

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNEKLERDE NATİF VE DONDURULMUŞ EMBRİYO NAKLİ
ÜZERİNE SAHA ÇALIŞMASI**

Veteriner Hekim Seyrani MERSİN
DÖLERME VE SUN'I TOHUMLAMA
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Mustafa KAYA

VAN-2009

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başlamamda ve tez çalışmamın gerçekleşmesinde, engin bilgi ve desteklerini esirgemeyen, her zaman bilimsel fikirleriyle çalışmalarına ve geleceğime ışık tutan Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, öğretim üyelerinden Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ'e,

Çalışmada konunun seçiminden, gerçekleştirilmesine kadar tezin her aşamasında desteklerini esirgemeyen, danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mustafa KAYA'ya,

Doktora programı boyunca yardım eden ve tez çalışmama da katkıları olan Arş. Gör. Dr. B.Atalay USLU'ya,

Laboratuar pratiklerini kazanmama katkıları olan, LHMAE, Embriyo Transfer Laboratuvarı çalışanlarından, Dr. Numan AKYOL'a,

Tez çalışmada kullanılan ultrason, kimi sarf maddeleri, yardımcı iş gücü, ulaşım ve barınma olanakları sağlayan burada tek tek sayamadığım çiftlik yöneticileri, ve ağır çalışma koşullarına rağmen, hayvanların seçilmesinden, tutulmasına kadar her alanda destek olan işletme veteriner hekimi, Adem KAŞ'a,

Hayatım boyunca ve bu tez çalışması sırasında maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen eşim ve aileme, teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Teşekkür	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller.....	VII
Tablolar.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Embriyo Transfer Tarihçesi.....	3
2.2. Türkiye’de Embriyo Transfer Çalışmaları.....	5
2.3. İneklerde Ovaryum, Oosit ve Ovidukt Fizyo-patolojisi.....	6
2.4. Embriyo Transferinin Temel Aşamaları.....	11
2.4.1. Verici, taşıyıcı ve erkek gen kaynağının seçimi.....	11
2.4.2. Verici ve taşıyıcıların seksüel senkronizasyonu	16
2.4.3. Vericilerde süperovulasyon ve ovulasyonun uyarılması.....	18
2.4.4. Embriyonun eldesi ve değerlendirilmesi.....	26
2.4.5. Embriyonun nakli.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Gereçler.....	35
3.1.1. Canlı gereçler.....	35
3.1.2. Alet ve malzeme temini.....	36
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Verici-taşıyıcı senkronizasyonu, kızgınlık gözlemi ve vericilerde tohumlama.....	39
3.2.2. Vericilerde süperovulasyon ve ovaryum cevaplarının belirlenmesi..	41
3.2.3. Uterus yıkaması ve embriyo eldesi.....	43
3.2.4. Embriyo değerlendirilmesi.....	45
3.2.5. Embriyonun transservikal yöntemle nakli.....	47
3.2.6. Gebelik sonuçlarının değerlendirilmesi.....	50
3.2.7. İstatiksel değerlendirmeler.....	50

4. BULGULAR.....	51
4.1. Vericilerde ve Taşıyıcılarda Östrüs Başlama Zamanı.....	51
4.2. Ultrason Muayenesine Göre Süperfolikülasyon Bulguları.....	51
4.3. Ultrason Muayenesine Göre Çoklu Korpus Luteum Bulguları.....	51
4.4. Uterus Yıkaması Bulguları.....	52
4.5. Embriyoların Değerlendirilmesine Ait Bulgular.....	54
4.6. Embriyo Naklinin Gebelik Sonuçları.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
ÖZET.....	76
SUMMARY.....	77
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFP	: Antifriz protein
BSA	: Bovine serum albumin
ECG	: Equine chorionic gonadotrophin = PMSG
ET	: Embriyo transfer
FSH	: Folikül stimulan hormon
GnRH	: Gonadotropin releasing (salınım) hormonu
hCG	: Human chorionic gonadotropini
HMG	: İnsan menoposal gonadotropini
İE	: International equivalent
IETS	: Uluslar arası embriyo transfer topluluğu
IU	: International unit
IVF	: In vitro fertilizasyon
LH	: Luteinizing hormon
mg	: Milligram
ml	: Millilitre
mm	: Milimetre
MOET	: Çoklu ovulasyon ile embriyo transferi
NIADDK	: National Institute of Arthritis, Diabetes, and Digestive and Kidney Diseases
PBS	: Phosphate-buffered saline
PMSG	: Gebe kısırak serum gonadotropini = eCG
PVP	: Polivinil Pirrolidon
OPU	: Oosit pick up
ST	: Sun'i tohumlama

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Süperovulasyon amacıyla kullanılan FSH hormonu ve sulandırıcısı.....	36
Şekil 2.	Uterus yıkama medyumunu (a), embriyo yıkama ve değerlendirme medyumunu (b).....	37
Şekil 3.	Embriyo naklinde temel aşamalar.	39
Şekil 4.	Verici ve alıcılarda erkeği kabul refleksine göre östrüs tespiti	40
Şekil 5.	Çalışma planı	42
Şekil 6.	Ultrason yardımıyla vericide süperovulasyon cevaplarının belirlenmesi.....	43
Şekil 7.	Nakledilebilir ve nakledilemez embriyo örnekleri	45
Şekil 8.	Payet içinde embriyonun konumlandırılması	46
Şekil 9.	Payet içinde görüntülenmiş embriyo örnekleri	47
Şekil 10.	Embriyo değerlendirilmesinde kullanılan rehber embriyo gelişim aşamaları	48
Şekil 11.	Embriyonun transservikal yöntemle nakli.....	49
Şekil 12.	Holstein düvede ovule olmayan foliküllerin ultrason yansıısı	52
Şekil 13 .	Süperovulasyon sonrası folikül ve korpus luteum yansıısı (Holstein inekte).....	53
Şekil 14 .	Süperovulasyon sonrası folikül ve korpus luteum yansıısı (Simental düvede).....	54
Şekil 15.	Uterus yıkama işlemi	55
Şekil 16.	Dondurulmuş embriyo naklinden elde edilen buzağı örnekleri.....	56

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Farklı hayvan türlerinde ilk embriyo nakil araştırmaları	4
Tablo 2. FSH dozu ile elde edilen ovaryum yanıtları	21
Tablo 3. Verici-alıcı senkronizasyonu ve süperovulasyon uygulamaları	22
Tablo 4. Verilerde ve alıcılarda FSH ve PgF2 α göre östrus zamanı.....	51
Tablo 5. Süperovulasyon sonrasında belirlenen folikül, korpus luteum ve embriyo sonuçları.....	53
Tablo 6. Uterus yıkamasında yıkama medyumunun geri alınmasına ait bulgular...	54
Tablo 7. Vericilerden (n=4) elde edilen embriyoların değerlendirilmesine ait bulgular.....	55
Tablo 8. Embriyo naklinden elde edilen gebelik sonuçları	56

1. GİRİŞ

Çoğunlukla hayvanlarda üstün dişi kalıtsal yapısının yaygınlaştırılması amacıyla başvurulmuş embriyo transfer yöntemi, Dünya’da yaklaşık elli yıldır yaygın bir şekilde bilimsel araştırmalara ve özellikle süt ineklerinde saha uygulamalarına konu olmaktadır. Bu teknikte, ineklere hormon verilerek çok sayıda ovum oluşturmaları (Süperovulation) sağlanmakta, tohumlamadan sonra verici inekte oluşan embriyolar uygun tekniklerle alınarak ya natif olarak ya da dondurma ve saklama işleminden sonra alıcı ineklere yine uygun tekniklerle nakledilmektedir (Hafez, 1987c; Gökçen, 2007).

Embriyo transferi üstün genetik yapılı dişilerden daha fazla yararlanmak için başvurulmuş etkin bir yöntemdir. Döl testi (Progeny testing), sperma işleme ve dondurma teknikleri sayesinde damızlık değeri yüksek olan erkeklerden sınırsız denebilecek ölçüde yararlanılabilmektedir. Rusya öncülüğünde, 1912 yılında başlayan sahada sun’i tohumlama yöntemiyle, üstün genetik yapılı boğalardan sperma alınması, sulandırılması ve sıvı azotta (-196 °C) dondurulmasıyla bir boğadan on binlerce yavru alınabilmektedir. Buna karşın, ıslah projeleri ile belirlenen üstün genetik yapılı dişilerden yaygın bir şekilde yararlanmak, embriyo ve embriyo transfer teknikleri dışında oldukça sınırlı kalmıştır. Bir dişinin ovaryumlarında on binlerce yavru üretilecek sayıda primordial folikül kapasitesi olmasına rağmen, doğal üreme koşullarında dişilerden optimal şartlarda alınan yavru sayısı 7-8 adet gibi oldukça sınırlı kalmaktadır (Hafez, 1987c; Kanagawa et al., 1995).

Erken gelişme aşamasındaki embriyonun vericiden alınması ve daha sonraki gelişmelerini tamamlamak üzere taşıyıcı annenin uterusuna nakli olarak tanımlanan embriyo transferi, genetik ilerlemede etkin olarak kullanılabilecek bir biyoteknoloji zinciridir (Hafez, 1987c). Embriyo transferi sayesinde üstün yapılı gen kaynakları ülke içinde ve ülkeler arasında kullanılabilir.

Son yıllarda gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gerek devlet eliyle ve gerekse özel hayvancılık işletmelerinde damızlık niteliği olan dişileri yaygınlaştırmak için bir taraftan damızlık birlikleri ve sadece damızlık düve yetiştiren işletmeler kurulurken, diğer taraftanda embriyo üzerine geliştirilen teknikler ile laboratuvar hayvancılığı olarak

nitelendirilen bir yetiştirme yöntemi doğmuştur. Bu sektörde, gerek damızlık nitelikli ineklerde süperovulasyonla birleştirilen oosit pick up (OPU) teknikleri (Petyim, 2002), ve gerekse kesime sevk edilen damızlık nitelikli ineklerin ovaryumlardan elde edilen oositlerin in vitro ortamda olgunlaştırılması (IVM) ve in vitro fertilizasyonu (IVF) embriyo üretimi gerçekleştirilmektedir. Elde edilen embriyolar kalite değerlendirilmesine tabi tutularak sahada kullanılmak üzere dondurulmaktadır. Bu alanda Amerika, Fransa, Almanya gibi ülkeler oldukça önemli bir bilgi birikimi elde etmiştir.

Sunulan çalışmada, hayvansal üretim amacıyla embriyo transfer yönteminin saha şartlarında uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırma, sütçü ineklerde natif ve dondurulmuş embriyo nakli olmak üzere iki temel bölümde kurgulanmıştır. Çalışmanın birinci kısmında, alıcı verici senkronizasyonu, süperovulasyonla çoklu embriyo oluşturulması, uterus yıkaması, yıkantıda embriyoların aranması, embriyo kalitesinin değerlendirilmesi ve nakliyle, ikinci kısmında ise direkt transfer metoduna göre dondurulan ithal embriyoların çözümü ve naklinin saha şartlarında uygulanması ve sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Embriyo Transfer Tarihçesi

İlk kez Heape, 1890 yılında gerçekleştirdiği embriyo transferi ile tavşanlardan dört yavru almayı başardı (Hafez, 1987c; Biggers, 1991; Betteridge, 2003). Daha sonra 1920'lere kadar başarılı olunduğuna dair bir makaleye rastlanmamaktadır (Betteridge, 1981). Sonraki yıllarda, Biedl ve ark. (1922), Nicholas (1933), ve Chang (1947) yine tavşanlarda yapmış oldukları embriyo nakillerinden başarılı sonuçlar aldıklarını bildirdi (Hafez, 1987c).

Embriyo transferi alanında, önemli gelişmelerden birisi de, erken embriyonik gelişmelerin tavşanlarda verici alıcı arasında senkronizasyon olmaksızın da devam ettirilebileceğinin ortaya konması oldu. Bu gelişmeden sonra, tavşan oviduktunun, erken embriyonik gelişmeler için kültür ortamı olarak kullanımı yaygınlaştı (Pincus ve Kirsch, 1936).

Heape ile 1890 yılında başlayan embriyo transfer çalışmalarına zamanla ilgi artmıştır. Bu alanda 1980 yılına kadar önemli embriyo yöntem ve teknikleri standardize edildi.

Çiftlik hayvanlarındaki ilk embriyo transfer çalışmaları Warwick ve ark., tarafından 1932-1949 yılları arasında keçi ve koyunlarda daha çok uterus ortamının özelliklerini de inceleyen araştırmalar olarak başladı (Warwick ve ark., 1934; Warwick ve Berry, 1949).

Umbaugh, 1949 yılında sığırlarda ilk başarılı embriyo transferiyle gebelik elde ettiğini, ancak, taşıyıcı ineklerin doğum sürecini tamamlamadan abort yaptıklarını bildirdi (Umbaugh, 1949).

Sığırlarda embriyonun transservikal kateterle elde edilmesini bildiren ilk makale Rowson ve Dowling (1949), tarafından Tarımsal Araştırma Konsili (ARC) aracılığı ile yayınlandı.

Tablo 1. Farklı hayvan türlerinde ilk embriyo nakil araştırmaları.

Yıl	Hayvan	Araştırmacı	Yıl	Hayvan	Araştırmacı
1890	Tavşan	Heape	1968	Gelincik	Chang
1932	Keçi	Warwik ve ark.	1974	At	Oguri ve Tsutsumi
1933	Fare	Nicholas	1975	Vizon	Adams
1934	Koyun	Warwick ve ark.	1976	Maymun	Kraemer ve ark.
1951	Domuz	Kvansnickli	1978	Kedi	Schiver ve Kraemer
1951	İnek	Willet ve ark.	1978	İnsan	Stoptoe ve Edwards
1964	Hamster	Blaha	1979	Köpek	Kinney ve ark.

Kanagawa et al., (1995)

Sugie, 1965 yılında, geliştirdiği embriyo pistolesi ile serviksi geçerek cerrahi olmayan embriyo nakilini başardı (Kanagawa et al., 1995).

Willet ve arkadaşlarının, kesilen bir inekten elde ettikleri embriyoyu başka bir ineğe nakletmeleriyle, sığırlarda yavru alınabilen ilk embriyo nakli, 1951 yılında gerçekleştirildi (Willet ve ark., 1951).

Embriyo transfer alanında ticari firmaların kurulmasına Amerika Birleşik Devletleri'nde 1970'li yıllarda rastlanmaktadır. Bu şirketler halen mevcut olan embriyo transfer ve teknolojileri ile ilgili tüm ürünlerin geliştirilmesi ve pazarlanmasına önderlik etti. Alberta Livestock Transplantasyon Merkezi bu alanda faaliyete başlamış ilk kurum niteliğini taşımaktadır (Betteridge, 1981; Betteridge, 2003). Embriyo transfer teknolojilerinin hızla gelişmesinde, elde edilen bilgi birikimi ve konu üzerinde çalışan araştırmacıların artmasında, 1970'li yıllar önemlidir. Araştırmacıların özellikle uterus yıkaması üzerine becerileri arttıkça çalışmalar hız kazanmıştır (Mapletoft ve Hasler., 2005). Kuzey Amerikada, 1979 yılında, 17.000 gebeliğin embriyo transferi ile sağlandığı bildirilmektedir (Seidel, 1981). İki bin iki yılında tüm dünya da 538.312 adet embriyo transferi yapıldığı, bunların % 52'sinin dondurulmuş embriyo olduğu, %15'inin ise IVF teknikleri ile üretildiği bildirilmektedir (Thibier, 2003). Kuzey

Amerika’da embriyo transfer üzerine çalışan ticari kurumlar, 42.000 vericiden elde ettikleri 190.000 adet embriyo nakletti. Bu sayı tüm dünya da bildirilen embriyo transfer çalışmalarının % 35’ini oluşturmaktadır (Mapletoft ve Hasler., 2005).

Genetik alanında çalışan Dr. Berry üremede immunolojik sorunları gündeme getirerek 1982 yılında Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğunun (IETS) ilk embriyo transfer ödülünü aldı. IETS’in embriyo transfer teknikleri alanında çalışanları onurlandırmak için her yıl verdiği ödül programları 1982 yılından bu yana devam etmektedir (Betteridge, 2003).

Günümüzde, embriyo transferinin değişik uygulama alanları vardır. Bunlar arasında, hızlı genetik ilerleme sağlamak, üretim maliyetlerini düşürmek, sun'i tohumlama için damızlık boğaların üretilmesi, seri embriyo üretimi anlamına gelen MOET uygulamaları sayılabilir (Teepker ve Keller, 1989; Bondioli ve ark., 1990; Anonim1; Ruane ve Smith, 1989; Christensen, 1991).

2.2. Türkiye’de Embriyo Transfer Çalışmaları

Embriyo transfer tekniği Türkiye’de gerek araştırma, gerek uygulama bazında sınırlı da olsa denenmiştir. Ancak, bu çalışmalar embriyo transferinin saha şartlarında uygulanmasına önderlik edememiştir. Bu durumun nedenleri arasında, daha fazla verim için yetiştiricilerde genetik bilincinin oluşturulamamış olması, embriyo transfer alanında yetişmiş personel azlığı, yöntemde kullanılan malzeme ve kimyasalların ithal yoluyla temin edilmesi, teknik donanımın yetersizliği ve ülkemizdeki yetiştiricilik şartlarının üreme sağlığı üzerine olumsuz etkileri sayılabilir (Gökçen, 2007).

Türkiye’de ilk embriyo transfer çalışmaları 1985 yılında İleri ve ekibinin Esmer ırk ineklere saf Holstein embriyoları naklederek yavru elde etmesiyle başladı (Anonim, 4).

Dünya’da biyoteknolojik yöntemlerin sayısı ve uygulama alanlarının artması ile bir çok alanda (ıslah, infertilite mücadelesi, farmosötik çiftlikler vb.) pratik olarak

uygulanır hale gelen embriyo transfer çalışmalarına, devlet kurumları da kayıtsız kalmamıştır. Örnek olarak Çukurova Tarımsal Araştırma Müdürlüğünde başlatılan Anadolu Alacası Geliştirme Projesi verilebilir. DPT tarafından, 2000 yılında, desteklenerek yürürlüğe girmiş olan proje, 2001 yılı Eylül ayından itibaren faaliyete geçmiştir. Proje MOET yöntemiyle verici olarak seçilen dışiden 16-20 arasında embriyo üreterek ıslah sürecini kısaltmayı amaçlamaktadır. Projede 32 baş verici, 512 baş taşıyıcı sığır kullanılarak 2005-06 sürecinde gerçekleştirilen embriyo transferleriyle 91 buzağı alındı (Anonim, 2).

Üniversitelerde de embriyo transferi üzerine yürütülen çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda, dondurulmuş Brangus embriyosu 64 adet İsviçre esmeri düveye senkronizasyondan sonraki 7. günde servikal yoldan nakledilerek % 32.81 oranında gebelik elde edildiği bildirildi (Sungur ve ark., 1989).

Ülkemiz koşullarında gerçekleştirilen bir çalışmanın sonuçları arasında, 5 inekten birinin süperovulasyona cevap vermediği, yıkamalarda 4 inekten 17 embriyo elde edildiği, dondurularak nakledilen 14 embriyodan % 28.5 gebelik elde edildiği bildirildi (Sungur ve Yurdaydın, 1994).

Ülkemizde, ticari ve bireysel embriyo transfer çalışmaları da yapılmıştır. İkibin üç yılında dondurulmuş embriyo transfer çalışmalarına başlamış olan Egevet firması, çoğu Batı Anadolu'da yer alan, 10 adet ticari çiftlikte yıllara göre tekrar uygulamalar da dahil toplam 198 embriyo transfer uygulamasından 110 gebelik ve 87 yavru elde ettiğini bildirmektedir. Elde edilen 110 gebelikten 13'ünün abortla son bulduğu, gebelik oranını % 55.55 ve elde edilen buzağı oranının % 43.93 olduğu bildirilmektedir (Anonim, 1).

2.3. İneklerde Ovaryum, Oosit ve Ovidukt Fizyo-Patolojisi

Bu bölümde, dişilerde ovaryum, foliküler aktivite, oosit ve ovulasyonla ilgili güncel bilgiler, embriyo transfer aşamaları ve karşılaşılan kimi sorunların daha kolay anlaşılması bakımından verildi. Halen embriyo transfer alanında, kaliteli embriyo elde edebilmek, hem natif embriyo üretiminde ve hem de IVF çalışmalarında önemli bir

sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu ve buna benzer sorunların aşılmasında temel çıkış noktası, ovaryum ve ovaryum fonksiyonlarının kontrol edilmesi, kaliteli embriyo eldesinde ovaryumun etkileri, kullanılan hormonların foliküler gelişme ve oosit özelliklerine etkileri, embriyo ve ovaryum özelliklerinin anlaşılması olacaktır.

Ovaryum

Embriyonik hayatta mesoderm kökenli hücreler ile crista genitaliste oluşan ve ovaryumda primordian folikül sayısının artmasına yönelik faaliyetler dışının fetal hayatında gerçekleşmektedir. Dişi buzağılar, bilimsel öngörülere göre 100.000'den fazla dinlenme dönemindeki primordial folikülü olan ovaryuma sahip olarak doğarlar. Fetal hayatta oluşan bu foliküllerin önemli bir kısmı pubertaya ulaşıncaya kadar, kalan primordial foliküller ise gerek hormon bağımlı dönem kapsamında gerçekleşen siklik foliküler dalgalanma ve ovulasyon ile ve gerekse intraovarian etkiler altında atresia ve dejenerasyona uğrayarak tükenmektedir (Greve ve Callesen, 2005).

Ultrason teknikleriyle çalışmalarda, ineklerin % 95'nin bir östrüs siklusunda 2-3 foliküler dalgalanmaya sahip oldukları anlaşılmıştır (Adams, 1999; Evans, 2003). Siklik faaliyetlerin bir ineğin değişik sikluslarında büyük oranda aynı olduğu (Ireland ve Burns, 2003) ve yine yaş ve ırk özelliklerinden bağımsız olarak devam ettiği bildirilmektedir (Evans, 2003). Foliküler aktiviteinin başlaması, gelişmesi, farklılaşması ve dominant folikülün belirlenmesinde etkin olan hormonal ve moleküler mekanizmalar, parakrin ve endokrin işlemler içeren oldukça kompleks bir olgudur. Bununla birlikte, kan dolaşımındaki, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinleştirici hormonu (LH)'nin inhibin, aktivin, follistatin ve değişik gelişme faktörleri ile etkileşim içine girerek önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır (Ginther, 2000; Mihm ve Bleach, 2003; Webb ve ark., 2003). Folikül dalgalanması, gelişmesi, farklılaşması, dominant folikül seçimi ve foliküler atresia olayı hakkında artan bilgi birikimi, ineklerde siklus süresindeki farklılıkların daha iyi anlaşılmasına, tohumlamanın doğru zamanda yapılabilmesine, daha bir örnek embriyo eldesine ve alıcı verci arasındaki senkronizasyonun daha başarılı yapılmasına ışık tutacağı kaydedilmektedir (Petyim, 2002, Greve ve Callesen, 2005). Yapılan çalışmalar sonucunda östrüs siklusu boyunca

kanda seyreden hormonlar özellikle de östrojen hormonu seviyelerinin oosit ve embriyo kalitesini önemli düzeyde etkilediği anlaşılmıştır. Bu çerçevede siklusun diöstrüs döneminde foliküler dalgalanmalar nedeniyle yükselen östrojenin oosit kalitesini olumsuz etkilediği ortaya konmuştur (Greve ve Callesen, 2005). Son zamanlarda foliküler dalgalanma biçimi hakkında elde edilen bilgi ve tecrübelerin embriyo transfer tekniklerinin standardizasyonu ve tekrarlanabilirliği açısından oldukça önemli olduğu bildirildi. Bu çerçevede, daha başarılı süperovulasyon protokolleri için, foliküler dalgalanmanın kontrol edilebileceği (Bo ve ark., 2002) ve böylece daha kaliteli oosit elde edebileceği belirtildi (Petyim, 2002).

