sci*, **1993**, 55, 133–134.
331. Yilma T. Assisted Reproductive Technologies and Recent Developments in In vitro Embryo Production Technology in Dairy Cattle. *Asian Journal of Research in Animal and Veterinary Sciences*, **2022**, 10(3), 23-39.

ÖZGEÇMİŞ

İlkokulu Kozan Cumhuriyet ilköğretim Okulunda, ortaöğrenimini Kozan 50. Yıl Ortaokulunda, lise öğrenimini de İzmir Yenişehir Sağlık Meslek Lisesinde yatılı olarak tamamladı. 1994 yılında Konya Devlet Hastanesinde laboratuvar teknisyeni olarak göreve başladı. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde lisans eğitime başladı ve 1999 yılında mezun oldu. 2002 yılında veteriner hekim olarak Konya-Yunak İlçe Tarım Müdürlüğüne atandı. Daha sonra 2003-2007 yılları arasında, Konya Bahri Dağdaş Tarımsal Araştırma Enstitüsünde, 2007-2009 yılları arasında da Kayseri-Yahyalı İlçe Tarım Müdürlüğü'nün de veteriner hekim olarak görev yaptı. 2009 yılında Adana Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne veteriner hekim olarak atandı ve halen bu görevini sürdürmektedir. 2020 yılında başladığı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum Jinekoloji ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'ndaki doktora öğrenimine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.