Oosit

Buzağı ovaryumundaki oositlerin ovulasyondan 24 saat öncesine kadar I.mayoz'un profaz aşamasında kaldığı bilinmektedir (Greve ve Callesen, 2005). Oosit olgunlaşma sırasında birçok özel değişime uğrar. Oosit olgunlaşmasında en uzun süre primordial folikülün gelişmesi aşamasında geçmektedir. Bu bağlamda 30 µm olan primordial folikülün hacimce artarak 130 µm çapında bir tersiyer folikül olabilmesi için 180 günlük bir sürece gereksinim olduğu bildirilmektedir (Hyttel ve ark., 1997, Fair, 2003, Greve ve Callesen, 2005). Bu gelişme sürecinde oosit ooplazmasının fetal gelişme açısından çok önemli yapısal ve moleküler değişimler geçirmektedir (Hyttel ve ark., 1997; Mermillod ve ark., 1999; Sirard ve ark., 2003; Fair, 2003). Primer ve sekonder foliküllerin yapısında, embriyonun 8 hücreli aşamasına kadar kullanılabilecek ribonukleik asit, proteinler, lipidler ve karbonhidratlar bulunmaktadır. Primer oositin yapısında bulunan bu elementler golgi kompleksi, endoplazmik retikulum, mitokondri, değişik veziküller ve lipid damlalarında depo edilmektedir. Sekunder folikülde oluşan, zona pellucidanın oosit ve foliküler ortam arasında ilişkiyi sağladığı belirtilmektedir. Kumulus hücrelerinin zona pellicidayı dışardan kaplayarak oositi desteklemektedir. Sekunder oositte kortikal granüllerin oluşması gibi çoğu olgunlaşma olayları ve ooplasmadaki değişimlerin bu aşamada gerçekleştiği, ancak nuklear değişimlerin daha sonraki aşamalarda olduğu anlaşılmıştır (Greve ve Callesen, 2005). Gelişme fazında oosit kalitesi ve daha sonraki gelişme aşamalarını olumsuz yönde etkileyebilecek bir çok duruma maruz kalabilmektedir. Bu durumlar arasında, oosit kalitesini düşüren

hormonlar (Ör; diöstrüs döneminde östrojen varlığı), beslenme programından kaynaklanan yan etkiler, sıcaklık stresi, toksinler ve hastalıklar sayılabilir (Butler, 2003; Greve ve Callesen, 2005).

Sekunder folikül aşamasından başlamak üzere dominant folikül aşaması ve LH pikine kadar oosit içinde gelişen olgunlaşma olaylarının tümü oosit kapasitasyonu olarak tanımlanmaktadır. Oositi ovulasyon ve fertilizasyona hazırlayan oosit kapasitasyonu çerçevesinde gerçekleşen olaylar arasında, organellerin küçük bir golgi kompleksi ile periferde lokalize olması, daha fazla lipid damlacığı üretilmesi ve kortikal granüllerin perifere göçerek plazma membranı altında lokalize olması sayılabilir. Ek olarak, nuklear membranda ilk inceleme belirtileri ortaya çıktığı ve nukleolusta kimi özel değişimlerin gerçekleştiği belirtilmektedir (Hyttel ve ark., 1997).

Oosit olgunlaşmasında son evrenin ovulasyondan hemen önce LH piki tarafından tetiklendiği ve yaklaşık 24 saat sonra folikülde ovulasyonla son bulduğu kaydedilmektedir (Callesen ve ark., 1986). Oosit gelişmesinin son evresinde meydana gelen mikro yapısal değişimler (ultrastructural), kumulusların dağılmasına önderlik eden kumulus ile oosit arasındaki sıkı ilişkinin zayıflaması (Hyaluronik asit bağlarının gevşemesi), kortikal granüllerin periferde dağılımı, protein ve lipid rezervinde artış ve bloke olan II. mayozun kaldığı yerden devam ederek tamamlanması sayılmaktadır (Hyttel ve ark., 1997).

Süperovulasyon ve embriyo transferi açısından foliküler mikro-çevrenin oosit kalitesini, oositin fertilizasyon yeteneğini ve daha sonraki embriyonik gelişim evrelerini etkilediği anlaşılmıştır (Greve ve ark., 1984; Greve ve ark., 1989; Greve ve ark., 1995). Folikül içi endokrin dinamikler, ineğin genel hormon profillerinden ileri düzeyde etkilenmektedir (Callesen ve ark., 1986; Greve ve ark., 1989). İnek ve düvelerde, oosit ve folikül dokuları arasındaki yapısal, moleküler ve endokrin düzeyleri arasında sıkı bir uyum ve bu foliküler olaylarla eş zamanlı homeostatik bir denge vardır. Bu eş zamanlı dengenin hormonlar etkisiyle oluşan foliküler mikro çevrenin etkisi altında oosit olgunlaşması ya da ovulasyon gecikmesi gibi nedenlerle bozulabileceği bildirilmektedir. (Greve ve Callesen, 2005).

Ovulasyon ve ovidukt

Ovulasyon sırasında folikül içinde önemli değişimler olur. Bu değişimler arasında, teka katını oluşturan damarlarda permeabilitenin azalması, foliküler sıvının viskozitesi, miktarı ve basıncının artması sayılabilir (Hunter, 2003). Ovulasyon süre olarak yaklaşık 1-3 dk. içinde gerçekleşir. Ovulasyon viskozitesi artmış folikül içi sıvının folikül duvarının rupturundan sonra sızmaya başlaması (Oozing) şeklinde gerçekleşir. Bu sırada oositin çevresi kumulus hücreleri ile çevrilidir. Ovulasyon ile birlikte folikül içeriği ile oosit fimbriyası sayesinde ovidukt kanalına geçmektedir (Hunter, 2003). Süperovulasyon uygulamasında oositlerin folikülü LH pikinden belli bir süre sonra ardıl ovulasyonlarla terk ettiği bildirilmektedir. Bu özel süreçte meydana gelebilecek gecikme ya da olumsuzlukların oosit kalitesinin düşmesine neden olacağı bildirilmektedir (Greve ve ark., 1984). Ovulasyonların zamana yayılmasının oosit kalitesi üzerine olumsuz etkileri, ovulasyonun önlenmesi ya da geciktirilmesi gibi deneysel çalışmalarla ortaya konulmuştur (Goff ve ark., 1986). Normal ovulasyon yapan ineklerde de benzer sorunların yüksek süt verimi, uygun olmayan beslenme ve stres faktörleri gibi nedenlerle ortaya çıktığı bildirildi. Süt verimi ve dengesiz beslenme gibi durumlarda çoğu döllenemeyen fazla olgunlaşmış (overmaturated) oositlerin oluştuğu da kaydedilmektedir. Fazla olgunlaşmış oositlerin fertilize olması durumlarında da elde edilen embriyo kalitesinin düşük olduğu ve embriyonik ölüm oranının arttığı bildirildi. Gerek oosit olgunlaşması ve ovulasyon sürecinde gelişen olumsuzluklar ve gerekse süt verimi ya da beslenme bozuklukları gibi stres faktörleri altında gelişen olumsuzlukların her ikisi de sürünün reproduktif verimini aksattığı ifade edilmektedir (Waltersa ve ark., 2002).

Ovidukt fonksiyonları, embriyo kalitesi üzerine, ovulasyon ve erken embriyonik gelişmeler sırasında etkili olmaktadır. Ovidukt fonksiyonlarının bir çok farklı hormon etkisi altında şekillendiği ve özellikle östradiol 17 beta ve progeteron seviyeleri ile kontrol edildiği bildirilmektedir (Hunter, 1988; Hunter, 2003). Süperovulasyona tabi tutulmuş ineklerin hormon seviyelerinde olası olumsuzlukların ovulasyondan önce, ovulasyon sürecinde ve sonrasında meydana geldiği ve ovidukt ortamında embriyo yaşamı açısından olumsuz değişimlere neden olduğu bildirilmektedir (Callesen ve ark., 1986). Ayrıca, bu ve buna benzer durumlar nedeniyle ovidukt içinde sperm taşınmasının

olumsuz etkilenebileceği, fertilizasyonun aksayabileceği de kaydedilmektedir (Saacke ve ark., 1994). Yine utero-tubal geçiş noktasında meydana gelebilecek bir ödem, ovidukt hareketliliğinde oluşabilecek bir artış ya da azalma gibi faktörlerin fertilizasyonun aksamasına ya da erken embriyonik ölümlerin oluşmasına neden olabileceği bildirilmektedir. Bu durumların embriyo kalitesini olumsuz yönde etkileyerek embriyo transfer çalışmalarında başvuru süperovulasyon sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebileceği de vurgulanmaktadır (Donaldson,1986).

2.4. Embriyo Transferinin Temel Aşamaları

2.4.1. Verici, taşıyıcı ve erkek gen kaynağının seçimi

Vericilerin seçimi (Donor seçimi)

Embriyo transfer çalışmalarında verici seçimi açısından vericinin sağlığı gibi bireysel özellikleri, genetik yapısı ve embriyo üretim özellikleri temel kriterleri oluşturmaktadır (Tekeli, 1994).

Embriyo transfer çalışmalarında üstün genetik yapıya sahip olmak vericinin seçilmesinde belirleyici özelliği oluşturmaktadır (Hafez, 1987c; Tekeli, 1994). Vericinin üstün genetik yapıya sahip olduğunu belirlemede süt üretimi, süt kompozisyonu, yavrularının gelişme kabiliyeti, kolay doğurma özelliği ve hastalıklara karşı direnci üzerinde durulması gereken kriterler arasında sayılmaktadır (Siedel ve Siedel, 1991). Üstün genetik yapıya sahip hayvanların belirlenmesinde fenotipik yapının kullanılması yanıltıcı olabilir. Özellikle gelişmiş ülkelerdeki araştırmacılar ve embriyo transferini yetiştiricilik amacıyla ticari olarak kullanan üreticiler embriyo transferinde donör hayvanların fenotipik özellikleri yerine amaçların gerçekleştirilmesi açısından genetik uygunluğa önem vermektedirler. Üstün genetik yapının belirlenmesinde verim kayıtları ve genetik yöntemlerle değerlendirme yapmak önem arz etmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Vericinin üstün genetik yapıya sahip olması, embriyo satışında karlılık, yeni kuşakların verimi ve kısa dönemli kar amaçları açısından belirleyici nitelik taşımaktadır. Örneğin, amaçlara uygun olarak seçilmiş vericiden elde edilen bir embriyo ya da böyle embriyo elde edilmiş buzağı değerinin embriyo transfer çalışması için yapılan tüm masraflardan daha fazla olabileceği bildirilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Eğitim, deneysel ve demonstrasyon gibi amaçlarla yapılan embriyo transfer çalışmalarında üstün genetik yapı gibi özelliklerden daha çok çalışma başarısı açısından uygun hayvanların seçilmesine önem verilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Nesli tükenmekte olan hayvanlarda yapılan embriyo transfer çalışmaları için üstün genetik yapı özelliği ve diğer kimi kriterler ihmal edilerek sadece hayvan sayısının yeni bir bölgede ya da yeni bir yetiştiricilik sistemi ile artırılması amaçlanabilmektedir. Özellikle yerli ırklara ait gen kaynaklarının dondurularak korunmaya alınmasında ırk içinden rastlantısal olarak verici seçimi yapılabilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991; Tekeli, 1994).

Yoğun embriyo üretimine yönelik çalışmalarda embriyo naklinde başarının artırılması açısından vericinin infertiliteye önderlik edebilecek kusurlar bulundurmamasına dikkat edildiği bildirilmektedir. Donor'un, sağlıklı, siklik faaliyetleri düzenli ve fertilite gücü yüksek olması vericiden elde edilen embriyoların daha sonraki transferlerinde başarının artmasına neden olabileceği bildirilmektedir. Yine verici olarak kullanılacak ineklerin retensio sekundarium gibi postpartum problemler taşımayan hayvanlar olmasının faydalı olduğu kaydedilmektedir (Tekeli, 1994; İleri, 2002).

Donor olarak kullanılacak ineklerin, doğumdan 60 gün veya daha sonraki bir dönemde olmasının fazla sayıda embriyo elde etme açısından önemli olduğu bilinmektedir. Hasler ve ark. (1987) genç ineklerin düvelere göre daha başarılı verici olduklarını bildirmektedir.

Verici olacak etçi ve sütçü ineklerde laktasyonun süperovulasyona cevabın düşmesine neden olmadığı bildirilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991). Süperovulasyona oluşan cevabın ineklerde siklus içindeki foliküler dalgalanmayla uygun olmasının etkili

olduğu ve özellikle de ikinci foliküler dalgalanmaya uygun düşen süperovulasyon tetiklemesinin daha verimli sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Nasser ve ark.,1993). İneklerde II. foliküler dalgalanma kızgınlığı takip eden 8-12 günlük (ovulasyonu takip 7-11 günlük) süreçte başlamaktadır (Ginther ve ark., 1989).

Yağlanmış olan ineklerin verici olma kabiliyetleri zayıf olarak nitelendirilmektedir. Verici olan yağlanmış ineklerin, süperovulasyonda hormonlara yetersiz cevap ve embriyo eldesinde genital organların manipulasyon zorluğu gibi dezavantajlara sahip olduğu belirtilmektedir (Santos ve ark., 2008).

Üreme hastalıkları dışında hastalık (ateşli hastalıklar gibi) taşıyan vericilerden elde edilen embriyo kalitesinin oldukça düşük olduğu kaydedilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Vericiler için belirtilen olumlu kriterleri aynı anda üzerinde toplayan inekler bulmak oldukça güç bir durumdur. Embriyo transfer çalışmasında araştırmacının seçme şansı varsa şu sıra ve kriterlere dikkat ederek verici seçimini gerçekleştirmesi önerilmektedir. Fertil, postpartum dönemden çıkmış (en az 60 gün), çalışma sırasında kilo alan, uzun dönem embriyo transfer programları açısından uygun olan hayvanların verici olarak seçilmesi gerektiği bildirilmektedir. Çalışma döneminde kilo kaybeden ineklerin embriyo transfer çalışması için uygun verici adayı olmadığı belirtilmektedir. Uzun dönem embriyo transfer çalışmalarında tekrarlanan süperovulasyon tedavilerine kimi inekler daha iyi uyum sağlarken, kimi ineklerin hızla yağlanarak tedaviye cevaplarının düştüğü rapor edilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Sağlıklı olan genç düvelerin daha erken dönemde embriyo üretim için verici olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Hasler, 2004).

Taşıyıcıların seçimi (Recipient seçimi)

Embriyo transfer çalışmaları için taşıyıcıların seçimi embriyo transferinin diğer aşamaları kadar önemlidir. Taşıyıcı olarak reproduktif sağlığı uygun, gebe olmayan dişiler kullanılmaktadır. Taşıyıcıların seçiminde öncelikle taşıyıcı olarak inek ya da

düve kullanımına karar vermek önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Araştırmacılar taşıyıcı seçiminde embriyo transfer yönteminin önemli olduğunu belirtmektedir. Bu kapsamda cerrahi yöntemle embriyo transfer yapılacaksa düvelerin tercih edilebileceğini, transservikal yöntemle embriyo nakli yapılacaksa ineklerin tercih edilmesi gerektiğini bildirilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991). King ve ark. (1985) ineklerin taşıyıcı olarak kullanılmasında doğumun kolay olmasının bir avantaj olduğunu bildirdi. Buna karşın düvelerin sağım ve buzağı bakımı sorunları olmaması nedeniyle embriyo transfer çalışmalarında günlük işler açısından daha avantajlı oldukları kaydedildi (Siedel ve Siedel, 1991). Yine laktasyonun taşıyıcıda gebeliğe erken dönemde olumsuz etkileri nedeniyle, düvelerin tercih edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Siedel ve Siedel, 1991). Birçok embriyo transfer çalışmasında sütçü ineklerin daha kolay gebe kaldıkları yönündeki düşünce nedeniyle sütçü inekler taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Buna rağmen taşıyıcı seçiminde ırkın önemli olmadığı da vurgulanmaktadır (Tekeli, 1994). Taşıyıcıların seçiminde nakledilecek olan embriyonun nitelikleri de önem arz etmektedir. Etçi sığır embriyoları için pelvis yapısı geniş ve kolay doğum yapabilen ineklerin tercih edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Hasler, 2003).

Amerika'da embriyo nakli yapan çiftliklerde taşıyıcı seçiminde yaygın olarak önceki yılların sun'i tohumlama kayıtlarına başvurulduğu bildirilmektedir. Bu çerçevede sun'i tohumlamada kolay gebe kalan ve gebeliğini başarıyla tamamlayan ineklerin embriyo transfer içinde iyi bir taşıyıcı oldukları ilkesi yaygın olarak kabul görmektedir. Sun'i tohumlama uygulamalarında zor gebe kalan ya da gebeliğini devam ettiremeyen kısaca infertilite sorununa sahip ineklerin embriyo transferinde de başarısız olabilecekleri kaydedilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Taşıyıcı olarak inek ya da düve kullanımında kimi avantajlar ve dezavantajlar olduğu bildirilmekte ve yapılacak olan çalışmanın amaçları doğrultusunda dikkatli bir analiz ile taşıyıcıların seçilmesi gerektiği belirtilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Taşıyıcı adayların boğa ile karşılaştırılmaması gerektiği ve besi durumu iyi olan, tercihen kilo alan, sıklık faaliyetleri düzenli, östrüsleri belirgin olarak ortaya çıkan, dişilerin taşıyıcı olarak kullanılmasının faydalı olacağı belirtilmektedir. Taşıyıcıların seçileceği sürüde aborta ya da genç buzağıkların yaşam gücünü azaltacak brusellozis,

tuberküloz, leptospirozis, anaplasmozis, vibriozis, mavi dil ve trichomoniasis gibi hastalıkların aşılama ile daha önceden eradike edilmesi gerektiği ifade edilmektedir (Tekeli, 1994). Vericilerin senkronizasyonunda östrüslerin daha yüksek oranda saptanabilmesi için vericilerin iyi bir östrüs tespit sistemine tabi tutulmasının önemli olduğu, vericilerde uygulanacak östrüs senkronizasyon programlarının ve hayvanların yönetiminde kullanılacak olan sistemin amaca uygun olması, bu amaçla istihdam edilecek personelin eğitimi olması gerektiği de vurgulanmaktadır. Genellikle taşıyıcı seçimi için en iyi dönemin doğumların tamamlanmasından sonraki 2-3 aylık zaman dilimi olduğu belirtildi (Siedel ve Siedel, 1991). Embriyo transfer merkezlerinde embriyo üretim ve nakli amacıyla birkaç yüz baş inek bulundurulduğu ve uygun taşıyıcıların kaliteli embriyo üretimi için bekletildiği kaydedilmektedir. Dondurulmuş embriyo ile yapılan nakillerde bu tarz boş geçen günlerin en aza indirilebileceği ve yine daha küçük bir sürünün yeterli olabileceği de bildirilmektedir (Betteridge, 1977).

Nakilden sonra gebeliğin test edilmesi de taşıyıcıların yönetimi çerçevesinde ele alınmaktadır. Özellikle dondurulmuş embriyo ile yapılan nakillerde gebelik oranı daha düşük olabileceğinden erken gebelik teşhisi, taşıyıcıların boş kalmaması açısından önemli görülmekte ve bu amaçla son kızgınlıktan 21-22 gün sonra kan ve süt progesteron testinin kullanılabileceği kaydedilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991). Gebe kalmamış taşıyıcılar, yeni nakillerde tekrar kullanılabilmektedir. Yapılan nakillerden sonra, oldukça düşük gebelik oranına sahip taşıyıcıların, embriyo transfer programından çıkarılması gerektiği ifade edilmektedir (Hasler, 2003). Taşıyıcıların yapılan nakillerden sonra en az %45 gebelik oranını yakalıyor olması, daha sonraki nakillerde kullanılmak üzere, minimum kriter olarak kabul edilmektedir. Taşıyıcı seçimi ve yönetiminde yapılacak embriyo transfer yoğunluğunun da önemli olduğu belirtildi. Az sayıda yapılacak embriyo nakli için taşıyıcı senkronizasyonuna gerek olmadığı, günlük 4 veya daha fazla embriyo transferi yapılırsa östrüs senkronizasyonu yapmanın daha faydalı olduğu bildirilmektedir (Hasler, 2004). Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) senkronizasyonundan sonra yapılan nakillerden, spontan kızgınlıktan sonra yapılan nakillere göre daha yüksek oranda gebelik elde edildiği bildirilmektedir (Hasler ve ark., 1987).

Embriyo transfer merkezlerinde başarılı bir uygulama için, aşağıda maddeler halinde sunulan,

- Üstün kalite özelliklerini tutturabilen hayvanlarda çalışmak,
- Aşılama, kan testleri ve karantina uygulamalarının da düşünüldüğü bir sürü sağlık programı uygulamak,
- Yeterli yem depolamak,
- İyi belirlenmiş bir rasyon ve beslenme programını takip ediyor olmak,
- Kolay ve anlaşılır bir kayıt sistemine sahip olmak,
- İnekleri kolay görülebilecek şekilde numaralandırmak,
- Yüksek oranda östrüs tespiti yapan bir sistem kullanmak,
- Taşıyıcılarda sıklık faaliyetleri takip etmek,
- Bilinçli ve sabırlı bir ekip tarafından hayvanların bakımı, beslenmesi ve yönetimini sağlamak, (Bu konuda kadınların daha başarılı olduğu bildirilmektedir.),
- Gerekli finansal güç temin edildikten sonra embriyo transfer çalışması yapmak gibi, kriterlere uyulması gerektiği kaydedilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Embriyo transfer çalışmalarında boğa (sperma) seçimi

Embriyo transferinde genetik ilerleme ve nakil başarısı açısından damızlık olarak kullanılacak boğanın üstün genetik yapıda ve sperma kalitesinin iyi olmasının oldukça önemli olduğu belirtildi. Bilindiği gibi embriyo gen yapısının bir yarısı anneden diğer yarısı babadan gelmektedir. Dolayısıyla, embriyo kalitesinin belirlenmesinde erkek gen yapısının da, önemi vardır (Siedel ve Siedel, 1991). Süperovulasyon uygulanmış ineklerin dişi genital kanallarında sperm taşınmasının kimi erken ovulasyonlar nedeniyle kanda progesteron artmasına bağlı olarak inhibe olduğu bildirilmektedir. Yine daha kaliteli embriyo üretimi için ve dışıde sperm taşınması açısından sperma kalitesi önemli görülmektedir. (Hawk, 1988).

2.4.2. Verici ve taşıyıcıların seksüel senkronizasyonu

Embriyo transfer teknolojisinde de prostaglandinlerin (PGF_{2α}) senkronizasyon için kullanılabilmesi önemli bir gelişme olmuştur. İneklere süperovulasyon için hormon enjeksiyonlarının başlamasından 48 saat sonra prostaglandin enjeksiyonu yapılmaktadır.

Doğal ya da sentetik prostaglandinler verici hayvanlarda süperovulasyonun etkinliğini artırmak, alıcı ve verici hayvanlar arasında seksüel senkronizasyonu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (İleri, 2002). Doğal prostaglandinler yanında günümüzde daha çok, Dinoprost, Cloprostenol, Tiaprost ve Luprostiol gibi sentetik türevleri kullanılmaktadır (Alaçam, 1994).

Embriyo eldesi ve naklinde tüm aşamaların, östrüs tespiti ve başlangıcına göre planlandığı bildirilmektedir. Bu nedenle embriyo transfer çalışmalarında östrüsün açık ve doğru bir şekilde saptanmış olması önem arz etmektedir. Dişilerin genital kanalında siklusun günlerine göre önemli değişimler olduğu bilinmektedir. Örnek olarak östrüsten sonraki birinci gün fertilizasyon ve yeni oluşmuş embriyo için ideal bir ortam oluştururken, aynı dönemde, uterus embriyonun canlılığını koruyabilecek niteliğe sahip değildir (Siedel ve Siedel, 1991).

Verici ve alıcı arasındaki senkronizasyonun tutarlılığı embriyo transfer çalışmalarının sonuçlarına etkidiği bildirilmektedir. Verici ve alıcı arasındaki senkronizasyonun tam olarak tespit edilemediği durumlarda embriyo transfer çalışmasının ertelenmesi gerektiği bildirilmektedir (Tekeli, 1994). Östrüslerin çoğunlukla, gece ve sabaha karşı başladığı, bu nedenle verici ve alıcı arasındaki senkronizasyonun tutarlılığı açısından geceyi de içine alan bir östrüs tespit yöntemi kullanmanın önemli olduğu bildirilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Östrüs tespiti

Verici ve taşıyıcıların östrüs açısından günlük en az iki kez gözlenmesi gerektiği, gözlemlerin sabah erken saatlerde ve akşam üzeri yapılması gerektiği, özellikle vericilerin östrüslerinin daha sıkı takip edilmesinin faydalı olduğu bildirildi. Östrüs tespiti amacıyla 8 saat arayla günde üç kez gözlem ve kontrol yapılabileceği gibi, ineklerin sürekli gözlenmesinin de faydalı olduğunu bildiren literatürler vardır (Heuweiser ve ark., 1997; Barati ve ark., 2006). Östrüs gözlemi sırasında özellikle şüpheli ve östrüste olan hayvanların kayıt altına alınması gerektiği, kayıtların tarih, saat ve hayvanın numarasını belirtecek şekilde tutulması gerektiği kaydedilmektedir. Gözlem sırasında ineğin östrüste olduğuna karar vermek için aşımı kabul refleksi

(Standing Heat) esas alınması gerektiği belirtildi. Sağrı bölgesindeki kıllarda kırışma, hareketlilik, böğürme, atlama, koklama, kuyruk kaldırma hareketi, çara akıntısı ve vulval ödem belirtilerinden çoğunu gösteren ineklerin şüpheli olarak kabul edilmesi gerektiği ve kayıt altına alınarak daha dikkatli takip edilmesinin faydalı olduğu bildirildi (Siedel ve Siedel, 1991).

Östrüsün gözlenmesinde özellikle aşımı kabul refleksi temeline dayanan mikro işlemcili radyo-telemetrik östrüs gözleme sisteminin kullanılabileceği belirtilmektedir. Östrüs gözleminde sağrı bölgesine yerleştirilen boya ve tebeşir tozu gibi sistemlerin de faydalı olduğu belirtilirken, embriyo transfer çalışmasında kullanılacak hayvanlarda penisine translokasyon uygulanmış, vazektomize edilmiş ya da penisi bloke edilmiş boğaların östrüs tespitinde kullanılmaması gerektiği bildirilmektedir. Bu tarz boğa kullanımının venereal hastalıkların bulaşmasına önderlik edebileceği ve tamamen steril bir yöntem olmadığı vurgulanmaktadır. Ayrıca, eğer deneme hayvanı kullanmak zorunlu ise androjenize ineklerin tercih edilmesi gerektiği de bildirilmiştir (Foote, 1975; Siedel ve Siedel, 1991).

2.4.3. Vericilerde süperovulasyon ve ovulasyonun uyarılması

Süperovulasyon, embriyo transferinin en önemli aşamalarından birini oluşturmaktadır. Süperovulasyon, verici hayvanlardan fazla sayıda embriyo elde etmek amacıyla, foliküler gelişmeyi etkileyen, folikül stimulan hormon ve FSH karakterindeki hormonların eksojen olarak uygulanması, ovaryumlarda çok sayıda folikül gelişimi ve ovulasyonun bir östrüs sürecinde uyarılması olarak tanımlanabilir (Boland ve ark., 1991; Alaçam, 1994; Mori, 1999).

FSH ve FSH karakterinde olan hormonlar ovaryumdaki antrum kazanmış foliküllere etki ederek onların daha ileri aşamalara gelişmesini sağlar. Foliküllerin antrum kazanma aşamasına kadar olan gelişimi gonadotropinden bağıntısız olarak ovaryum içi faktörler altında gerçekleştiği bildirilmektedir. Hipofizi alınmış dişilerde preantral döneme kadar olan foliküler gelişmenin devam ettiği ortaya konmuştur (Hafez, 1987a).

Başarılı ilk süperovulasyon çalışmasının 1940 yılında yapıldığı bildirilmektedir (Casida ve ark., 1940; Tekeli, 1994; Kanagawa ve ark., 1995).

Süperovulasyonda verimin artırılması amacıyla süperovulasyona başlandığı sırada ovaryumda bulunan dominant folikülün uzaklaştırılmasının faydalı olduğunu bildiren literatürler olmasına karşın bu uygulamanın elde edilen embriyo sayısını etkilemediğini ortaya koyan bildiriler de vardır (Hasler, 2004; Merton ve ark., 2003). Hasler (2004), süperovulasyonda uygulama başına verimin artırılabilmesi için foliküler dinamiğin daha iyi anlaşılması gerektiğini bildirdi.

Gonadotropinlerle süperovulasyon oluşturulması

Süperovulasyon amacıyla, glikoprotein yapıda olan, hipofiz ön lobundan salınan, hipofiz bezi ekstraktından saflaştırılan FSH, gebe kısırak kan serumundan elde edilen, Gebe Kısırak Serum Gonadotropini (PMSG), (bu hormon kimi araştırmacılar tarafından At Koriyonik Gonadotropini (eCG) olarak isimlendirilmektedir) ve menopozdaki kadınların idrarından saflaştırılan, İnsan Menopozal Gonadotropini (hMG) gibi hormonların kullanıldığı bildirilmektedir. (Alaçam,1994; Kanagawa ve ark., 1995; Mori, 1999).

Süperovulasyon amacıyla yapılan hormon uygulamalarında, ırka ve bireysel özelliklere göre doz ayarlamasının yapılamaması, bu amaçla kullanılan hormonlara verilen cevabın farklılık arzemesi, halen embriyo transfer uygulamalarının en büyük sorunları arasında yer aldığı bildirildi (Boland ve ark., 1991; Tekeli, 1994; Kanagawa ve ark., 1995).

İneklerin süperovulasyona verecekleri ovaryum reaksiyonları, ırka, yaşa, genel kondisyona, hormon tipine, uygulama şekline, iklime, beslenmeye ve çevresel koşullara bağlı olarak değişebilmektedir. Sütçü ineklerde süperovulasyon cevaplarının etçi ineklere göre daha düşük olduğu bilinmektedir. Yaşlanmayla birlikte hormonların etkinliğinin düştüğü, 9-10 yaşından sonra ineklerde süperovulasyon veriminin azaldığı bildirildi (Boland ve ark., 1991; Kanagawa ve ark., 1995).

Folikül uyarıcı hormon kullanımı

Folikül Uyarıcı hormon (FSH), antrum kazanmış folliküllerin teka interna ve granuloza hücrelerini hedef alarak, foliküler gelişmeyi daha ileri aşamalar için tetikler ve tersiyer folikülden başlıca östradiol 17- β gibi doğal östrojen salınımını uyarır. Folliküllerin gelişmesinde FSH ve LH birlikte etmektedir. Östrojen hormonu folliküllerin gelişiminde FSH'ya yardım eder. Östrojen negatif ve pozitif feedback mekanizmasıyla FSH ve LH salınımını kontrol eder (Reeves,1992; Yılmaz 1999).

Elsden ve ark., 1978 yılında ilk kez FSH hormonu ile süperovulasyon çalışmasında FSH'ın PMSG'den daha iyi sonuç verdiğini ortaya koymuştur. FSH, genellikle at, domuz ve koyun hipofizinden elde edilmektedir. FSH'nın yarılanma ömrü kısa olduğundan tekrarlanan dozlar halinde, ağırlığa göre değişmekle birlikte, toplam 6.25 ile 50 mg arasında uygulanmaktadır. Pratikte sabah ve akşam olmak üzere azalan dozlar halinde enjekte edilmektedir. FSH dozu ile süperovulasyon sayısı arasında sıkı bir korelasyon vardır. Değişik çalışmalarda değişik FSH dozları denenerek en uygun doz araştırılmıştır. Değişik çalışmalarda FSH dozuna bağlı süperovulasyon yanıtları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Günümüzde yapılan araştırmalar FSH'nın östrüs siklusu içindeki foliküler dalgalanmalara uygun olarak yapılması gerektiğini ortaya koydu (Adams ve ark. 1992; Petyim, 2002). Bilindiği gibi ineklerin önemli bir kısmında östrüs siklusunda 3 foliküler dalgalanma vardır. Eğer iki foliküler dalgalı bir siklus ise ikinci foliküler dalgalanma siklusun 10. gününde ortaya çıkar. Buna karşın eğer siklus üç foliküler dalgalı ise ikinci foliküler dalgalanma 9. günde, üçüncü foliküler dalgalanma ise 16. günde başlar. Foliküler dalgalanmaların başlaması ile FSH yükselmesi arasında sıkı bir ilişkinin varlığı ortaya konmuştur (Adams ve ark. 1992). Her dominant folikül fazının sona ermesinden hemen önce FSH ve LH reseptörlerinde bir azalma olduğu, yine folikülün östrojen üretme gücünün gerilediği belirlenmiştir (Ireland ve Roche 1983). Yine LH salınım sıklığında bir düşme olduğu da ortaya konmuştur (Savio ve ark. 1990). Son zamanlarda yapılan araştırmalar 4 mm'e kadar olan foliküler gelişmenin gonadotropinlerden bağımsız olduğunu, 4 ile 9 mm arasındaki foliküler gelişmeyi FSH'ın, 10 mm ve daha ileri boyutlardaki foliküler gelişmeyi ise LH'ın sağladığı ortaya

konmuştur (Gong ve ark., 1996). Bu bulgular östrüs senkronizasyon programlarında foliküler dalgalanma ve gelişmenin önemini ortaya koymaktadır. Çalışmalarda senkronize edilmemiş ineklerde 2, 3, 4, 5 ve 6. günlerdeki hormon uygulamalarında istenilen sonucun alınamadığı ancak arasında yapılan hormon uygulamalarında en iyi cevabın şekillendiği görülmüştür (Boland ve ark., 1991; Kanagawa ve ark., 1995; Mori, 1999). Bu günlerde (9 ve 14. günler) hormonun daha etkili olmasının nedeni olarak hem olgun bir korpus luteum varlığı ve hem de folliküler dalgalanmanın doğal olarak varolması temeline dayandığı anlaşılmıştır (Petyim, 2002).

Tablo 2. Değişik FSH dozlarıyla elde edilen ovaryum yanıtları

FSH dozu	Ortalama Oosit sayısı	Kaynak
25.0 mg	13.0	Bellows ve ark. (1969)
12.5 mg	4.0	Hafez ve ark. (1965)
12.5 mg	4.0	Bellows ve ark. (1969)
12.5 mg	1.75-1.82	Wildt ve ark. (1975)
12.0 mg	3.4-5.0	Laster (1975)
12.0 mg	1.6	Kosugiyama (1978)
10.0 mg	1.4-2.7	Raynolds ve ark. (1970)
10.0 mg	1.5-2.1	Smith ve ark. (1973)
6.25 mg	2.2	Bellows ve ark. (1969)

(Mori, 1999)

Günümüzde embriyo transferi çalışmalarında kullanılan FSH preparatları yapısında değişen oranlarda LH etkisi de bulundurmaktadır. Ancak son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte saf FSH preparatları (Rekombinant-FSH) ya da minimum LH içeren FSH preparatları hazırlanabilmektedir. Rekombinant FSH ile iyi sonuç alınır olmasına rağmen maliyeti oldukça yüksektir (Mori, 1999). FSH etkinliği üretim aşamasında kullanılan tekniğe göre değişmektedir (Jun ve ark., 2004).

İneklerde tekrarlanan süperovulasyonlarda genellikle elde edilen embriyo sayısı düşmektedir. Bu bakımdan süperovulasyonlar arasında belirli bir zaman dilimi olması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda bu aralığın 40 gün ve daha üzerinde olması

durumunda elde edilen embriyo sayı ve kalitesinin olumsuz yönde etkilenmediği gözlenmiştir (Boland ve ark., 1991; Kanagawa ve ark., 1995; Mori 1999; Hasler, 2003).

Tablo 3. Verici-alıcı senkronizasyonu ve süperovulasyon uygulamaları

Siklus Günleri	VERİCİLER			ALICILAR
Hormonlar	FSH (hMG)	PMSG	PMSG+Anti PMSG	PGF _{2α}
0.gün	PGF _{2α}	PGF _{2α}	PGF _{2α}	PGF _{2α}
8. gün sabah	5 mg (375 İE)	-	-	
8. gün akşam	5 mg (375 İE)	2500 İÜ	2500 İÜ	
9.gün sabah	5 mg (375 İE)	-	-	
9.gün akşam	5 mg (375 İE)	-	-	
10.gün sabah	5 mg (375 İE)	-	-	
10.gün akşam	5 mg (375 İE)	-	-	
11.gün sabah	5 mg (375 İE) +PGF _{2α}	PGF _{2α}	PGF _{2α}	PGF _{2α}
11.gün akşam	5 mg (375 İE)	-	-	
13.gün sabah	ST	ST	ST	
13.gün akşam	ST + HCG	ST + HCG	ST + HCG	
14.gün sabah	ST	ST	ST	
19.gün	Yıkama	Yıkama	Yıkama	

ST: Sun'i tohumlama, İE: İnternational equivalent, (İleri, 2002)

Gebe kısrak serum gonadotropini kullanımı

Gebe Kısrak Serum Gonadotropini (PMSG) at koriyonik gonadotropini (eCG) olarak ta anılmaktadır. PMSG, gebeliğin 40 ve 150. günleri arasında kısraklarda endometrial kapları oluşturan özel trophoblast hücrelerinden salınır. PMSG kanda 60-80. günlerde en yüksek düzeye ulaşır ve 120. günden sonra giderek azalarak 150. günden sonra tamamen kaybolur. PMSG, FSH'tan daha ucuz olması, kolay temin edilebilmesi ve tek doz uygulaması bakımından tercih edilmektedir. PMSG'nin dezavantajları arasında ise elde edilen embriyo sayısında ve kalitesinde bir örneklilik olmaması ve tekrarlanan uygulamalardan sonra immunolojik yanıt oluşumuna önderlik etmesi sayılmaktadır (Yılmaz, 1999). Yarılanma ömrü uzun olduğundan tek doz olarak

uygulanması yeterli olan PMSG, ineklerde, 2000 IU ile 4000 IU arasında değişen miktarlarda kullanılır (İleri, 2002).

PMSG'nin yarılanma ömrünün uzun olduğu ve süperovulasyondan sonra bile ovaryumda büyük folikül varlığına önderlik ettiği ve bu foliküllerin salgıladığı östrojenin, embriyo kalitesini ve sayısını olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir (Petyim, 2002; Greve ve Callesen, 2005). PMSG'nin yapısal özelliğinden kaynaklanan bu olumsuz durumları önlemek amacıyla anti-PMSG kullanımı gündeme getirilmiştir (Kanagawa ve ark., 1995; Mori, 1999; İleri, 2002).

Anti-PMSG, hindi, tavşan, koyun ve keçi gibi hayvanlardan elde edilebilmekte ve PMSG rezidülerinin serumdaki varlığının ortadan kaldırılması amacıyla kullanılmaktadır. Süperovulasyon için PMSG kullanılan ineklerde residüel PMSG transfer edilebilir embriyoların miktarını olumsuz olarak etkilemektedir. Bu nedenle PMSG uygulanan ineklerde residüel PMSG'yi nötralize etmek amacıyla östrüs başlangıcından 18-24 saat sonra anti-PMSG verilebilir. Ovulasyon öncesi LH yükselmesinden çok kısa süre sonra anti-PMSG verilerek ovulasyon ve transfer edilebilir embriyo sayısında artış sağlanmaktadır. Ayrıca anti-PMSG uygulamaları ile büyük follikül ve kist rastlantıları da önemli ölçüde azalmaktadır. Araştırmalar anti-PMSG kullanımının olumlu sonuçlar verdiği yönündedir (Ikemoto ve ark., 1964).

İnsan menopozal gonadotropini kullanımı

İnsan menopozal gonadotropini menopoza (hMG) girmiş kadınların idrarından elde edilmektedir. Dişinin menopoza girmesinden sonra hormonlar arasında var olan negatif feedback mekanizması ortadan kalmaktadır. Bu çerçevede diş menopoza girdikten sonra FSH hormonunun hedef dokusu olan folikül tükendiğinden dişide foliküler gelişme olamamakta dolayısı ile östrojen artmamakta ve FSH baskılanmamaktadır (Reeves,1992). Bu durumun bir sonucu olarak kandaki FSH yükselmekte ve fazlası idrarla dışarı atılmaktadır (İleri, 2002). Normal kadınlarla menopoza girmiş kadınlar arasında idrardan atılan FSH miktarı bakımından 4-10 kat fark olduğu ortaya konmuştur (Yılmaz, 1999). Temel etkisi FSH karakterinde olan hMG ile yapılan süperovulasyon çalışmalarında FSH veya PMSG'ye benzer sonuçlar

alınabilmektedir. Sugano ve Shinogi (2002) İnsan Menopasal Gonadotropinini PGF2 α ile senkronize edilen ineklerde süperovulasyon ve embriyo transfer çalışmasında bölünmüş dozlar şeklinde başarıyla kullandıklarını bildirmektedir. HMG'nin FSH'a benzer şekilde kullanıldığı bildirildi (İleri, 2002).

Ovulasyonun uyarılması

Luteinleştirici hormon

Luteinleştirici hormon (LH) dişilerde foliküllerin olgunlaşması ve ovulasyonunda rol oynamaktadır. İneklerde normal olarak LH pikinden 24-30 saat sonra ovulasyon gerçekleşir. (Callesen ve ark., 1986).

Kimi araştırmacılar, gerek hCG ve gerekse LH ile ovulasyonu uyarmanın embriyo sayısı ve kalitesini artırdığını bildirmişler (Takahashi ve Kanagawa, 1984) ise de, günümüzde artık kullanımı terk edilmiştir. Östrüs senkronizasyonundan sonra ön hipofizden yeterli düzeyde endojen LH salındığı belirlenmiştir (Mori, 1999).

İnsan korionik gonadotropini

İnsan korionik gonadotropini (hCG)'nin LH etkisi baskın, FSH benzeri etkisi ise daha azdır. Folliküllerin gelişmesine ve ovulasyona katkıda bulunur. Menstruel korpus luteumun gebelik korpus luteumuna dönüşmesini ve devamlılığını destekler. İneklerde yapılan süperovulasyondan sonra 24-48 saat hatta daha geniş bir zaman aralığına yayılan ovulasyonları toplulaştırmak için östrüsün başlangıcında 2500-5000 IU hCG'nin intravenöz enjeksiyonu önerilmektedir (Tekeli, 1994).

Embriyo transferinde kullanılan diğer hormonlar

Gonadotropin salınım hormonu

Gonadotropin salınım hormonu (GnRH)'in süperovulasyonu uyarmak amacıyla kullanımına rastlanmamaktadır. Daha çok GnRH'in ovulasyonu uyarmak amacıyla

kullanılabileceği belirtilmektedir (Tekeli, 1994). GnRH ovaryumda bulunan antrumlu foliküller üzerine etkili olmaktadır. Ancak gerek duyulmadığından kullanımı yaygın değildir. Tekeli (1994), vericilerde kızgınlık belirtilerinin zayıf olduğu durumlarda GnRH enjeksiyonlarının embriyo sayısı ve kalitesinin artırılması açısından faydalı olduğunu belirtmektedir.

Östradiol 17-β

Östrüs belirtilerini güçlendirmek amacıyla 10mg östradiol 17-β'nın beklenen östrüsten bir gün önce i.m. olarak verildiği bildirildi (Alaçam, 1994).

Gestagenlerin (doğal/sentetik progesteron) kullanımı

Embriyo nakil çalışmalarında, Progesteron (P4) hormonu, senkronizasyon amacına ek olarak süperovulasyon aralıklarını kısaltmak ve daha kaliteli embriyo eldesi gibi özel kullanım alanları da bulunmaktadır. İneklerde östrüs ve oosit kalitesinin bir kızgınlıktan önceki süreçte kanda progesteron seviyelerinin yüksek, östrojen seviyelerinin düşük olmasına bağlı olduğu ortaya konmuştur. Progesteron ile yapılan senkronizasyona eşlik eden bir süperovulasyon uygulamasından daha fazla sayıda kaliteli embriyo elde edilebilir. PGF2α ile yapılan senkronizasyon ve eşliğinde süperovulasyon çalışmaları ile peşpeşe yapılacak iki uygulamanın en az süresinin 65 gün veya daha fazlası olması zorunluyken bu süre progestagen kullanımı ile 28 güne kadar düşürülebilmektedir (Peixoto ve ark., 2004).

Bu amaçla progesteron, progesteron salınımı yapan implantlar şeklinde kullanıma sunulmaktadır. Bu implantlara örnek olarak, Progesterone Releasing Intravaginal Device (PRID), Controlled Internal Drug-Release (Eazi-Breed CIDR), Synchro-Mate ve Crestar implantı verilebilir.

2.4.4. Embriyonun eldesi ve değeriendirilmesi

Uterus yıkaması

Cerrahi yöntemler dışındaki embriyo elde etme yöntemlerinin geliştirilmesinden sonra operatif yöntemlere duyulan ilginin hızla azaldığı bildirilmektedir. Uterus yıkaması ile embriyo eldesi 1982'ten bu yana sığırlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hunter, 1982). Embriyo transfer alanında çalışan birçok araştırmacı, iki ya da üç kanala sahip ve uç kısmında şişirilebilen balon sistemi olan 'Foley' kateterlerini sıklıkla kullanmaktadır (Hasler, 2004).

Uterusu yıkama işleminin kızgınlıkların başlamasından sonraki 6-8 gün arasında yapılabileceğini bildiren bir çok literatür vardır (Donaldson,1986; Siedel ve Siedel, 1991; Sartori ve ark., 2004; Valencia ve ark., 2005). Embriyo taşınması üzerine yapılan araştırmalar embriyoların % 56'sının ovulasyondan 48-72 saat sonra uterusu ulaştığını (Moore, 1975), 6-7 günde ise embriyoların % 92'sinin uterusu olduğu ve halen embriyoların % 8'inin ovidukt kanalı içinde olduğu bildirilmektedir (Newcomb ve ark., 1976; Valencia ve ark., 2005).

Embriyo eldesi için uterus yıkama işleminin kızgınlıkların başlamasından 4 gün kadar kısa bir aralıkta da yapılabildiği ancak bu dönemde embriyo sayısının düştüğü, buna ek olarak yıkama işleminin 9-14 günlerine bırakılması durumunda ise embriyonun hatching aşamasını geride bıraktığından manipölasyonlara karşı daha hassas olduğu ve bu dönemde embriyoların tespitinin de zorlaştığı bildirilmektedir (Siedel ve Siedel, 1991).

Ayrıca embryo eldesi amacı ile uterusun belirli aralıklarla iki kez yıkanmasının daha fazla embriyo elde edilmesi bakımından yararlı olduğu da bildirilmektedir(Castro Neto ve ark., 2005).

Embriyo eldesi amacıyla yıkama medyumlarının uterusu aktarılmasında genellikle yer çekiminden yararlanılmaktadır (Castro Neto ve ark., 2005). Literatürler embriyo eldesinde kornu ya da uterus yıkamasından birinin tercih edilebileceğini

belirtmektedir (Sugie, 1965; Castro ve ark., 2005). Uterusun yıkanmasında, Foley kateterinin baloncuğu hemen serviksin önünde konumlandırılarak istenen basınç için hava ile doldurularak sabitlenmesi sağlanmaktadır. Foley kateterinin uterusu tespitinden sonra, uterusu verilen medyumun eşit dağılımı ile korpus ve kornuların eş zamanlı yıkanması sağlanmaktadır (Sugie, 1965; Hafez, 1987c).

Kornuların yıkanması ile embriyo eldesinde, yıkama kateteri, kornu ortasına kadar ilerletilerek baloncuğa verilen hava ile tespitinden sonra kornuya verilen medyumun geri alınması şeklinde gerçekleştirilmektedir. Yıkama işlemine sağ kornudan başlanarak her iki kornuya ayrı ayrı uygulanmaktadır (Hafez, 1987c; Tekeli, 1994).

Uterus yıkaması ve embriyo eldesi açısından her iki yöntemin de oldukça başarılı olduğu belirtildi (Hasler, 2004). Kimi araştırmacılar da medyumun uterusu dolmasında yerçekimini kullanmadığını bunun yerine küçük miktarlardaki medyumun enjektör yardımı ile uterus içine verip geri alarak başarılı sonuçlar aldıklarını bildirmektedir (Dawson, 2000).

Yaygın olarak kullanılan Foley kateterleri kauçuk ya da lateksden imal edilmektedir. Son yıllarda sığırlardan uterus yıkaması ile embriyo eldesinde kullanılmak üzere silikon kateterler de üretilmektedir. Bu tip silikon kateterlerin otoklavda steril edilmesi, merkezi ve çok kanallı yıkama portlarına sahip olması gibi nedeniyle sıkça tercih edilmektedir (Hasler, 2004).

İlk embriyo çalışmalarında embriyoların yıkanması, değerlendirilmesi ve depolanmasında, serum eklenen fosfat buffer tuzu (PBS) gibi medyumlar kullanılırken, günümüzde bir çok üretici yöntemin etkinliğini artırmak amacıyla, kompleks medyumlar üretmektedirler (Hasler, 2004).

Embriyonun değerdendirilmesi

Embriyonun değerdendirilmesi, embriyonun gelişim aşamaları ve embriyo kalitesini belirlemek üzere yapılmaktadır. Uluslararası Embriyo Nakil Kurumu embriyo değerdendirmesinde kullanılmak üzere referans ölçütler ortaya koymakta ve bu alanda çalışanlar için belirli aralıklarla rehberler yayınlamaktadır (Hasler, 2004; Siedel ve Siedel, 1991).

Embriyonun canlılık ve kalitesinin belirlenmesinde kimi çalışmalar embriyo metabolizmasını kriter olarak kullanmasına karşın halen bu amaçla yaygın olarak kullanılan yegane yöntem mikroskop aracılığı ile morfolojik muayenedir. Ancak morfolojik muayene bazen embriyo canlılık ve kalitesini belirlemede yetersiz kalabilmektedir (Hasler, 2001).

Embriyo çalışmalarında başarı, elde edilen embriyo sayısı ve gebelikle sonuçlanan nakil oranı şeklinde ölçülmektedir (Seidel ve Eldsen, 1989).

Embriyoların bulunması ve değerdendirilmesi stereo mikroskop altında yapılmaktadır. Embriyoların kolayca incelenmesi için genellikle 200 büyütme yeterli olmaktadır. İnvert mikroskopların stereo mikroskoplara göre daha uygun olduğu belirtilmektedir. Bu işlem yıkama medyumunda tespit edilen embriyoların özel pipetler yardımı ile birkaç kez embriyo işleme medyumuna (holding media) aktararak yıkanması ve değerdendirmesi ile yapılmaktadır. Değerdendirme işleminde, embriyo nakledilebilirliğini belirlemek için embriyo morfolojisinin sayısal kriterlerle değerdendirilmesi de yapılabilmektedir (Hafez, 1987c; Siedel ve Siedel, 1991; İleri, 2002).

Embriyo değerdendirmesinde kullanılan temel kriterler

- Embriyonun düzgün bir şekle sahip olması,
- Blastomerlerin kompaktlığı
- Hücre boyutlarındaki farklılıklar
- Sitoplazmanın rengi ve yapısı

- Embriyonun dış çapı
- Embriyo morfolojisinin bozulması
- Zona pellusidanın düzgünlüğü
- Vezikül varlığı olarak sıralanmaktadır.

Yukarıda sayılan subjektif kriterler kullanılarak embriyolar

- Mükemmel ya da iyi olanlar -----1. sınıf
- Nakledilebilir olanlar -----2. sınıf
- Nakledilemez olanlar -----3. sınıf
- Ölü ve dejenere olanlar ise ----- 4. sınıf olarak değerlendirmektedir.

Embriyolar gelişim dönemlerine göre de sınıflandırılabilir. Gelişim dönemlerine göre yapılan sınıflandırmada embriyonun kalitesi dikkate alınmamakta ve sadece embriyonun hangi gelişim aşamasında olduğunu belirlenmesine çalışılmaktadır (Betteridge, 1977; Lindner ve Wright 1983).

Embriyonun gelişim aşamaları

- Fertilize olmayanlar ----- 1. dönem,
- İki-12 hücreleri olanlar ----- 2. dönem,
- Erken morula döneminde olanlar ----- 3. dönem,
- Morula dönemine ulaşanlar ----- 4. dönem,
- Erken blastosit aşamasında olanlar ----- 5. dönem,
- Blastosit aşamasında olanlar ----- 6. dönem,
- Ekspanded (genişlemiş zona)----- 7. dönem,
- Hatched blastosit olanlar ----- 8. dönem,
- Genişlemiş blastosit ve hatched olanların ise --- 9. dönem olarak tanımlanmaktadır (Betteridge, 1977; Siedel ve Siedel, 1991).

Değişik dönemlerdeki kaliteli embriyoların uygun zamanda alıcılara nakledilmesinden sonra elde edilen gebelik oranları arasında önemli farkların olmadığı bildirilmektedir. Embriyo dondurma çalışmaları için 4., 5. ve 6. gelişim dönemindeki embriyoların dondurma ve çözme işleminden sonra en yüksek canlılık oranlarını yakaladığı bildirilmektedir. Embriyonun dondurulması ve çözülmesinden sonra en yüksek gebelik oranlarının elde edilmesi açısından embriyo kalitesi de son derece önemlidir. Sadece birinci sınıf embriyolar dondurularak saklanmaktadır. İkinci sınıf embriyoların dondurulması ve naklinden sonra elde edilen gebelik oranları hızla düşmektedir. Bir çalışmanın embriyo değerlendirme sonuçlarına göre, embriyoların % 58'inin nakledilebilir, % 31'inin döllelenmemiş ve % 11'inin de dejenere olduğu bildirilmektedir (Anonim 6).

2.4.5. Embriyonun nakli

Natif embriyo kullanımı ve nakli

Natif embriyonun doğal kızgınlık gösteren inek ya da düvelere nakli yapılacaksa birkaç yüz başlık bir sürü içinden uygun dönemde kızgınlık gösterenler belirlenerek nakil işlemi gerçekleştirilebilir (Tekeli, 1994). Günlük olarak ineklerin %5'inin kızgınlık gösterdiği ve taşıyıcı seçimindeki kriterler de göz önüne alınırsa bu uygulamanın oldukça zor olacağı ortadadır. Bu nedenle daha çok uygun taşıyıcı adaylarının senkronizasyonu yoluna gidilmektedir. Senkronizasyon işleminde alıcı verici arasındaki zaman farkının ± 24 saat olması istenmektedir. Verici-taşıyıcı arasındaki zaman farkının ± 24 saatten fazla olması durumunda embriyo implantasyonunda sorunlar yaşandığı ve gebelik oranının düştüğü bildirilmektedir (Hafez, 1987c).

Operatif yolla embriyo nakli

Embriyo naklinde operatif yöntem giderek daha az uygulama alanı bulmakta ve çoğunlukla deneysel çalışmalarda tercih edilmektedir. Özellikle ineklerde operatif embriyo nakli tamamen terk edilmiştir (Hafez, 1987c; Tekeli, 1994; İleri, 2002).

Bu yöntemle embriyolar, operasyonla median hat ya da açlık çukurluğundan açılan ineğin, ovaryumunda bulunan korpus luteumla ipsilateral kornunun uç kısmına, pastör pipeti aracılığı ile bırakılarak nakledilmektedir. Bu işlem sırasında embriyoların uterus lumenine bırakılmasına özellikle dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir (Tekeli, 1994; İleri, 2002).

Transservikal yöntemle embriyo nakli

Bu yöntem ilk olarak non-operatif embriyo nakli tanımlamasıyla Sugie (1965) tarafından geliştirilmiş olsa da, bu yöntemi kullanarak buzağı elde edilen ilk başarılı transfer Mutter ve ark., (1964) tarafından yapıldı. Transservikal embriyo nakli, günümüzde uygulanan rekto-vajinal sun'i tohumlama tekniğinde olduğu gibi serviksin geçilerek embriyonun korpus luteumla ipsilatereal kornu uç kısmına bırakılması şeklinde uygulanmaktadır (Sreenan, 1978; Hafez, (1987c). Bu yöntemde embriyo nakil pistolesinin korpus ve kornu uteri iç mukozasında perforasyona neden olmamasına özen gösterilmesi gerektiği bildirilmektedir (Hafez, 1987c). Oluşabilecek travmaların önlenmesi amacıyla ineğe epidural anestezi yapılmasının faydalı olduğu bildirilmiştir (Tekeli, 1994).

Dondurulmuş embriyo kullanımı ve nakli

Fare embriyosunun 1972 yılında başarılı bir şekilde Whittingham ve arkadaşları tarafından dondurulmasından bir yıl sonra Wilmot ve Rowson (1973) dondurdıkları sığır embriyosundan gebelik elde ettiklerini bildirdi. Yapılan bu çalışmalarda kriyoprotektan olarak dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldı ve embriyoların dondurulmasında yavaş soğutma (0.2°C/dk) uygulandı. Bu yöntem daha sonraki yıllarda yaygınlık kazandı (Whittingham ve ark., 1972).

Embriyonun dondurulmasında değişik metodlar

Embriyoların dondurularak saklanması uygulanan yöntemler, geleneksel yavaş dondurma (Slow Freezing) (Lane ve ark., 1998; Martinez ve Matkovic, 1998), hızlı dondurma (Rapid Freezing) (Nowshari ve Brem, 2000) ve vitrifikasyon

(Ultrarapid Freezing) (Palasz ve Mapletoft 1996; Vajta ve ark., 1998; Uechi ve ark.,1999) olarak üç grupta incelemek mümkündür. Esasen bu üç yöntem temelde embriyonun dondurulması sırasında hangi kriyoprotektan maddenin kullanıldığına göre ve dondurma sırasında uygulanan soğutma hızına göre değişmektedir.

Geleneksel embriyo dondurma yöntemi olan yavaş dondurma işleminde temel kriyoprotektan madde gliseroldür.

Embriyonun hızlı ve vitrifikasyonla dondurulması sırasında kriyoprotektif madde olarak etilen glikol ve DMSO kullanılmaktadır. Embriyonun hızlı dondurulmasında kriyoprotektan maddenin çözme işleminden sonra inaktive edilmesi amacıyla, embriyoyu taşıyan medyumla sukroz içeren medyumlar özel olarak payet içine dizilmektedir. Çözme işleminden sonra payet içinde özel olarak dizilen medyumların karışması sağlanarak kriyoprotektan madde inaktivasyonu gerçekleştirilmektedir. Medyumların karışmasından sonra yoğunluk farkından dolayı embriyo içindeki kriyoprotektan maddeler embriyo dışına çıkar ve böylece embriyo nakil için hazır hale gelir. Bu şekilde kriyoprotektif maddenin uzaklaştırılması ve nakli direkt nakil olarak isimlendirilmektedir.

Kriyoprotektif etkinin oluşması

Biyolojik dokuların, örneğin embriyo gibi, düşük sıcaklıklarda dondurulmasında dokuları donma etkisinden korumak amacıyla medyumlara katılan maddelere kriyoprotektan maddeler denmektedir (Palasz ve Mapletoft, 1996). Kriyoprotektan maddeler hücre içine nüfuz edip edemediklerine göre iki şekilde ele alınabilir. Hücre içine girebilen kriyoprotektanlardan başlıcaları, dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol (EG), 1.2 propanediol, 2.3 bütanediol, propilen glikol ve diğer bazı alkoller olarak bilinmektedir (Hafez 1987b; Agca, 1994; Palasz ve Mapletoft, 1996).

Ozmotik basınç farkından dolayı, embriyo içine nüfuz eden bu maddeler hücre içindeki suya tutunur ve su ile bileşikler oluşturarak embriyoda oluşacak buz kristallerinin küçük ve bir örnek olmasını sağlamaktadır. Oldukça küçük ve bir örnek olan buz kristalleri embriyoya en az düzeyde zarar vermektedir (Sağırkaya ve Bağış,

2003). Kriyoprotektanların bu etkileri sayesinde embriyo gibi canlı dokular başarılı bir şekilde dondurulabilmektedir. Kriyoprotektan maddeler dondurulacak canlı doku medyumlarına 0 ila -20°C arası sıcaklıklarda adım adım eklenmektedir (Maurer, 1978). Embriyo ve medyum sıcaklığı -7°C'ye ulaştığında donma ve kristal oluşumu başlamaktadır. Embriyonun sıvı nitrojene daldırılmadan önce 0.3 °C/ dk'lık bir soğutma hızı ile -33 °C'ye kadar soğutulması gerektiği belirtilmektedir (Hafez, 1987b). Başarılı bir embriyo dondurma işlemi için, sıcaklığın yavaş yavaş düşürülmesi ve embriyo çözme işleminden (25-37 °C'lik su banyosunda 15-20 sn) sonra kriyoprotektan maddelerin hızla uzaklaştırılması gerektiği bildirilmektedir (Hafez, 1987b).

Embriyo içine giremeyen kriyoprotektanlar ise, hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı (glikoz, sükroz, trehaloz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı şekerler) ve hücre içine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı (polivinil alkol; PVA, polivinil piroolidon (PVP) ve diğer bazı polimerler olmak üzere ikiye ayrılabilir (Agca, 1994; Palasz ve Mapletoft, 1996; Bağış ve ark., 2002; Sağırkaya ve Bağış, 2003).

Serumdan kaynaklanabilecek kontaminasyonları önlemek amacıyla, günümüzde, genellikle polyvinyl piroolidon (PVP) ya da polivinil alkol (PVA) gibi bazı maddeler serum yerine kullanılabilir (Palasz ve Mapletoft, 1996; Dinnyes ve ark., 2000)

Bunlardan başka, albumin (Pugh ve ark., 1998) fikol (Begin ve ark., 2003) ve antifriz protein (AFP) (Wang, 2000) gibi bazı proteinler de hücre içerisine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar içerisinde yer almaktadırlar (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

Embriyonun dondurulmasında gliserol kullanımı

Embriyo-toksik bir madde olan gliserolün, çözme işleminden sonra uzaklaştırılması gerekmektedir (Palasz ve Mapletoft, 1996; Palasz ve ark., 1997). Bu nedenle gliserol ile dondurulmuş embriyoların kullanımı sırasında, embriyo yıkama işlemleri nedeniyle, laboratuvar şartlarına gereksinim duyulmaktadır. Bu çerçevede embriyo, sukroz içeren medyumla 4 adımda toplam 15- 20 dk süre ile yıkanarak (Rehidrasyon), nakil için uygun hale getirilebilmektedir.

Embriyonun gliserol dışında etilen glikol ya da DMSO ile dondurma ve çözme işlemleri basitleştirildi (Voeklel, 1992; Voeklel ve Hu, 1992; Anonim3).

Embriyonun dondurulmasında etilen glikol kullanımı

Son yıllarda gliserol kullanımı ile yaşanan kimi sorunları ortadan kaldırmak amacıyla kriyoprotektif madde olarak etilen glikol kullanımı yaygınlaştı. Etilen glikolün embriyo üzerine toksik etkileri oldukça düşüktür. Bu nedenle embriyonun çözülmesi ve nakledilmesi sırasında embriyo için yeterli güvenlik marjına sahiptir. Etilen glikol ile dondurulan embriyonun çözülerek aynı payet içinde doğrudan nakli direkt nakil yöntemi olarak tanımlanmaktadır (Dochi ve ark., 1998, Pugh ve ark., 2000). Bu yöntemde, özel dizilimdeki etilen glikollü medyum ve sükrözlu medyumların (çoğunlukla 0.5 ile 1 M sükröz) karışması sağlanır.

Direkt transfer yöntemiyle, sun'i tohumlama becerisi olan kişilerin kısa bir eğitimden sonra embriyo transferi yapabileceği ifade edilmektedir (Hasler, 2003; Voeklel ve Hu, 1992).

Leibo ve Mapletoft (1998), tarafından etilen glikol ile dondurulan embriyoların daha düşük oranda gebelikle sonuçlandığı kanısının yanlış olduğu gösterilmiştir. Bu konuda benzer sonuçlar, Hinshaw ve ark. (Anonim3) tarafından da bildirilmiştir. Bu araştırmacılar, etilen glikol ile dondurulan ve direkt transfer yöntemiyle nakledilen 3047 adet embriyo naklinden gliserol ile dondurulmuş embriyo nakilleriyle benzer gebelik oranları elde ettiklerini bildirmektedirler.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Canlı gereçler

Dişi materyal

Çalışmanın natif embriyo eldesi ve naklini kapsayan kısmı, Bitlis-Tatvan ilçesinde faaliyet gösteren ticari bir çiftlikte gerçekleştirildi. Ocak-Şubat aylarında gerçekleştirilen çalışma sırasında çevre ısısı geceleri -12 ile 0, gündüzleri ise -5 ile 3°C aralığında ölçüldü.

Çalışmada hayvan materyali olarak 3–6 yaşlı, 4 adet Holstein inek ile sırasıyla 18-21 aylık biri Simental diğeri Holstein olan 2 adet düve verici, 3-7 yaşlı 25 adet Holstein inek ise taşıyıcı olmak üzere, toplam 31 adet hayvan kullanıldı. Verici ve taşıyıcılar vitamin ve mineral takviyesi yapılmış mısır silajı ve kuru ot ile beslendi. Hayvanlara temiz su verildi.

Tez çalışmasının dondurulmuş embriyo naklini kapsayan kısmı, 2008 yılı ilkbaharında, Adapazarı–Taraklı ilçesinde faaliyet gösteren ticari bir çiftlikte barındırılan 3-6 yaşlı 9 baş değişik ırktan inek kullanılarak gerçekleştirildi. İnekler mısır silajı, kuru ot samanı, kepek ve hazır yemlerden oluşan rasyon ile beslendi. Çalışma amacıyla ineklerin kızgınlıkları kayıt altına alındı. A, D ve E vitamini takviyesi amacıyla 1 ml’de 500.000 mg A vitamini, 75.000 mg D₃ vitamini ve 50 mg E vitamini içeren Ademin (Sanofi-Dif, Türkiye) preparatından 5 ml kas içi uygulandı.

Dondurulmuş spermanın temini

Vericilerin tohumlanmasında kullanılan 18 payet dondurulmuş sperma işletmenin rutin sun’i tohumlama konteynerinden temin edildi.

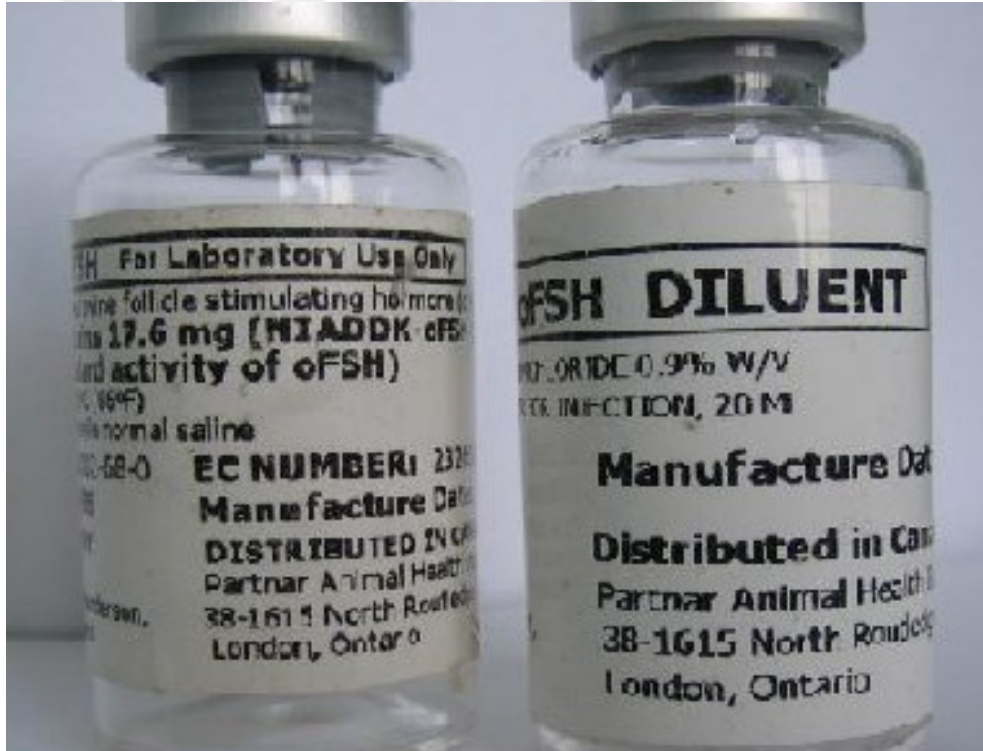
Dondurulmuş embriyoların temini

Çalışmada kullanılan 9 adet dondurulmuş embriyo Bulgaristan'ın "Хасково (Haskovo)" ilinde damızlık düve yetiştiriciliği alanında faaliyet gösteren "Нов Хоризонт (Nov Horizont)" işletmesinden hibe yoluyla temin edildi.

3.1.2. Alet ve malzeme temini

Hormon preparatlarının temini

Verici ve taşıyıcıların senkronizasyonunda kullanılan PGF_{2α} (Dalmazin, Fatro, Italya) çalışmanın gerçekleştirildiği çiftlikten temin edildi.



Şekil 1. Süperovulasyon amacıyla kullanılan FSH hormonu ve sulandırıcısı.

Süperovulasyonda standartlara uygunluğu NIADDK kurumu tarafından kabul edilmiş bir flakonunda 17 mg FSH etkinliğine denk gelen 17.6 mg koyun FSH'u (oFSH) içeren, Ovagen, (ICPbio limited, New Zealand) ithal edilerek kullanıldı.

Ovagen içeriğinde bulunan FSH/LH oranı hakkında kesin bir oran verilmemekle birlikte Ovagen’de düşük oranda LH bulunduğu belirtilmektedir (Anonim 7).

Uterus yıkama ve embriyo işleme medyumlarının temini

Uterusun yıkanmasında kullanıma hazır “ICPbio Emcare™-Complete Flushing Solution” (Kod: CECFS100, ICPbio limited, New Zealand) ticari medyum ithal yoluyla temin edildi. Zwitterionic (dipolar, + ve – iyon yüküyle yapışmayı önleyen) buffer tuzu niteliğinde olan bu medyumun litresinde 5ml bovine serum albumin (BSA) ve 25 mg Kanamycin Sulphate bulunmaktadır. Emcare™-uterus yıkama medyumunun paketi kullanım sırasında sterilitenin bozulmaması için kolaylık sağlayan özel steril bir çıkışa sahipti. Ek olarak, bu medyumun, embriyonun korunması amacıyla düşük endotoksin, yüzeylere yapışmasını önlemek için, köpürmeyi ve yüzey gerilimini azaltıcı enzimler taşıdığı belirtilmektedir. Kullanılan “ICPbio Emcare™-Complete Flushing Solution” medyumunun 18 ay kullanım süresi vardı.



Şekil 2. Uterus yıkama medyumunu (a), embriyo yıkama ve değerlendirme medyumunu (b).

Embriyoların yıkanması, değerlendirilmesi ve transferi için payete yerleştirilmesinde yine kullanıma hazır “ICPbio Emcare™ Holding Solution” (Minipac-

MPHM100) ticari preparat kullanıldı. Bu medyum yapısında % 0.4 bovine serum albumin (BSA) ve 25 mg/L oranında Kanamycin Sulphate içermektedir. Bu ürün, kullanım sırasında steritelinin korunabilmesi için 20 adet 6 ml'lik plastik tüpler halinde sunulmaktadır.

Embriyo transfer tekniğinde kullanılan malzemeler

İki yollu ve “Y” şekilli uterus yıkama sistemi, yıkamada kullanılan hazır medyumlar, filtreler, embriyo toplama kabı, embriyo yıkanması ve değerlendirilmesi kısmında kullanılan medyum, embriyonun aranmasında kullanılan petriler, petriler arasında embriyo aktarmada kullanılan embriyo yakalama aparatı, nakledilecek embriyonun paketlenmesinde kullanılan steril payetler, embriyo nakil pistolesi, nakil pistolesi kılıfı ve nakil pistolesine en dıştan geçirilerek serviksin hemen kaudalinde delinerek geçilen ve böylece hijyenik embriyo transferi sağlayan steril plastik kılıf ve kimi diğer malzemeler set olarak yurt dışından ithal edilerek çalışmada kullanıldı. Yıkama işlemi sırasında kullanılan “Y” şeklindeki yıkama sistemi ve Foley kateterinin iç yüzeyleri teflon kaplıydı.

Çalışmada kullanılan diğer ekipmanlar

Embriyoların aranması ve değerlendirilmesinde kullanılan stereo mikroskop, embriyo görüntülemeye kullanılan invert mikroskop ve vericilerin tohumlanması amacıyla kullanılacak olan dondurulmuş spermanın çözüm sonu motilite kontrollerinde kullanılan seyyar ısıtmalı ışık mikroskobu ve ayrıca invert mikroskop'a adapte edilen Hitachi video kamera, tv kartlı bilgisayar ve kimi diğer sarf malzemeleri, YYÜ. Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

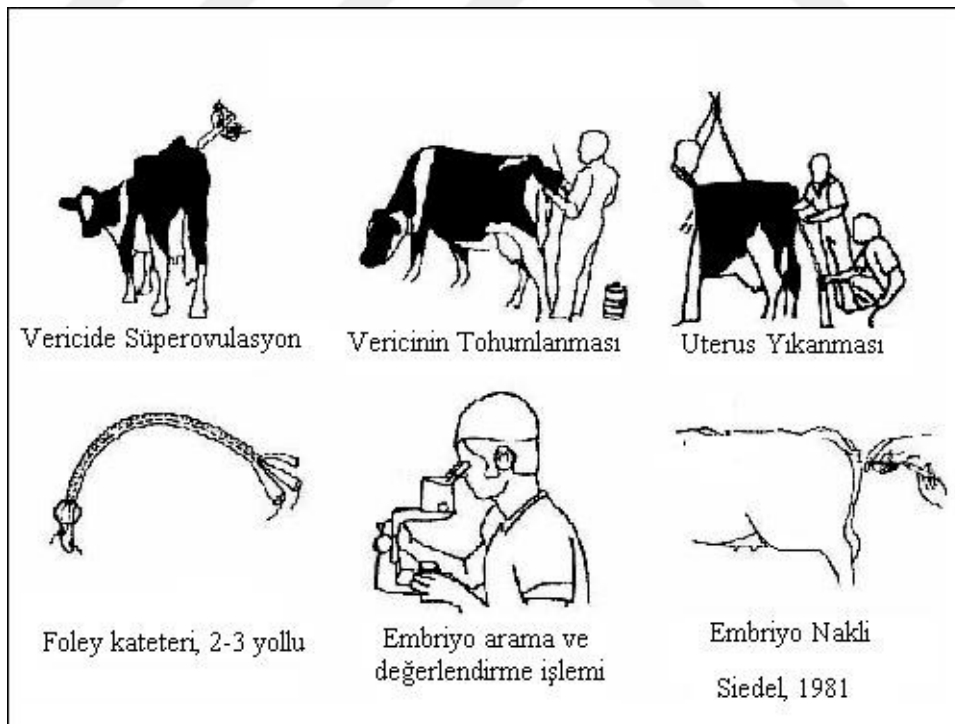
Süperovulasyon, korpus luteum ve gebelik kontrol ve değerlendirmesi gibi çalışmanın değişik aşamalarında kullanılan ultrason cihazı (Agroscan AL, ve 5/7.5 MHZ'lik rektal probu, France) çiftlik imkanlarıyla kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Verici-taşıyıcı senkronizasyonu, kızgınlık gözlemi ve vericilerin tohumlanması

Verici ve taşıyıcı olarak seçilen inek ve düvelerin genital organları ultrason ve rektal muayene ile kontrol edilerek, gebe olmamasına ve genital açıdan sorunsuz ve sikluslarının düzenli olmasına dikkat edilerek çalışmaya dahil edildi. Östrüs sikluslarının düzenini belirlemede, işletme kayıtlarından yararlanıldı.

Embriyo transfer çalışmasında verici ve taşıyıcıların seksüel senkronizasyonu PGF_{2α} ile yapıldı (İleri, 2002; Coleman ve ark., 1987; Dochi ve ark., 1998; Barati ve ark., 2006; Getz ve ark., 2007). Bu amaçla verici ve taşıyıcı olarak seçilen toplam 31 hayvana 11 gün ara ile 2 kez 0.15 mg Kloprestenol (Dalmazin, 2 ml), im olarak uygulandı (Şekil 5).



Şekil 3. Embriyo naklinde temel aşamalar.

Östrüse kadar gerçekleştirilen eylemlerin kronolojik bir sıra içinde kolayca anlaşılmasını sağlamak amacıyla 1. PGF_{2α} uygulaması 0. gün olarak kabul edildi ve senkronizasyon 0. gün (S0.gün) olarak isimlendirildi.

İkinci PGF_{2α} (S11.günde) uygulamasından 36 saat sonra verici ve alıcılarda kızgınlık tespitine başlandı. Kızgınlığı belirlemek amacıyla hayvanlar metal çitler ile sınırlandırılmış 200 m²'lik (20X10) alana çıkarılarak en az 30 dk gözlemlendi. Kızgınlık, aşımı kabul refleksi temel kriter kabul edilerek, sabah (05:30-06:00 saatleri) ve akşam (15:30-16:00 saatleri) olmak üzere günde iki defa gözlemlendi (Şekil 4). Gün içinde iki kez en az 5-10 sn aşımı kabul eden hayvanların kızgın olduğu kabul edildi (Şekil 4). Östrüs gözleminde özellikle vericilere uygun kızgınlık gösteren taşıyıcılar verici bazında çalışma çizelgesine işaretlendi (Dochi ve ark., 1998).



Şekil 4. Verici ve alıcılarda erkeği kabul refleksine göre östrüs tespiti.

Vericilerde tohumlama

Vericilere ilk sun'i tohumlanma östrüsün gözlenmesinden 10 saat sonra yapıldı. Takip eden süreçte 12 saat ara ile 2 kez tohumlanarak sun'i tohumlama işlemi tamamlandı. Sun'i tohumlamada verici başına 3 doz dondurulmuş sperma (Egevet,

Türkiye) kullanıldı. Tohumlama günü daha sonraki eylemlerin kronolojisinde kullanılmak üzere ST0.gün olarak kabul edildi. Çalışmada kullanılan spermanın kalitesi, birer örnek 34°C’de 30 sn süre ile çözülerek, 37 °C’ye ayarlanmış mobil ısıtma sistemi (Cıva derecesi kontrollü) olan basit ışık mikroskobunda, 200x büyütmeyle, çözüm sonu en az %50 motilite standardını sağlama kriterine göre kontrol edildi.

3.2.2. Vericilerde süperovulasyon ve ovaryum cevaplarının belirlenmesi

Vericilerde süperovulasyon

Vericilerde süperovulasyon uygulamasına S8. günü sabah 2.55 mg doz FSH ile başlandı ve 12 saat arayla giderek azalan dozlar şeklinde 2. PGF_{2α} enjeksiyon (S11.gün) günü akşamına kadar devam edildi (Şekil 5).

Ovaryum cevaplarının belirlenmesi

Vericilerde süperovulasyonun uygulamasına oluşan cevap ultrason yardımıyla folikül, korpus luteum ve yıkama işleminden elde edilen embriyo sayısına göre olmak üzere üç farklı yöntemle izlendi. Vericide tespit edilen folikül ve korpus luteum sayısı ile vericinin embriyo verimi karşılaştırıldı.

Süperovulasyon cevaplarının oluşan folikül sayısına göre belirlenmesi

Vericilerde süperovulasyona oluşan cevap ilk olarak ultrason ile ovaryumlarda folikül gözlemi yapılarak belirlendi (Sartori ve ark., 2004; Grasso ve ark., 1989; Singh ve ark., 2004). Bu amaçla aşımı ilk kabulden sonra, vericinin ovaryumları ultrason ile tarandı (Şekil 6). Süperovulasyona oluşan cevabın belirlenmesinde Agrosan AL marka ultrason cihazı ve bu cihaza ait 5 ve 7.5 MHz’lik rektal probları kullanıldı (Şekil 6). Ovaryum üzerinde oluşan folikül ya da diğer oluşumların boyutları ultrason cihazının sağ kısmında 1 cm bölmeli vertikal skala ile kıyaslanarak belirlendi. Ovaryumunda 2 ve daha fazla folikül bulunduran vericilerde süperovulasyon cevabı pozitif olarak kabul edildi (Lopes da Costa ve ark., 2001). Vericilerin süperovulasyon cevabı için yapılan

muayeneler tek seansta tamamlandı. Ultrason ile elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarılarak kullanıldı.

Tarih	Gün	S/A	Vericiler	Alıcılar
25.1.	0	S	-PGF_{2α} 0.15 mg H (6213, 187, 57, 94, 106), S (6124)	PGF_{2α} 0.15 mg H (3, 6, 16, 25, 29, 37, 47, 49, 53, 61, 63, 70, 87, 92, 99, 147, 182, 184, 194, 196, 198, 185, 189, 192, 0987)
		A		
// // // // //				
4.2.	8	S	-FSH 2.55 mg	
		A	-FSH 2.55 mg	
5.2.	9	S	-FSH 2.55 mg	
		A	-FSH 2.55 mg	
6.2.	10	S	-FSH 2.12mg	
		A	-FSH 2.12mg	PGF_{2α} 0.15 mg
7.2.	11	S	-PGF_{2α} 0.15 mg, inekler -FSH 1.27mg	
		A	-PGF_{2α} 0.15 mg, düveler -FSH 1.27mg	
8.2.	12	S		
		A		KG
9.2.	13	S	KG	KG
		A	KG / USFY	KG
10.2.	1	S	KG / ST	KG
		A	KG /ST	KG
11.2.	2	S	KG /ST	KG
		A		KG
// // // // //				
15.2.	6	S	UKLY	UKLY
		A		
16.2.	7	S	Uterus yıkaması	Embriyo nakli
		A	Embriyo değerlendirilmesi	
17.2.	8	S	PGF _{2α} + uterus içi antibiyotik	

Şekil 5. Çalışma planı, H: Holstein, S: Simental, S/A: Sabah/Akşam KG: Kızgınlık Gözlemi, ST: Sun'i Tohumlama, USFY: Ultrason ile süperfolikülasyon yansılama, UKLY: Ultrason ile korpus luteum yansılama.

Süperovulasyon cevaplarının korpus luteum sayısına göre belirlenmesi

Vericilerde süperovulasyon sonrasında meydana gelen korpus luteumlar, uterus yıkamasından bir gün önce (ST6. günde), ultrason yardımıyla görüntülendi (Şekil 6), (Sprecher ve ark., 1989; Pieterse ve ark., 1990; Vyas ve Sahani, 2002). Ovaryumda 2 veya daha fazla korpus luteum bulunması süperovulasyon cevabı için pozitif kabul edildi (Lopes da Costa ve ark., 2001).

Süperovulasyon cevaplarının embriyo sayısı ile belirlenmesi

Vericilerden uterus yıkaması sonunda elde edilen embriyolar kaydedilerek, vericinin süperovulasyona verdiği ovaryal cevabın belirlenmesine çalışıldı (Contreras ve ark., 2008).

Taşıyıcılarda nakil yerinin belirlenmesi amacıyla korpus luteum tespiti

Embriyonun hangi kornuya nakledilmesi gerektiğini belirlemek üzere, nakillerden bir gün önce taşıyıcılar rektal muayenede korpus luteum kontrolüne alındı (Dochi ve ark., 1998). Rektal muayenede tespit edilen korpus luteumla ipsilateral gluteal bölgeye sprey boya uygulandı.

3.2.3. Uterus yıkaması ve embriyo eldesi

Embriyo eldesi, vericilerin ST7. günde transservikal uterus yıkaması işlemiyle gerçekleştirildi (Sugie, 1965; Mutter, 1964). Uterus yıkama amacıyla vericiler, dinlenme yeri olan duraklara çekildi ve uygun biçimde zaptı-rapt altına alındı. Öncelikle, uterusu yıkanacak vericinin kuyruğu bir ip yardımı ile boynuna bağlandı. Vericilerin perineal bölgesi genişçe uygun dezentaktan ile yıkandı ve alkolden geçirildi. Vericilere 5-6 ml %2'lik Lidokain (Jetokain, Adeka, Türkiye) ile alt epidural anestezi uygulandı.



Şekil 6. Ultrason yardımıyla vericilerde süperovulasyon cevaplarının belirlenmesi.

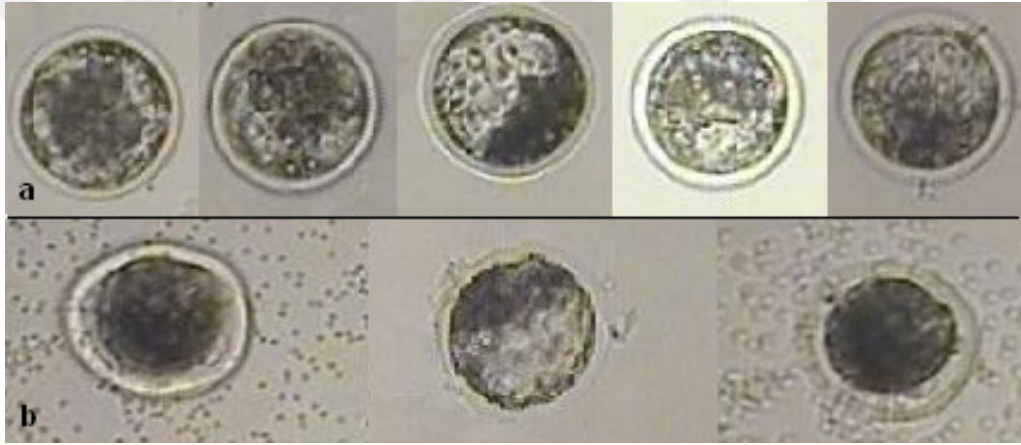
Yıkama medyumunu, yıkama işlemine başlanmadan önce su banyosuna bırakılarak ısıtıldı. Gerekli hazırlıkların tamamlanmasından sonra Foley kateteri mandreniyle birlikte sun'i tohumlama uygulamasına benzer bir şekilde hijyen kurallarına uyularak serviksten geçirildi. Serviksi geçen kateter, kornu ortasına kadar ilerletilerek tespit edildi. Foley kateterinin kornu içinde tespitini sağlamak için rektumdaki el ile balonun gerginliği kontrol edilerek 10-20 ml hava verildi. Kateterin kornu uteriye fikzasyonu son olarak kontrol edildi ve içindeki mandren çekilerek yıkama işlemine başlandı. Her vericide uterus yıkamak amacıyla 1 lt medyum kullanıldı (Hasler, 2004). Medyumun kornu uteriye geçmesi için yer çekiminden yararlanıldı (Castro Neto ve ark., 2005). Foley kateteri "Y" şeklindeki boru (Y shaped tube) sistemine tutturuldu. "Y" şeklindeki boru sisteminin üst ucu yıkama medyumunu içeren plastik şişeye, alt ucu ise toplama kabına monte edildi.

Yıkama medyumunun kornu uteriye geçmesi için toplama kabına giden kanal üzerindeki penset, embriyoların medyumla birlikte toplama kabına geçmesi içinse medyum şişesinden gelen kanal üzerindeki penset kapatıldı ve bu işlemi sırayla yıkama işlemi tamamlanana kadar tekrar edildi (Castro Neto ve ark., 2005). Medyumun kornu uteriye geçmesini sağlamak için medyum şişesi bir yardımcı tarafından 180 cm yükseklikte tutuldu. Bu işlem her kornu için birkaç kez tekrar edilerek ve her kornu yıkanarak verici ineğin uterus yıkama işlemi tamamlandı. Uterus yıkaması yapılan her vericide bu işlem benzer şekilde uygulandı. Yıkama işlemi süresince embriyoları ısı değişimlerinden korumak amacıyla toplama kabı 35°C'lik ben marey içinde tutuldu. Yıkama işleminin tamamlanmasından sonra Foley kateterinin baloncukundaki hava boşaltıldı ve kateter dışarı alınarak işlem tamamlandı.

Embriyo yıkama işleminden sonra, verici ineklerde olası çoklu gebeliği sonlandırmak amacı ile 12 saat arayla 2 kez PGF_{2α} enjeksiyonu yapıldı (Sartori ve ark., 2004). Olası uterus enfeksiyonlarını önlemek amacıyla uterus içi antibiyotik solusyonu uygulandı.

3.2.4. Embriyoların bulunması ve değerlendirilmesi

Yıkantıyı içeren kap hızla saha laboratuvarına taşınarak filtrelendi. Filtre özel pipeti ile yıkanan embriyolar, petriye alındı. Petride embriyo arama işlemini kolaylaştırmak için petrinin altı kırmızı cam kalemyle, bir mikroskop bakışı alanı olacak şekilde (yaklaşık 1 cm²) karelere bölündü. Altan aydınlatmalı stereo mikroskopta yapılan tarama işlemiyle bulunan embriyo, içinde Emcare holding solusyonu bulunduran yeni petriye alınarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işleminden sonra embriyolar, embriyo kalite açısından değerlendirildi (Şekil 7), (Betteridge, 1977; Lindner ve Wright 1983; Hafez, 1987c).



Şekil 7. Nakledilebilir (a) ve nakledilemez (b) embriyo örnekleri.

Bu işlem sırasında Japon Livestock Teknoloji Kurumu'nca yayınlanmış sığırlarda embriyo transferi el kitabının embriyo değerlendirilmesi bölümünde yer alan resimler ve Betteridge (1977)'den alınmış resimler de referans alınarak subjektif bir değerlendirmeye tabi tutuldu (Şekil 10). Değerlendirme sonunda embriyolar transfer edilebilir ve transfer edilemez şeklinde sınıflandırıldı.

Mikroskopta yapılan incelemede, küresel görünümlü zona pellusidaya sahip olanlar, boyut, renk ve içerdiği doku bakımından uniform olanlar, yapısında hiç vezikül bulundurmayan ya da birkaç vezikül bulunduran embriyoların nakledilebilir nitelikte olduğu kabul edildi.

Genel görünüm olarak küreselliğini buzulmuş, zona pellusidasında uniformluğu kaybetmiş, fragmentleşmiş ya da kimi alanlarda deformasyona uğramış olanlar, yapısından oldukça çok sayıda yuvarlak görünümlü blastomerler içermesine karşın, dejenere olmuş hücreleri fazla olanlar, içerdiği hücrelerin boyutlarında farklılıklar gözlenenler, yapısında çok sayıda vezikül barındıran embriyoların ise nakle uygun olmadığına karar verildi (Şekil 7).

Embriyoların görüntülenmesi

Stereo mikroskopta tespit edilen embriyolar bir invert mikroskopta görüntülenerek video kamerası üzerinden bilgisayar ortamına aktarıldı. Embriyo görüntülerinde, görüntü kalitesinin bozulmaması için elde edilen görüntülerde yeniden boyutlandırma yapılmamasına dikkat edildi.

Embriyonun nakil payetinde konumlandırılması

Embriyo değerlendirilmesinde nakile uygun görülen embriyolar nakil payetine aktarıldı. Bu amaçla uzunluğu 13 cm olan 0.25 ml'lik, steril, ve saydam nitelikte olan embriyo nakil payetleri kullanıldı. Nakilde kullanılacak olan natif embriyolar, embriyo nakil payetine sırasıyla bir miktar medyum, hava, medyum+embriyo, hava ve medyum olacak şekilde stereo mikroskop altında yerleştirilmiştir (Şekil 8).

Tıkaç	M	H	●E+M	H	M	
-------	---	---	------	---	---	--

Şekil 8. Payet içinde embriyonun konumlandırılması, E: Embriyo, H: Hava, M: Medyum.

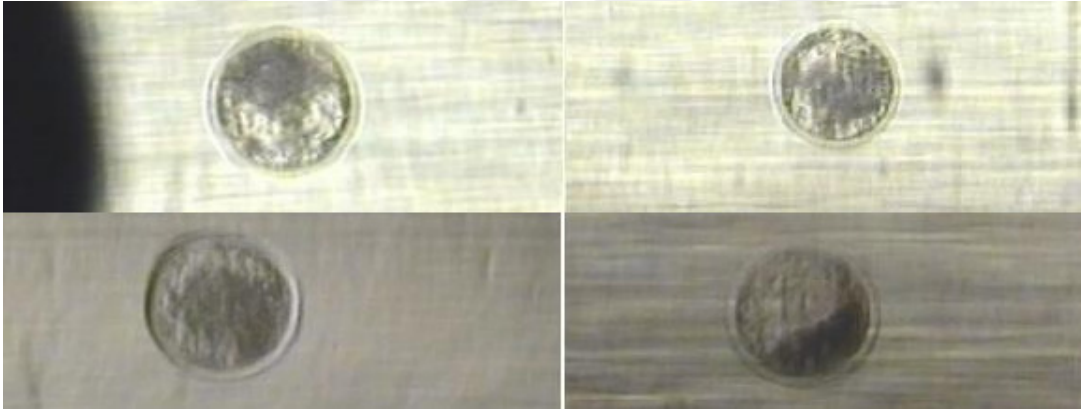
Bu işlem payet küçük bir vakum pompasına takılarak manuel olarak gerçekleştirildi. Embriyonun nakil payetine aktarılması işleminin başarılı olup olmadığı, payet içindeki embriyonun stereo mikroskop altında görüntülenmesi ile kontrol edildi (Şekil 9). Payet içindeki embriyonun üstten görüntü alan stereo mikroskop ile görüntülenmesi sırasında, yer çekimi nedeniyle payetin alt kısmına çöken embriyoyu üst kısma alabilmek için payet eksenini etrafında döndürüldü.

3.2.5. Embriyonun transservikal yöntemle nakli

Natif embriyonun nakli

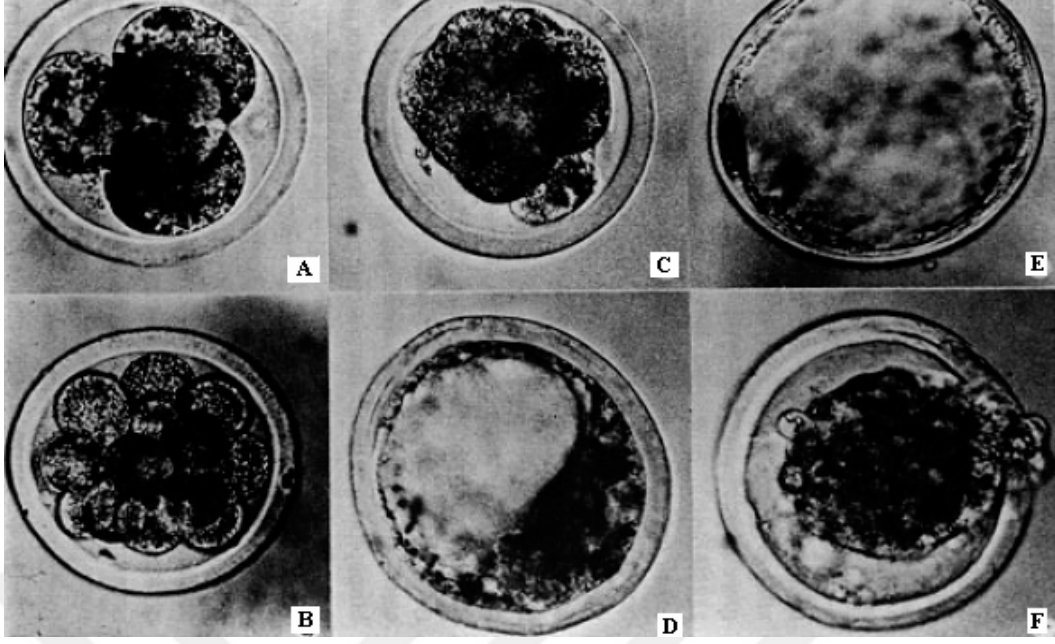
Nakil işleminden önce taşıyıcı inekler dinlenme duraklarına çekildi ve zaptı-raptı sağlandı. Nakilden hemen önce taşıyıcının rektumundaki gaita boşaltılarak perineal bölge temizlenip kurulandı. Daha az stres oluşması ve rahat bir nakil amacıyla ineğe uterus yıkanmasında olduğu gibi epidural anestezi yapıldı. Bu şekilde taşıyıcı nakil işlemine hazır hale getirildi.

Natif embriyoyu taşıyan payetler (kapatılmadan) nakil pistolesine yerleştirilerek pistolo tamamen hazırlandı ve son işlem olarak pistonin dışına hijyen amaçlı kullanılan kılıf takılarak kullanıma hazır hale getirildi. Embriyolar önceden belirlenmiş kornuya transservikal yöntemle nakledildi (Hafez, 1987c).



Şekil 9. Payet içinde görüntülenmiş embriyo örnekleri.

Nakil sırasında vulva dudakları iki yana doğru genişçe açıldı. Hijyen kurallarına uyularak transfer pistolesi yaklaşık 10 cm kadar ilerlenerek vajene yerleştirildi. Daha sonra sun'i tohumlamaya benzer yöntemle serviks'e kadar ilerlendi. Bu aşamada embriyo nakil pistolesi üzerine geçirilen plastik kılıf serviksin kaudalinde delinerek orifisyum uteri eksternaya girildi. Embriyo nakli sırasında rektumdaki el yardımı ile serviks ve kornuya uygun yön ve şekil verilerek nakil işlemine devam edildi.



Şekil 10. Embriyo değerlendirilmesinde kullanılan referans embriyo resimleri ve gelişim aşamaları, Erken dönem embriyonik gelişmelerin tanımlanması, a) 3 günlük 4 hücreli embriyo, b) 5 günlük 16 hücreli embriyo, c) 6 günlük kompakt morula aşamasındaki embriyo d) 7 günlük erken blastosit aşamasındaki embriyo e) 10 günlük genişlemiş zona pellusida (expanded) embriyo f) Zona pellusida'dan çıkış (Hatching aşaması) (Betridge, 1977).

Ovulasyon ile ipsilateralindeki, kornu uterinin kranial kısmına ulaşarak embriyo naklini gerçekleştirmek amacıyla pistole madreni yavaşça ileri itildi. Nakil işleminden sonra embriyo nakil pistolesi dikkatle dışarı alınarak embriyo nakil işlemi tamamlandı (Şekil 11).

Dondurulmuş embriyonun nakli

Çalışmanın bu bölümünde son yıllarda giderek üretimi ve kullanımı yaygınlaşan etilen glikol ile direkt transfer tekniğine göre dondurulmuş 9 embriyo kullanıldı.

Doğal kızgınlığı hayvan sahibi tarafından gözlenen inek, araştırmacı tarafından da gözlenerek kayıt altına alındı. Kızgınlığın başlangıcı aşımı kabul refleksinin test edilmesiyle belirlendi ve kaydedildi. Taşıyıcı adayı ineğe nakilden bir gün önce rektal muayene yapılarak uterusun genel yapısı ve korpus luteum bulunduran ovaryum belirlendi.



Şekil 11. Embriyonun transservikal yöntemle nakli.

Taşıyıcı ineğin korpus luteum ipsilateralindeki gluteal bölgesi spreyl boya ile işaretlendi. Taşıyıcıdaki kızgınlık başlangıcından 183 ± 3 saat sonra dondurulmuş embriyo 35°C sıcaklıktaki su banyosunda 20-30 sn süreyle çözme işlemine tabi tutuldu. Çözme işleminden sonra kurulan payet kesici ağızları, alkolden geçirilerek kurulanmış makas ile uç kısmından kesilerek açıldı ve daha sonra zaman kaybetmeden, embriyo nakil pistolesine yerleştirildi. Daha önce zaptı rapt altına alınan ve anogenital bölgesi temizlenerek kurulan, taşıyıcıya embriyo nakil işlemi gerçekleştirildi. Nakil pistolesinin dışına tek kullanımlık steril kılıf geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi. Sun'i tohumlamaya benzer olarak vulva dudakları genişçe açıldı ve nakil pistolesi vajen üst duvarını takip edecek şekilde vajene yerleştirildi. Daha sonra rektuma girilen el yardımı ile nakil pistolesine kılavuzluk edilerek pistolenin serviksi geçmesi ve korpus luteum bulunduran ovaryum ipsilateralindeki kornuya yönlendirilmesi sağlandı. Kornu içinde ilerlemiş olan pistole ucunun bulunduğu bölge kornunun tümü ile kıyaslanarak en az kornu ortasının geçilmesine dikkat edilerek kornunun ön kısmına natif embriyo naklinde uyulan kurallara uyularak nakil işlemi gerçekleştirildi (Hafez, 1987c).

3.2.6. Gebelik sonuçlarının değerlendirilmesi

Natif embriyo nakillerine ait gebelik ile ilgili sonuçlar, nakilden 38 gün sonra yapılan ultrason muayenesiyle değerlendirildi. Ayrıca, gebelikler embriyo transferinden 70 gün sonra rektal palpasyonla da kontrol edilerek doğrulandı. Dondurulmuş embriyo naklinden elde edilen gebelik sonuçları ise nakillerden 50-60 gün sonra sadece rektal muayene ile belirlendi.

3.2.7. İstatiksel değerlendirmeler

İneklerin süperovulasyona verdiği cevap ultrasonla saptanan folikül, korpus luteum ve elde edilen embriyo sayısı arasındaki ilişki Wilcoxon testi analiz edilerek sonuçlar ortalama, ortanca değer, standart hata, en küçük ve en büyük değer olarak verildi. İnek ve düvelerde FSH ve PGF_{2α}'dan sonra östrüs arasında geçen sürelerin karşılaştırılmasında Mann–Whitney U testi kullanılmıştır. Ayrıca bu özellikler arasındaki ilişkiyi belirlemede; Spearman rank korelasyonu hesaplanmıştır. İstatiksel analizler SPSS for Windows (Ver:13) istatistik paket programında yapıldı. Dondurulmuş ve natif embriyo nakillerinden elde edilen gebelik sonuçları ise % olarak verildi. İstatistik önemlilik (anlamlılık) düzeyi % 5 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Verici ve Taşıyıcılarda Östrüs Başlama Zamanı

Çalışmada verici olarak kullanılan inek ve düvelerde süperovulasyon için FSH uygulamasına başlanması ile östrüs gözlenmesi arasında geçen süre ve ikinci prostaglandin ile östrüs başlamasında geçen süreye ilişkin veriler ortalama değer ve standart sapma olarak Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Vericilerde ve alıcılarda FSH ve PGF_{2α} göre östrüs zamanı

		Düve (n=2) Ort±SD	İnek (n=4) Ort±SD
FSH -Östrüs (saat)		145.00±0.70	150.00±12.66
PGF _{2α} -Östrüs (saat)	Verici	55.00±7.77	70.42±7.19
	Taşıyıcı	-	77.20±7.75

İnek ve düvelerde FSH ile östrüs arasında geçen süre arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulundu. PGF_{2α} ile östrüs arasında geçen süre bakımından da inekler ve düveler arasındaki benzerlik vardı. Verici ve alıcılarda PGF_{2α} ile östrüs başlaması arasında geçen süreler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (P>0,05).

4.2. Ultrason Muayenesine Göre Süperfolikülasyon Bulguları

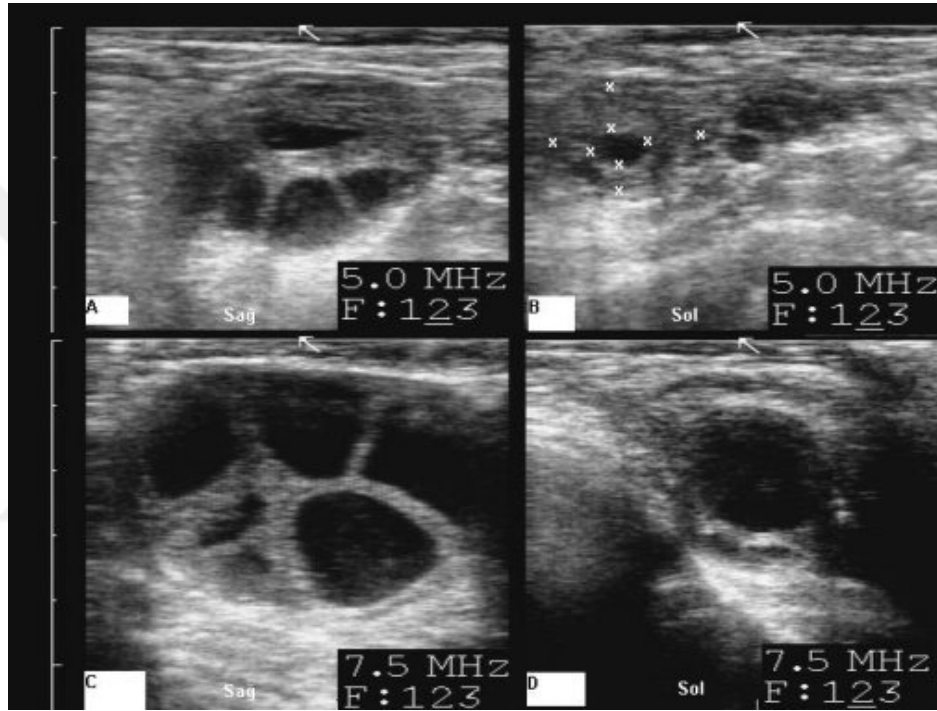
Verici olarak kullanılan inek ve düvelerin sağ ve sol ovaryumlarından elde edilmiş ultrason yansılarna göre çapı 10 mm ve daha büyük olarak değerlendirilen folikül sayıları ve varsa ovaryum üzerindeki korpus luteum gibi oluşumların vericilere göre dağılımı ve süperovulasyonun diğer sonuçları ile birlikte Tablo 5’te verilmiştir.

4.3. Ultrason Muayenesine Göre Çoklu Korpus Luteum Bulguları

Vericilerde uterus yıkamasından bir gün önce ovaryumlarda ultrason yardımı ile tespit edilebilmiş luteal dokular ve varsa çalışmayı ilgilendirebilecek diğer oluşumların

vericilere göre dağılımları ve süperovulasyonun toplu sonuçları ile birlikte Tablo 5’te belirtilmiştir.

Verici olarak kullanılan Holstein düvenin sağ ve sol ovaryumlarında korpus luteum olmadığı ve daha önce folikül tespitinde de yansılanan normal görünümlü foliküllerin büyük oranda varlığını devam ettirdiği tespit edildi. Bu bulgular verici olarak kullanılan Holstein düvede ovulasyonun oluşmadığını gösterdi (Şekil 12).



Şekil 12. Holstein düvede ovule olmayan foliküllerin ultrason yansıısı, A-C Sağ ovaryumda ovule olmayan foliküller, B’de dıştaki x’ler bir korpus luteumu ve antrumunu göstermektedir.

4.4. Uterus Yıkamasına Ait Bulgular

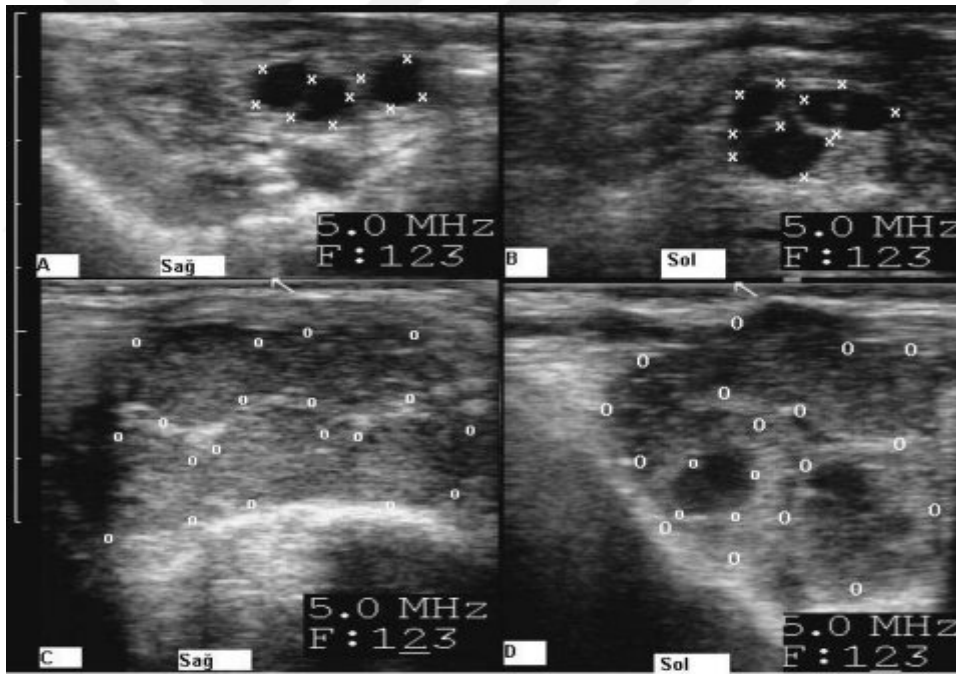
Çalışmada kullanılan vericilerin uterusunu yıkamak üzere yapılan girişimde ineklerin (n=4) uterus ve kornuları sorunsuzca yıkanarak 15 embriyo elde edildi. Ancak, çalışmada verici olarak kullanılan düvelerin (n=2) serviksine Foley kateteriyle girilemedi ve sonuç olarak serviks geçilemediğinden, uterus yıkaması amacıyla yapılan çabalar sonuçsuz kaldı (Tablo 6). Çalışma sırasında serviksi genişletme girişimlerinde serviks kolayca geçilirken Foley katateriyle yine geçilemedi. Vericilerde beliren huzursuzluk ve serviksi geçme sırasındaki bölgesel tahriş de dikkate alınarak bu 2

düvede uterus yıkaması işleminden vazgeçildi. Düvelere PGF_{2α} enjeksiyonu yapılarak mevcut çoklu gebeliklerine son verildi. Uterus yıkama girişimi, embriyo eldesi sonuçları ve yıkantının özellikleri Tablo 5 ve 6’da özetlenmiştir. Bu çalışmada uterus yıkama işlemi düvelerde % 0, (0/2), ineklerde ise %100, (4/4), olarak sonuçlandı (Tablo 6).

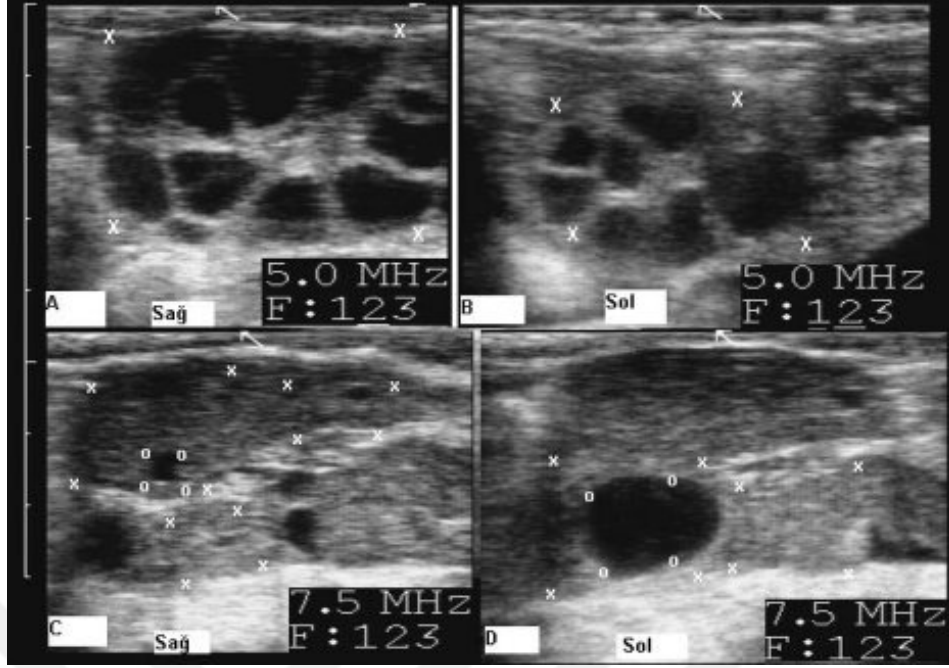
Tablo 5. Süperovulasyon sonrasında belirlenen folikül, korpus luteum ve embriyo sonuçları

	Düve (n=2)	İnek (n=4)	Toplam (n)	Enaz	Ençok	Ortanca değer	Ort±SD
Folikül	16	21	37	3.00	11.00	6.00	6.17±1.17
Korpus luteum	7	21	28	1.00	9.00	4.50	4.67±1.12 ^a
Embriyo	-	15	15	2.00	5.00	4.00	3.75±0.75 ^b

a ile b arasındaki korelasyon önemlidir (P<0.05).



Şekil 13. Süperovulasyon sonrası folikül ve korpus luteum yansısı (Holstein inekte), A-B Sağ ve sol ovaryumda foliküler yansı (x'ler boyutu belirler), C-D ise aynı ovaryumlarda korpus luteum yansısı, C’de normal korpus luteumların yansısı, D’ise antrumlu ve antrumsuz korpus luteum yansısı.



Şekil 14. Süperovulasyon sonrası folikül ve korpus luteum yansıısı (Simental düvede), A-B Sağ ve sol ovaryumunda süperfolikülasyon (X'ler ovaryum boyutunu belirler), C-D Aynı ovaryumlarda oluşmuş kistik ve kistik olmayan korpus luteumlar (x'ler korpus luteum boyutlarını, o'lar korpus luteum kistin boyutlarını göstermektedir.) Not: Korpus luteumlar hatalı yansılama sonucunda görüntüleme alanı dışına taşmaktadır.

Tablo 6. Uterus yıkamasında yıkama medyumunun geri alınmasına ait bulgular

Vericiler (n=4)	Yıkama	Miktar(ml)	Görünüm	Yıkama başarısı
İnek	Başarılı	600/1000 (%60)	Pembe	4/4 (%100)
İnek	Başarılı	650/1000 (% 65)	Pembe	
İnek	Başarılı	750/1000 (% 75)	Pembe	
İnek	Başarılı	500/1000 (% 50)	Kırmızı	
Düve	Başarısız	-	-	0/2 (%0)
Düve	Başarısız	-	-	
Sonuç	-	2500/4000 (%62.5)	%75 Pembe	-

4.5. Embriyoların Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Çalışmada verici olarak kullanılan düvelerde serviks geçilemediğinden uterusları yıkanamadı ve sonuç olarak embriyo elde edilemedi. Çalışmada verici olarak kullanılan ineklerden elde edilen embriyoların değerlendirilmesine ait toplu sonuçlar Tablo 7'de

sunuldu. Tablo 7’de de görülebileceği gibi nakle uygun kalitedeki embriyo sayısı 6 olarak bulundu. Verici başına düşen nakledilebilir kalitedeki embriyo oranı 1.50 ± 1.00 olarak tespit edildi. Bu çalışmada, nakledilebilir ve nakledilemez embriyo sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu. Buna göre de ineklerde nakledilemez embriyo oranı daha yüksektir. ($p < 0.05$, Tablo 7).



Şekil 15. Uterus yıkama işlemi.

Tablo 7. Vericilerden elde edilen embriyoların değerlendirilmesine ait bulgular.

	Embriyo sayısı	Ort $\pm$ SD	Ort. % $\pm$ SE
Nakledilebilir	6	1.50 ± 1.00	40.8 ± 0.08^a
Nakledilemez	9	2.25 ± 1.25	59.2 ± 0.08^b
Toplam	15	3.75 ± 1.50	-

* a ile b arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

4.6. Embriyo Nakliyle Elde Edilen Gebelik Sonuçları

Natif ve dondurulmuş embriyo nakillerine ait gebelik sonuçları

Natif ve dondurulmuş embriyo nakillerinden elde edilen gebelik sonuçları Tablo 8’de %’de olarak sunulmuştur. Şekil 16’da dondurulmuş embriyonun direkt transfer yöntemine göre naklinden elde edilmiş yavru örnekleri görülmektedir.

Tablo 8. Embriyo naklinden elde edilen gebelik sonuçları.

Embriyo niteliği	Nakil sayısı	Gebelik	Gebelik %
Natif	6	3	50.00
Dondurulmuş	9	4	44.44
Toplam	15	7	-



Şekil 16. Dondurulmuş embriyo naklinden elde edilen buzağı örnekleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, saha şartlarında çoklu embriyo üretimi, değerlendirilmesi ve natif embriyonun senkronize edilmiş alıcılara naklini, yine direkt transfer tekniğine göre üretilen embriyoların nakli ve sonuçlarını değerlendirerek saha şartlarında embriyo transferinin uygulanabilirliğini konu edinmektedir. Embriyo nakil çalışmaları reproduktif yönetim, süperovulasyon, değişik kaynaklardan *in vivo* ve *in vitro* şartlarda embriyo eldesi, üretimi ve değerlendirilmesini kapsamaktadır.

Sunulan çalışmada, düvelerde yaklaşık olarak 145, ineklerde ise 150 saat olarak belirlenen ilk doz FSH enjeksiyonu ile östrüs saptanması arasında geçen süreye ilişkin literatürlerde veriye rastlanmamaktadır. Çalışmada, 2. PGF_{2α} enjeksiyonundan sonra, inek ve düvelerde kızgınlıkların ortalama 65 saat civarında başladığı gözlenmiştir. Buna benzer bir araştırmada, İnsan Menopozal Gonadotropini ile süperovulasyon uygulanan Japon Kara Sığırında östrüslerin 2. PGF_{2α} enjeksiyonundan 57 ile 72 saatlik zaman aralığında gözlendiği bildirilmektedir (Sugano ve Shinogi, 2002). Ayrıca, Tegegne ve ark. (1997) Bos Indicus ve Bos Taurus melezlerinde bu çalışmadaki senkronizasyon ve süperovulasyon uygulamasına çok benzer bir hormon uygulamasından sonra 2. PGF_{2α} ile kızgınlıklar arasında geçen süreyi ortalama 45.5 saat olarak vermektedir. Çalışmaların sonuçları genelde benzer görünmektedir. Sonuçlar arasındaki farklılıklar çalışmalarda kullanılan farklı hormon preparatlarından, hayvanların inek ya da düve olmasından yada ırk farklılığından olabileceği gibi, bakım ve beslenme gibi genel faktörlerden de kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, Siedel ve Siedel (1991), ineklerde süperovulasyon işlemiyle kızgınlık arasında geçen sürenin önemli oranda değişiklik gösterdiğini bildirmektedir.

Bu çalışmada uterus yıkama işlemi östrüslerin gözlenmesi ve ilk tohumlamanın yapılmasından 7 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Bu durum literatürlerde uterus yıkamasının zamanlamasına dair geçen bildirimlere uygun düşmektedir (Donaldson, 1986; Siedel ve Siedel, 1991; Sartori ve ark., 2004). Anılan kaynaklarda uterus yıkama işleminin kızgınlıklardan sonraki 5-9 gün zaman aralığında yapılabileceği bildirilirken, süperovulasyon verimi, oosit ve embriyo oranı, embriyonun nakil işlemine ve bu

işlemler sırasında gerçekleştirilen manipölasyonların uygunluğu açısından yıkama işleminin 7. gün civarında yapılmasının yararlı olduğu belirtilmektedir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada embriyo yıkama işleminin uygun zaman diliminde yapıldığı anlaşılmaktadır.

Alıcılar ile vericilerin 2. PGF_{2α} enjeksiyonundan sonra östrüs gösterme süreleri arasındaki farklılıkların istatistiksel öneme yol açmaması alıcı-verici senkronizasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir. Alıcılarda 2. PGF_{2α} enjeksiyonunun vericilerden 12 saat daha önce yapılmasının değişik literatürlerde geçtiği ve bu durumun embriyoların alıcıda uterusu tutunması ve gebeliğin şekillenmesi açısından daha uygun olduğu düşünülürse, ortalamaların benzer olması, 12 saatlik sürenin uygun olduğunu göstermektedir. Alıcı verici arasındaki senkronizasyonun ± 24 saat olabileceği değişik kaynaklarda belirtilmektedir (Siedel ve Siedel 1991; İleri, 2002).

Bu çalışmada embriyoların eldesi sırasında uterus yıkaması için ineklerde kullanılan 4000 ml medyumun yaklaşık % 63 geri alınabilmiştir. Literatürlerde yıkama medyumunun hangi oranda geri alındığına dair veriler oldukça azdır. Bu kapsamda detaylı bir veriye rastlanmamakla birlikte yıkama sırasında uterusu verilen medyumun bir kısmının geri alınamayacağı da belirtilmektedir (Siedel ve Siedel 1991; İleri, 2002). Buna ek olarak, Vyas ve ark. (Anonim, 5) develerde gerçekleştirmiş oldukları süperovulasyon ve uterus yıkamasıyla embriyo toplama çalışmasında Foley kateteri balonunun korpus uteriye yerleştirilerek her iki kornuyu aynı anda yıkama girişiminde uterus içine doldurulan yıkama medyumunu % 90 oranında geri alabildiklerini belirtmektedir. Çalışmalardaki yıkama medyumunu geri alma oranları arasındaki farklılıklar, çalışmada kullanılan hayvanın türünün farklılığından kaynaklanmış olabilir. Develerde uterus yıkama işlemi deve yerde iken yapılmaktadır. Deve yerde iken karın içi organlar pelvis boşluğuna ilerleyerek uterus üzerine bir baskı oluşturabilir. Vyas ve arkadaşlarının (Anonim 5) sonuçlarını karın içi organların genital organlara yaptığı basınç olumlu yönde etkilemiş olabilir. İneklerde uterus yıkama işlemi hayvan ayakta iken yapılmakta ve çoğunlukla genital organlar da karın boşluğundan aşağı sarmaktadır. Bu durum da uterus içindeki kalan yıkama medyumunu miktarını artırmış olabilir. Elbette yıkama medyumunun geri alınmasında yıkama işlemi sırasında

operatörün uterusu yaptığı masajlarında etkili olması beklenebilir. Bu çalışmada yıkama medyumunun yaklaşık 2/3 geri alınabildiğinden elde edilen sonuçlar kabul edilebilir niteliktedir.

Sunulan çalışmada verici olarak kullanılan iki düvenin uterusu yıkanamadı. Sonuçlar bölümünde de belirtildiği gibi, söz konusu düvelerin serviksi Foley kateteri ile geçilemedi. Bu sorunun aşılması için yapılan serviks genişletme ve geçme denemeleri sonuçsuz kaldı. Düvelerde karşılaşılan serviksin geçilememesi sorunu, embriyo transfer çalışmalarında rastlanan bir durumdur (Zrally ve ark.,1980; Siedel ve Siedel 1991; Ushijima ve ark., 1993). Bu durumun nedenleri arasında, vericinin işlem sırasında, diöstrüs döneminde olması ve Foley kateteri çapının geniş olması sayılmaktadır. Serviksin geçilememesi sorununa özellikle düvelerde sık rastlandığı da bildirildi (Zrally ve ark.,1980). Serviksin genişletilmesi amacıyla kullanılan metal servikal dilatatörlerin, 48 cm uzunluğunda 6.3 mm çapında olduğu (Siedel ve Siedel, 1991), ve kimi durumlarda bu dilatatörlerin bile bu soruna çözüm getirmede yetersiz kalabildiği ve bu amaçla balonlu serviks açıcısı (Ushijima ve ark., 1993) ya da özel kimyasal ajanların kullanılması gerektiği kaydedildi (Zrally ve ark., 1980). Bu çalışmada verici olarak kullanılan düvelerde serviksin geçilememiş olması, yukarıda belirtilen diğer çalışmaların sonuçları da dikkate alınırrsa olağan kabul edilebilir niteliktedir. İneklerde ise uterus yıkanması açısından sağlanan %100 oranındaki başarı kabul edilebilir nitelikte görünmektedir. Bu çalışmada kullanılan düvelerin uterus yıkama işlemine uygun adaylar olmadığı anlaşılmaktadır. Karşılaşılan bu tür sorunların önlenmesi amacıyla verici olacak düveler daha önceden Foley kateteriyle test edilmelidir. Ayrıca, çalışmada karşılan bu sorun Foley kateterinin yapısından da kaynaklanmış olabilir. Serviksin geçilmesinde en temel ilkelerden biri de kullanılan ekipmanın sabit durması, operatörün serviksin portio vaginalisini hareket ettirerek orifisyum uteri eksternayı bulmasıdır. Foley kateterlerinde kateterin mukavemetini artırmak için kateterin içine metal mandren yerleştirilmektedir. Bu çalışmada kullanılan Foley kateterin de mandren uç kısmından daha ileride yaklaşık 7-8 mm kadar esnek bir kısım vardı. Bu esnek kısım serviksin geçilmesini engelliyordu. Çalışmanın sonuçları kullanılacak olan Foley kateterinin seçiminde de dikkatli olunması gerektiğini ortaya koymuştur.

İneklerde gerek süperovulasyon çalışmalarında ve gerekse embriyo transfer çalışmalarında ultrason ile süperfolikülasyon ya da korpus luteumların belirlenmesinin bir kolaylık olduğu bildirilmektedir (Pieterse ve ark., 1990; Hanzen ve ark., 2000; De Roover ve ark., 2005). Ancak, yöntemin 6 mm ve daha küçük çapa sahip foliküllerin belirlenmesinde yetersiz kalabileceği de belirtilmektedir (De Roover ve ark., 2005). İneklerde embriyo nakli sırasında uygulanan süperovulasyon başarısının, ultrason ile folikül ve korpus luteumların görüntülenerek sayısının belirlenmesi ya da yıkama işleminden elde edilen embriyo sayısı bazında, değişik yaklaşımlarla belirlendiği görülmektedir (Grasso ve ark., 1989; Pieterse ve ark., 1990; Robertson ve ark., 1993; Dochi ve ark., 1998; Hanzen ve ark., 2000; Sartori ve ark., 2004; Singh ve ark., 2004).

Bu çalışmada, süperovulasyon uygulamasından elde edilen başarının belirlenmesinde, ultrason ile tespit edilen folikül ve korpus luteum ve uterus yıkama sonrasında elde edilen embriyo sayısı temelinde üç değişik yöntem izlendi. Bu üç değişik yöntemle elde edilen bulguların istatistiksel analizde, yöntemlerin benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Robertson ve ark. (1993) ultrason ile elde ettikleri folikül sayısını yıkama sonucunda elde ettiği embriyo sayısı ile karşılaştırdıklarında, ultrason ile folikül sayısını belirlemenin, süperovulasyon cevabının belirlenmesinde yetersiz kaldığı sonucuna varmışlardır. Araştırmacılar bu durumun temel nedeni olarak muayene sırasında ovule olmuş foliküllerin dokuların ayrımını güçleştirdiği şeklinde açıklamışlardır (Robertson ve ark., 1993). Bu çalışmada Robertson ve ark. (1993)'nın belirttiği gibi foliküllerin gözlenmesinde bir zorlukla karşılaşılmamıştır. Robertson ve ark. (1993) foliküllerin gözlenmesinde, ovule olan foliküllerin sorun olduğunu bildirmesinden, gözlem işlemi için geç kalındığı kanısının doğmasına yol açmaktadır. Sunulan bu çalışmada foliküllerin görüntülenmesi, kızgınlığın başlamasıyla eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, ultrason ile tespit edilen kimi foliküllerde anovulasyon gözlenebildiği düşünülürse süperfolikülasyonu takip etmenin embriyo verimi hakkında daha genel bir sonuç kaçınılmaz olacaktır.

De Roover ve ark. (2005), süperovulasyon için, Ovagen kullanarak 112 vericiden üç yıl boyunca yaptıkları 665 OPU seansında 9806 folikül aspire ederek 7764

oosit (kumulus ooforus kompleks) elde edildiğini bildirmektedirler. Araştırmacılar, OPU başına ortalama 12 oosit elde edildiğini bildirmektedir. Elde edilmiş olan 12 oosit değeri sunulan bu çalışmada elde edilen 3.75 embriyo ortalamasından oldukça yüksek görünmektedir. Ancak sunulan bu çalışmada elde edilen sonuç embriyoya, De Roover ve ark. (2005)'nin çalışması sonuçları ise oosit verimine dayanmaktadır. Sonuçlar arasındaki farklılık, OPU çalışmalarında çapı 8 mm gibi olgunlaşmamış foliküllerin aspire edilmesinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca oositlerin folikül içinde, ovulasyon ve sonrasındaki taşınma gibi aşamalarda dejenere olarak canlılığını yitirdiği ve kimi embriyoların erken embriyonik gelişme aşamasında öldüğü düşünülürse bu çalışmada ile De Roover ve ark. (2005)'nin sonuçları arasındaki farklılık olağan görülebilir. Bütün bunlara ek olarak bizim çalışmamızda kimi embriyolar, yıkama hataları ya da embriyonun değişik yüzeylere yapışması gibi sebeplerle kaybedilmiş olabilir. Bu durum da çalışmada elde edilen embriyo sayısının azalmasına neden olabilir. Embriyonun implantasyon dönemine yaklaştıkça değişik yüzeylere tutunma kabiliyetinin artması beklenmelidir. OPU çalışmalarında elde edilen oositler çoğunlukla kumulus ooforus ile sarılmış immature oositler olduğunda tutunma kabiliyetlerinin oldukça düşük olması olacaktır. İki çalışmanın sonuçları arasındaki farklılığın oluşmasına sebep olabilecek nedenler de düşünülürse elde edilen verici başına 3.75 embriyo oranının kabul edilebilir ve çalışmamızda kullandığımız östrüs senkronizasyonu ve oFSH zamanlaması dozlamasının uygun olduğu söylenebilir. oFSH esasen progesteron senkronizasyonuna uygun olarak üretilmektedir (Anonim 7; De Roover ve ark., 2005). Ovagen prospektüsünde hormonun sadece CIDR ile kullanımı anlatılmakta ve PGF_{2α} ile kullanımlar için üretici ile temasa geçilmesi gerektiği bildirilmektedir. De Roover ve ark. (2005)'nin sonuçları bu çalışmada verici olarak kullanılan inek ve düvelerden elde edilen verici başına yaklaşık 6 folikül ve 5 korpus luteum sayısı ile karşılaştırılabilir niteliktedir. Sonuçlara göre folikül ve korpus luteum sayısı bakımından da bu çalışmada verimin düşük olduğu söylenebilir. Çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıklar yukarıda belirtilen nedenlere ek olarak ırk, mevsim, çevre, stres ve yaş faktörlerden de kaynaklanmış olabilir.

Hasler (1998), oosit pick up programına alınan ineklerde süperovulasyon uygulamasına alınan cevabın yaşa göre değiştiğini bildirmektedir. Oosit pick up

alışmaları ile embriyo çalışmalarında süperovulasyonun ultrason ile takip edilmesi uygulamaları arasında fark olmadığından veriler karşılaştırılabilir niteliktedir. Hasler (1998) bu çerçevede oosit veriminin 3-5 yaşlı ineklerden 3.2 ile 4.8, 6-9 yaşlı ineklerde, 4.0 ile 8.9, 10-13 yaşlı ineklerde 3.6 ile 6.0, ve 14-18 yaşlı ineklerde ise 2.3 ile 5.0 arasında değiştiğini bildirmektedir. Bu çalışmada ise ultrason ile ovaryumlarda toplam 37 folikül, verici başına yaklaşık olarak 6 folikül gözlendi. Çalışmanın bu sonuçları ile Hasler (1998)'in bildirmiş olduğu sonuçlar oldukça benzerlik göstermektedir.

Ayrıca, süperovulasyon tetiklenmesine oluşan ovaryum cevabının ineklerde bireysel olarak değiştiği ve bu durumun embriyo transfer çalışmalarının etkinliğini sınırlandıran bir faktör olduğu da bilinmektedir (Hahn, 1992; Quaresma ve ark., 2003). Süperovulasyon uygulamalarına oluşan cevap, temel olarak, hormon özellikleri, uygulama biçimi ve vericinin fizyolojik özelliklerine göre değişmektedir (Bindon ve ark., 1986; Walton ve Stubbings, 1986; Hahn, 1992; Kafi ve McGowan, 1997). Bilindiği gibi gonadotropik hormonlar hipofiz lobundan elde edilen ekstraktlardan hazırlanmaktadır. Hipofiz ekstraktları hem FSH ve hem de LH hormonu etkileri oluşturmaktadır. Gonadotropik hormonun yapısında bulunan FSH/LH oranının hormona oluşan süperovulasyon cevabında ve elde edilen embriyoların kalitesi üzerine çok etkili olduğu (Donaldson ve Ward, 1986; Donaldson et al., 1986; Walton ve Stubbings, 1986; Chupin et al., 1987; Herrler et al., 1991; Greve et al., 1995; Kelly et al., 1997) ve ayrıca optimal FSH/LH oranının da vericinin ırkına göre değiştiği (Chupin et al., 1987) literatürlerde geçmektedir.

Bu çalışmanın donör hayvanlarını oluşturan iki adet düvede $PGF_{2\alpha}$ ile senkronizasyon ve oFSH ile yapılan süperovulasyon sonucuna ilişkin olarak ultrason ile yapılan sperfolikl tespitinde toplam 16 adet folikül gzlenebildi. Çalışma sonucuna göre düve başına ortalama 8.0 adet folikül tespit edildi. Getz ve ark. (2007)'nın simental düvelerde yaptığı bir çalışmada, sunulan bu çalışmaya benzer olarak östrüs senkronizasyonu için 11 gün ara ile 2 enjeksiyonla, $PGF_{2\alpha}$, ve süper ovulasyon için ise FSHp (domuzdan elde edilmiş FSH) kullanılarak ve 10 dveden ultrason ile 8 mm ve daha büyük ortalama 14.5 ± 3.9 folikül aspirasyonu yapılabildiği bildirilmektedir. Yine bu elde edilen bu folikül sıvısından 10.3 ± 5.2 oosit kazanıldığı bildirilmektedir. Söz konusu çalışmadan elde edilen folikül ve oosit verimi ile bu çalışmamızda düvelerin

ovaryumlarında gözlenebilen ortalama 8 folikül sonucu kıyaslandığında bu çalışmanın sonuçları az da olsa düşük görünmektedir. Çalışmalar arasındaki bu farklılık birkaç şekilde açıklanabilir. İlk olarak anılan çalışmanın sonuçları 10 adet Simental düvede PGF_{2α} ile senkronizasyon ve domuz FSH'ı ile süperovulasyonuna aittir. Bu çalışmada kullanılan iki düveden biri olan Simental'de 11 adet, Holstein olan diğer düvede ise 5 adet folikül saptanabildi. Bu çalışmada kullanılan Simental düvede ultrason ile saptanan 11 folikül sayısı Getz ve ark. (2007)'nin sonuçlarına oldukça benzerdir. Bu durum bu çalışmada kullanılan simental düve sayısı daha fazla olsa daha benzer sonuçlar alınabileceğini düşündürmektedir. Kısaca Holstein ve Simental ırkı düvelerin FSH hormonuna duyarlılığı farklı olabilir. İkinci olarak bu çalışmada koyun FSH kullanılırken anılan çalışmada ise domuz FSH'u kullanılmıştır. Çalışma sonuçları arasındaki farklılık çalışmalarda kullanılan değişik kökenli FSH'larının süperovulasyonda etkinlik farkından da kaynaklanabilir.

Contreras ve ark. (2008), son görülen östrüsten 9-12 gün sonra 240 mg FSH'ı azalan dozlar ilkesiyle uygulayarak 20 inekten toplam 65 adet embriyo elde ettiklerini bildirmektedir. Contreras ve ark. (2008)'nin çalışmasında inek başına yaklaşık 3 embriyo elde edilmiştir. Bu çalışmada ise 4 inekten elde edilen ortalama 3.75 oranında embriyo verimi ile Contreras ve ark. (2008)'nin sonuçları ve Hasler (1998)'in 3-5 yaşlı ineklerden elde edilen 3.2 ile 4.8 arasında değişen embriyo verimi ile kıyaslandığında, çalışmanın embriyo veriminin kötü olmadığı anlaşılmaktadır.

Sunulan bu çalışmada süperovulasyon için koyun hipofizinden elde edilen ve yapısında düşük oranda LH bulunduğu bildirilen, Ovagen kullanılarak verici başına 1.5 oranında nakledilebilir kalitede, ortalama 3.75 sınıflandırılmamış embriyo elde edilmiştir (Tablo 7). Quaresma ve ark. (2003) Mertolenga ırkı ineklerde süperovulasyon için farklı bir yaklaşımla iki farklı FSH preparatından Folltropinin yapısında olan LH varlığının % 80'ini uzaklaştırarak, FSHp'yi ise normal olarak kullandığını, sırasıyla 10 ve 11 ineklik iki gruptan elde ettiği sonuçların birbirinden oldukça farklı olduğunu bildirmektedir. Bu çerçevede araştırmacılar, LH'tan saflaştırılmış Folltropin ve FSHp ile sırasıyla, süperovulasyona pozitif cevap oranlarının % 90.0 ve 72.2, toplam embriyo sayısının 10.0±2.2 ve 8.5±2.4, canlı embriyo sayısını, 6.4±1.2 ve 1.6±0.7, dejenere embriyo oranını, 2.8±0.9 ve 1.1±0.4 ve döllememiş oosit oranını da 0.8±0.3 ve 5.8±0.9

olarak bildirdi. Bu çalışmada elde edilen ortalama nakledilebilir embriyo ile Quaresma ve ark. (2003)'nın elde ettiği canlı embriyo oranları karşılaştırıldığında, bu çalışmada elde edilen sonuç, Folltropin'in LH'tan % 80 oranında saflaştırılmasıyla elde edilmiş ovaryum yanıtlarından oldukça düşük, FSHp ile elde edilmiş ovaryum yanıtlarına ise oldukça yakın olduğu görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan oFSH farmakolojik açıdan ele alındığında FSHp ile aynı grupta yani FSH-LH miks grupta yer almaktadır. Gerek sunulan bu çalışmanın ve gerekse Quaresma ve ark. (2003) sonuçları süperovulasyon için kullanılan preparatta LH varlığı ve etkileri bakımından birbirini destekler nitelik arz etmektedir. Çalışmamızdan elde edilen bu sonuç ile değişik literatürlerde bildirilen süperovulasyon için kullanılan gonadotropin niteliklerinin ovaryum cevabı yanında fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesini etkilediği yönündeki raporlarla aynı doğrultudadır (Donaldson ve Ward, 1986; Donaldson ve ark., 1986; Herrler ve ark., 1991). Süperovulasyon tetiklemesine alınmış cevapların 0-35 arasında değiştiği düşünülürse farklılıkların olağan olduğu anlaşılmaktadır.

Sugano ve ark. (2005) Japon siyah ve Holstein inek ve düvelerinden 7-8 günlük dönemde elde ettikleri kaliteli embriyoların 11 tanesini natif olarak, 15 tanesini de dondurduktan sonra ineklere naklettiklerini ve natif embriyonun nakillerinden yaklaşık % 64, dondurulmuş embriyolardan ise % 60 oranında gebelik elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada ise çalışma sürecinde üretilmiş nakledilebilir kalitedeki 6 natif embriyonun naklinden % 50 oranında gebelik elde edilmiştir. Bu çalışmada natif embriyolardan elde edilen gebelik oranları Sugano ve ark. (2005)'nın elde ettikleri gebelik oranlarından düşük görülmektedir. Sonuçlar arasındaki farklılıklar özellikle çalışmalarda kullanılan embriyo kalitesinden kaynaklanmış olabilir. Bu çalışmada nakledilen embriyoların önemli bir kısmı iyi kalitede embriyolardan oluşmaktaydı. Bu durum elde edilen gebelik oranına yansımış olabilir. Elbette embriyo transfer çalışmaları oldukça tecrübe isteyen birçok aşamadan oluşmaktadır. Çalışma ekibinin tecrübe eksiklikleri de sonuçları etkilemiş olabilir. Bu tez çalışmasının donmuş embriyo nakli kısmında ise yaklaşık olarak % 44 oranında gebelik elde edildi. Elde edilen gebelik oranları Sugano ve ark. (2005)'nin gebelik oranından oldukça düşük görülmektedir. Sonuçlar arasındaki farklılıklar birkaç değişik nedenden kaynaklanmış olabilir. Öncelikle çalışmalarda kullanılan embriyoların dondurulması sırasında

kullanılan kriyoprotektan maddeler farklılık arz etmektedir. Sugano ve ark. (2005)'nın çalışmasında embriyolar gliserol (%10) yöntemi ile dondurulmuş ve embriyoların çözümünden sonra 0.25 M sukroz ile hazırladıkları % 6, % 3 ve % 0 olan medyumlar içinde üç basamakta gliserolün uzaklaştırılması işlemine tabi tutularak nakledildiği bildirilmektedir. Esasen, Sugano ve ark. (2005)'nın embriyoyu dondurmak için kullandıkları gliserol embriyolar için etilen glikolden daha fazla embriyo toksik nitelik arz etmektedir. Ancak gliserol kullanımı ile embriyo dondurulması üzerine bilim adamlarının daha fazla tecrübesi var ve bu yöntemle embriyo dondurulması ve çözülmesinde kullanılan teknikler oldukça standardize edildiğinden gliserol ile dondurulmuş embriyolardan daha yüksek gebelik elde edildiği bir çok çalışmada görülmektedir (Spell ve ark. 2001; Riha ve ark., 2002; Sugano ve ark., 2005). Ayrıca gliserol ile dondurulan embriyolar her zaman bu alanda tecrübeli ekipler tarafından kullanılmaktadır. Zira embriyonun çözülmesinden sonra gliserolün uzaklaştırılması için embriyonun birkaç medyuma aktarılarak rehidre edilmesi gerekmektedir ve bu işlemler stereo mikroskop ve laboratuvar ortamını gerektirmektedir. Sunulan bu çalışmada kullanılan embriyolar ise direkt transfer tekniğine göre hazırlanmış embriyolardan oluşmaktadır. Yine de bu çalışmada elde edilen gebelik oranının düşük olduğu söylenebilir. Bu durumun olası nedenleri arasında yöntemin uygulanması ve zamanlamasında kimi hatalar, üzerinde çalışılan hayvanların bakım besleme, ırk ve bireysel farklılıklarından ve daha düşük ihtimalle de çevresel etkilerden kaynaklanmış olabilir. Alıcılardaki bireysel farklılıklara örnek olarak nakil sırasında alıcının progesteron düzeyi gösterilebilir. Nishigai ve ark. (2000) alıcılarda gebeliğin başarılı bir şekilde oluşmasında alıcının nakil sırasındaki progesteron ve östrojen seviyelerinin oldukça önemli olduğunu bildirmektedir. Özellikle de olası yüksek östrojen seviyelerinin erken gebelik döneminde embriyoya zararlı nitelik arzettiği bilinmektedir (Shore ve ark., 1998).

Shore ve ark. (1998) tohumlama sırasında ve erken gebelik döneminde östrojen seviyesi yüksek olan ineklerde embriyonik kayıpların önemli oranda arttığını bildirmektedir. Bu çalışmada uterus yıkamasından bir gün önce yapılan korpus luteumları belirleme çalışması sırasında iki vericinin ovaryumunda önemli oranda folikül varlığı dikkat çekmiştir. Bu kapsamda toplam 8 adet folikül gözlenmiştir. Bu

foliküllerden 3 tanesi verici olan ineklerin birisinde, 5 adet folikül de verici düvelerden birinde izlenmiştir. Düvelerde uterus yıkaması yapılamadığı hatırlanırsa çalışmadan elde edilen embriyo kalitesi üzerine bir yansıması olmayacaktır. Ancak korpus luteum kontrolü sırasında ovaryumlarında 3 adet folikül gözlenen inekten toplamda 5 adet embriyo elde edilebilmiş ve bunlardan sadece 1 tanesinde nakledilebilir kalitede embriyo değerlendirilmesi yapılabildi. Bu durum genel olarak çalışmadan elde edilen kaliteli embriyo oranının düşmesine neden olmuştur. Bu çalışmada luteal dönemde folikül varlığı, folikül sıvısının yüksek oranda östrojen içerme olasılığı ve embriyo değerlendirilmesinden elde edilen sonuçların ile Shore ve ark. (1998) erken gebelikte artan östrojenlerin embriyonik ölümlere neden olabileceği yönündeki raporu ile uyumlu olduğu düşünülmektedir.

Barati ve ark. (2007) Sistani ırkı ineklerde yaptıkları 14 natif, 56 dondurulmuş embriyo naklinden sırasıyla % 64.3 ve % 17.86 gebelik elde ettiklerini bildirmektedir. Barati ve ark. (2007)'nin çalışması incelendiğinde, dondurulmuş embriyoların hazırlanmasında gliserol kullanıldığı anlaşılmaktadır. Sunulan bu çalışmada natif embriyonun naklinden % 50.0 dondurulmuş embriyonun naklinden ise % 44.4 oranında gebelik elde edilmiştir. Çalışmalar arasında gebelik oranları karşılaştırıldığında bu çalışmada natif embriyo naklinden elde edilen gebelik oranı Barati ve ark. (2007)'nin sonuçlarından düşük kalmakta, dondurulmuş embriyonun naklinde ise bu çalışmadan elde edilen sonuçların anılan çalışmadan yüksek olduğu görülmektedir. Çalışmalarda natif embriyo naklindeki sonuçların arasındaki farklılıklar çok fazla olmadığından özel bir nedene bağlamak yanıltıcı olabilir. Çalışmalar arasındaki küçük farklılıklar değişik bir çok nedenden kaynaklanmış olabilir. Çalışmaların donmuş embriyo nakilleri arasındaki farklılıklar açısından bakıldığında bu tez çalışmasının sonuçların daha kabul edilebilir nitelikte olup, Barati ve ark. (2007)'nin sonuçları olması gerekenden daha düşük görünmektedir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan dondurulmuş embriyoların direkt transfer yöntemine uygun olarak etilen glikol ile dondurulduğu, Barati ve ark. (2007)'nin ise embriyonun dondurulmasında gliserol kullandıkları hatırlanırsa sonuçlar arasındaki farklılıkların embriyoların hazırlanmasında kullanılan kriyoprotektif madde farkından kaynaklanmış olabileceği de ileri sürülebilir. Ancak, literatürlerde klasik yöntemle gliserol kullanılarak hazırlanan embriyolardan % 35 ile % 70 arasında gebelik

elde edildiği görülebilir. Elbette embriyo hazırlanmasında çalışan ekiplerin kullandıkları teknoloji ve bilgi birikiminin embriyo kalitesi üzerine bir yansıması beklenir. Bu çalışmada kullanılan donmuş embriyolar, dondurulmuş embriyo üreten bir merkezden temin edilirken, Barati ve ark. (2007) embriyolarını kendi laboratuvarlarında dondurmuşlardır. Sonuç olarak bu çalışmada direkt transfer yöntemiyle dondurulan embriyoların naklinden elde edilen gebelik oranlarının daha yüksek olması embriyonun hazırlanmasındaki bilgi birikimi farklılığından da kaynaklanmış olabilir.

Spell ve ark. (2001) etçi ineklerde yaptıkları 122 natif, 326 adet gliserol ile klasik yöntemle göre dondurulmuş embriyo naklinden sırasıyla % 82.8 ve % 69.0 oranından gebelik elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yine bu çalışmanın sonuçları arasında, alıcı verici senkronizasyonu açısından -24, -12, 0, +12, +24 saatlik farklılıkların, iyi ve daha üstün sınıflandırılmış embriyo kalitesinin ve embriyo gelişim döneminin nakil başarısını az çok değiştirdiği ancak, farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı belirtilmektedir. Buna karşın natif ve dondurulmuş embriyolardan elde edilen gebelik oranları arasındaki farklılıkların önemli olduğu bildirilmektedir (Spell ve ark., 2001). Spell ve ark. (2001)'nin çalışması ile sunulan bu çalışmada natif ve dondurulmuş embriyo naklinden elde edilen gebelik oranları karşılaştırıldığında Spell ve ark. (2001)'nin sonuçları daha yüksektir. Esasen, Spell ve ark. (2001)'nin, bu çalışmadan başka bir çok embriyo nakil çalışmasından da daha yüksek sonuç aldığı görülmektedir (Barati ve ark., 2007; Sugano ve ark., 2005; Riha ve ark., 2002).

Spell ve ark. (2001) gerek natif ve gerekse dondurulmuş embriyo nakillerinden oldukça yüksek sonuç aldıkları çalışmada embriyoların alıcılara kızgınlıktan 6.5-8.5 gün sonra naklettiklerini belirtmektedirler. Sunulan bu çalışmada vericilerden embriyo eldesi amacıyla uterus yıkanması işlemi 7. günde gerçekleştirildi. Vericilere 2. PGF_{2α}'nın yarım gün önce verildiği de göz önüne alınırsa embriyolar alıcılara kızgınlığın başlamasından sonraki 7.5 günlük süreçte nakledildi Bu çalışmada alıcılar açısından embriyo nakil zamanlaması değişik literatürlerde belirtilen 6.5-8.5 günlük süreç içine rastladığından uygun görünmektedir (Lopes da Costa ve ark., 2001; Spell ve ark., 2001).

Riha ve ark. (2002) embriyo transferi üzerine yaptıkları kapsamlı bir çalışmada, süperovulasyon uyguladıkları ineklerden ve mezbaha materyalinden olmak üzere iki farklı kaynaktan embriyo ürettiklerini ve her iki embriyo elde etme yönteminde de embriyoların bir kısmını natif olarak bir kısmını da klasik ve direkt transfer yöntemine göre dondurarak nakletmişlerdir. Araştırmacıların süperovulasyon uyguladıkları ineklerden elde edilen ve natif olarak nakledilen 378 embriyodan 245 yani yaklaşık % 65.0, mezbaha materyalinden *in vitro* üretilen embriyolardan natif olarak nakledilen 59 embriyodan 29.0, yani yaklaşık % 49 oranında gebelik elde ettikleri bildirilmektedir. Bu çalışmada natif embriyo naklinden elde edilen % 50.0 oranındaki gebelik oranı Riha ve ark. (2002)'nın süperovulasyon ile *in vivo* olarak üretilmiş natif embriyo nakillerinden elde etmiş olduğu gebelik oranlarından bir miktar düşük kalmakta, *in vitro* olarak mezbaha materyalinden elde edilen oositlerin kültürlenmesi ve fertilizasyonu ile üretilen natif embriyo nakillerinden elde edilen gebelik sonuçlarına oldukça benzer olduğu görülmektedir. Riha ve ark. (2002)'nin çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* embriyo üretiminden farklı gebelik sonuçları elde edildiği ve bu durumun embriyo kalitesinden kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar bir çok çalışmada embriyo kalitesinin diöstrus döneminde progesteron ve östrojen seviyelerinden etkilenen oosit kalitesinin embriyo kalitesine yansması olarak açıklanabilir. Bu çalışmada elde edilen gebelik oranlarının düşük olması ise çalışmada kullanılan hormon yapısı, hayvan ırkı, çalışma şartları ve teknik imkanlar gibi değişik nedenlere bağlanabilir.

Riha ve ark. (2002)'nin çalışmasında dondurulmuş embriyo nakli kısmında klasik yöntemle gliserol kullanılarak dondurulan embriyoların naklinden % 59.0 (125/212), direkt transfer yöntemi için etilen glikol kullanılarak dondurulan embriyoların naklinden ise yaklaşık % 38.0 (159/421) gebelik elde edildiği bildirilmektedir. Bu çalışmada etilen glikol kullanılarak direkt transfer için dondurularak hazırlanan 9 embriyo naklinden elde edilen gebelik oranlarının ile Riha ve ark. (2002)'nin sonuçlarına oldukça benzer olduğu görülmektedir. Gliserol ile hazırlanan embriyolardan elde edilen gebelik sonuçlarının yüksek olması da normal bir durumdur. Zira, standardize edilmiş olan gliserol ile embriyo dondurma alanında daha fazla bilgilendirilimi vardır. Sunulan bu çalışmada dondurulmuş embriyo naklinden elde edilen sonuçlar ile Riha ve ark. (2002)'nin sonuçları arasındaki farklılık embriyo

hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin embriyo kalitesi üzerine yansımaları olarak açıklanabilir.

Bu çalışmada nakle uygun kalitede toplam 6 embriyo natif olarak, 9 embriyo da dondurulmuş olarak nakledildi ve sırasıyla % 50.0 ve % 44.4 gebelik elde edildi. Sonuç olarak natif embriyo nakillerinin yarısı, dondurulmuş embriyo nakillerinin ise yaklaşık % 56'sı gebelikle sonuçlanmadı. Embriyo transferinde gebelik oranlarının düşmesine, embriyo nakli sırasında operatörün, serviksi geçmek, embriyo nakil pistolesini korpus luteumla ipsilateral kornuya yönlendirmek ve kornu içinde ilerlemek için rektumdan gelen el ile kornudan tutmasının uterusu PGF_{2α} salınımına yol açtığı ve salınan PGF_{2α}'nın embriyoya zarar verdiği yönünde raporlar değişik literatürlerde bildirilmektedir (Ferguson, 1941; Wann ve Randel 1990; Schrick ve ark., 2003). Değişik araştırmalarda embriyo transferi sırasında alıcılara prostaglandin inhibitörü olan Flunixin Meglumine (500 mg/im) verilmesinin embriyo transferinde gebelik oranlarının yaklaşık %15 artırılabilirdiğini ortaya koymuştur (Purcell ve ark., 2005; Schrick ve ark., 2001). Nakil sırasında embriyonun kornunun uç kısımlarına bırakılması için bu konuda deneyimli ve deneyimsiz operatörlerin uterus korpus ve kornusuna yapacakları manipülasyonların oldukça farklı olması kaçınılmaz bir durumdur. Nakil sırasında gerek rektumdaki elin manipülasyonları ve gerekse embriyo nakil pistolesinin serviks, korpus ve kornu içinde ilerlemesi sırasında operatörün mukoza üzerinde çalıştığı göz önüne alınırsa embriyo naklinde tecrübenin çok önemli olduğu anlaşılabacaktır. Bu çalışmada araştırmacı embriyo nakli konusunda oldukça yeni olduğundan elde edilen gebelik üzerine yukarıda anılan biçimde bir olumsuz etki oluşmuş olabilir. Deneyimli embriyo nakil operatörlerinin gerek natif embriyo ve gerekse donmuş embriyo naklinden oldukça yüksek gebelik elde etmeleri rastlantı ile açıklanamaz (Spell ve ark., 2001).

Kanuya ve ark. (1997) yaptıkları embriyo nakil çalışmasında, ineklerde oluşan süperovulasyon yanıtını belirlemek için rektal palpasyon ile korpus luteum sayısını belirlediklerini ve daha sonra ineklerden elde edilen toplam embriyo sayısı ile korpus luteum sayısını karşılaştırdıklarını ve sonuçlar arasında istatistiksel fark olmadığını bildirmektedir. Çalışmadan elde edilebilecek embriyo sayısını yıkama işleminden daha önce belirlemek için korpus luteum sayılarının belirlenmesinin tutarlı bir yol olduğu belirtilmektedir. Kanuya ve ark., (1997) Jersey ve Ayrshire ırkı inek ve düveler

kullandıklarını, korpus luteum sayısı ile superovulasyona oluşan cevabın belirlenmesi açısından benzer sonuçlar elde ettiklerini bildirmektedir. Bu çalışmada da vericilerin süperovulasyon uygulamasına verdikleri ovaryum cevaplarının belirlenmesi amacıyla ultrason yardımıyla uterus yıkaması işleminden bir gün önce korpus luteum sayıları belirlendi ve elde edilen bulgular ile elde edilen toplam embriyo sayıları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında önemli bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Kanuya ve ark. (1997)'nin bildirdikleri sonuçlarla benzer görünmektedir. Elde edilen sonuçların tutarlılığı düşünülürse korpus luteumların belirlenmesinde gerek ultrason ve gerekse rektal palpasyon yöntemlerinin başarılı olduğu anlaşılmaktadır.

Lindeberg ve ark. (2007) sütçü 18 damızlık inek ve 12 düvede saha şartlarında yaptıkları çoklu ovulasyon, embriyo eldesi ve dondurulmuş embriyolarda biyopsi ile cinsiyet tayinini amaçlayan çalışmada, hayvanlara azalan doz programı ile FSH uyguladıklarını, kızgınlığı uyarmak için 2 ml PGF_{2α} kullandıklarını ve inek düve dahil toplam 30 hayvanda 49 uterus yıkaması yaptıklarını, yıkamalardan 3'ünde ne embriyo ve ne de oosit, 1 yıkamada ise sadece 2 adet oosit, kalan 45 yıkamadan ise 1-31 arasında değişen nakledilebilir embriyo elde ettiklerini bildirmektedir.

Hasler ve ark. (1983)'nin 13 yıl boyunca Holstein ineklerde yapılan 984 ilk süperovulasyon uygulamasında ortalama 5.1 embriyo elde edildiği bildirilmektedir. Bu bildiride ineklerden 0 ile 101 arasında değişen sayıda oosit, 0 ile 50 arasında değişen sayıda ise embriyo üretilebildiği bildirilmektedir. Süperovulasyon uygulamasına oluşan yanıtların önemli düzeyde farklı olduğu bildirilmiştir. Teegne ve ark. (1997) ise Bos Indicus ve Bos Taurus melezlerinden sunulan bu çalışmada da olduğu gibi bir PGF_{2α} ve FSH uygulaması yaparak, ineklerden süperovulasyon başına 2.7 nakledilebilir embriyo elde ettiklerini bildirmektedir. Bu çalışmada ise bu değer 1.5 şeklinde gerçekleşmiştir. Bu sonuç Teegne ve ark. (1997)'nin sonucundan daha düşük görünmektedir. Sonuçlar arasındaki farklılık çalışmalarda kullanılan ırk ve bölgesel özelliklere göre şekillenmiş olabilir.

Hasler (2004) vericilerde süperfolikülasyon amacıyla yapılan hormonal uygulamalara cevap yetersizliği gibi nedenlerin nakledilebilir embriyo üretiminde önemli bir sorun olduğunu bildirmektedir. İneklerde süperovulasyon uygulamalarına

oluşan düşük cevaplar için değişik nedenlerin varlığı ileri sürülmektedir. Embriyo transfer çalışmalarında süperovulasyon uygulamalarına ineklerde oluşan cevabın yetersizliği ile ilişkili olarak değişik çalışmalarda, çalışma sırasında ovaryumda bulunan dominant folikül varlığının etkili olduğu gösterilmiştir (Grasso ve ark., 1989; Wilson ve ark., 1990). Ancak, Savio ve ark. (1991) süperovulasyon tetiklenmesine karşı oluşan yetersiz cevapları izah etmek için ovaryumda dominant folikül bulunmasının yalnız başına yeterli olmadığını belirtmiştir. Dominant foliküllerin kimi özellikleriyle, ineklerde süperovulasyon veriminin artırılmasına katkı sağlayabileceği de anlaşılmıştır. Bu kapsamda recombinant DNA teknolojisi ile bovine FSH üretimi gerçekleştirilmiştir (Chappel ve ark., 1988). Bovine FSH ile yapılan çalışmalar ineklerde süperovulasyon veriminin artırılmasına önemli katkı sağladığını ortaya koymuştur (Wilson ve ark., 1989). Süperovulasyona oluşan yetersiz cevabın ineğin yaşlılığından kaynaklanabileceğini ortaya koyan literatürler de (Donaldson, 1984; Hasler ve ark., 1983; Lerner ve ark., 1986) bulunmaktadır. Bütün bunlara ek olarak ineklerde embriyoların % 8'inin uterus yıkama zamanında (7. günde) uterusu taşınamadığını bildiren kaynaklar da vardır (Valencia ve ark., 2005). Embriyoların uterusu geçiken taşınaması ovidukt içindeki siliar harekette etkili olan hormonal dengesizlikle açıklanmaktadır (Armstrong, 1993).

Barati ve ark. (2006) yaz ve kış mevsiminde süperovulasyon cevabına çevrenin etkisini araştırdıkları çalışmada, yaz mevsiminde sıcaklıkların 25 ile 44°C, kış aylarında ise -3 ile 20 °C arasında değiştiğini ve çevre sıcaklığının süperovulasyon cevaplarını etkilemediğini bildirmektedir. Çalışmada süperovulasyon için Folltropin-V (FSHp) kullanılmış ve süperovulasyon uygulamasına oluşan cevaplar, ultrason ile korpus luteum sayılarının belirlenmesi yöntemiyle saptanmış, ineklerde yaz için 8.9, kış dönemi için ise 9.2 oranında korpus luteum gözlendiği bildirilmektedir. Barati ve ark. (2006) ineklerde 9.4 düvelerde 11.8 korpus luteum sayısı ile Valencia ve ark. (2005)'nin bildirmiş olduğu korpus luteum değerleri, kış mevsiminde gerçekleştirilen bu çalışmada ultrasonla tespit edilen 4.6 ± 2.7 oranına gözlenen korpus luteum değerleri ile kıyaslandığında bu çalışmada tespit edilen korpus luteum oranının daha düşük olduğu görülmektedir. Çalışmalar arasındaki süperovulasyona oluşan cevaplar arasındaki

farklılıklar çalışmalarda kullanılan inek ırklarının ve süperovulasyon için kullanılan hormon preparatlarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Barati ve ark. (2006) yaz ve kış mevsiminde yaptıkları çalışmanın kış döneminde üç değişik hormon dozunun denendiği üç gruptan ortalama olarak 2.4 oranında nakledilebilir embriyo elde ettiklerini bildirmektedirler. Bu çalışmada ise nakledilebilir embriyo oranı 1.5 olarak gerçekleşmiştir. Sonuçlar genelde benzerlik gösterse de bu çalışmadan elde edilen nakledilebilir embriyo oranının biraz düşük olduğu görülmektedir. Sonuçlar genelde benzer olduğundan, arasındaki farklılıklar çalışmalarda kullanılan hormon dozları ve inek ırklarına bağlı olarak şekillenmiş olabilir. Yine bu çalışmada ineklerden elde edilen nakledilebilir embriyo sayısından daha iyi sonuçlar, Valencia ve ark. (2005) tarafından, düvelerden 5.0, ineklerden 3.9 şeklinde bildirilmektedir.

Sunulan bu embriyo transfer çalışmasında alıcı ve taşıyıcılar arasındaki senkronizasyon için $PGF_{2\alpha}$ kullanılmıştır. Çalışmada süperovulasyon için kullanılan Ovagen isimli preparatın prospektüsünde $PGF_{2\alpha}$ ile kullanım programı yer almamaktadır. Yapılan literatür taramasında Ovagen'in $PGF_{2\alpha}$ ile kullanımına kimi farklılıklarla oldukça sınırlı rastlanmaktadır (Tegegne ve ark., 1997). Sunulan bu çalışmanın östrüs gözlem sonuçları ve süperovulasyon sonuçları göz önüne alındığında $PGF_{2\alpha}$ ile Ovagen'in başarıyla kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Barati ve ark. (2006) azalan dozlarda tekrarlanan domuz FSH'ı ile 11 gün ara ile $PGF_{2\alpha}$ 'yı birlikte kullanarak ineklere senkronizasyon ve süperovulasyon uygulamışlar ve başarılı sonuçlar almışlardır. Çalışmalarda farklı kaynaktan elde edilmiş FSH preparatlarının $PGF_{2\alpha}$ ile birlikte senkronizasyon ve süperovulasyon amacıyla az çok farklı programlar çerçevesinde kullanılması bu çalışmada kullanılan senkronizasyon ve süperovulasyon programını destekler niteliktedir (Riha ve ark., 2002; Barati ve ark., 2006).

İneklerde süperovulasyon için uygulanan hormon preparatlarının ovaryum için foliküler dalgalanmaya uygun olması gerektiği bildirilmektedir (Ginther ve ark., 1989; Mapletoft ve Bó, 2004). Ancak, yapılan araştırmalar foliküler dalgalanmalar arası sürenin farklı olması gibi nedenlerden dolayı ineklerde süperovulasyon uygulamalarının % 80'inde optimal zamanlamanın yapılamadığını ve bu nedenle elde edilen verimin

düştüğünü ortaya koymaktadır (Mapletoft ve Bó, 2004). Ek olarak ineklerde süperovulasyon uygulamalarına alınan cevabın süperstimülasyon sırasında ovaryumda bulunan çapı 5-6 mm'den daha geniş (antrumlu) foliküller ve bunların hormonal etkilerinden dolayı sınırlandığı bildirilmektedir (Bungartz ve Niemann, 1994). Bu nedenle süperovulasyon uygulamalarına başlamadan inek ovaryumundaki antrumlu foliküllerin ultrason yardımı ile alınması gerektiği değişik kaynaklarda bildirilmektedir (Kim ve ark., 2001; Bungartz ve Niemann, 1994; Shaw ve Good, 2000). Sunulan bu çalışmada süperovulasyon için hormon uygulamasına başlamadan önce vericilerin ovaryumlarında antrumlu folikül varlığı ya da antrumlu foliküllerin alınması gibi bir uygulama yapılmamıştır. Bu çalışmada elde edilen süperovulasyon cevapları uygulamanın foliküler dalgalanma ile asenkronize olması ya da ovaryumda bulunabilecek antrumlu folikül varlığı ile de sınırlanmış olabilir.

Bu çalışmada verici olarak kullanılan Holstein düvede ultrason ile kızgınlık döneminde görüntülenen foliküllerin, korpus luteum gözlenmesi sırasında halen varlığını koruduğu tespit edildi. (Şekil 12, Tablo 5). Bu ve buna benzer sorunlar embriyo transfer çalışmalarında karşılaşılabilen durumlar arasındadır (Nigro ve ark., 1996). Önceleri anovulasyon sorunlarına karşı değişik kaynaklarda LH ve LH karakterinde hormon kullanımı yaygındı. Ancak, yapılan araştırmalarda, LH kullanımının embriyo transfer çalışmasında verici olarak kullanılan anovulasyon sorunu sergileyen ineklerde nakledilebilir embriyo sayısını artırırken, normal ovaryum fonksiyonuna sahip ineklerde nakledilebilir embriyo sayısını artırmadığı tespit edildiğinden LH uygulaması zamanla terk edilmiştir (Nigro ve ark., 1996; Mapletoft ve Bó, 2004). Sunulan bu çalışmada da ovulasyonu tetiklemek üzere LH ve LH etkili hormon uygulaması yapılmadı. Zira bu düve vericilerin seçimi kapsamında yapılan muayene ve kontrollerde sorunsuz olarak tespit edilmişti. Verici olarak kullanılan Holstein düvede anovulasyon sorunu gözlenmesi, çalışmanın ilginç sonuçlarından biri olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak, embriyo transfer çalışmasına verici olarak seçilen düvelerin çalışmadan daha önceki bir diöstrüs döneminde, Foley kateteri ile serviksin geçilmesi denenerek seçilen düvenin uterus yıkaması işlemine uygunluğunun belirlenmesi, koyun FSH'u içeren Ovagenin azalan dozlarda belirli bir program çerçevesinde prostaglandin

senkronizasyonu ile başarılı bir şekilde kullanılabileceği, işletmenin en üstün genetik zincirini taşıyan ineklerden işletme şartlarında daha kısa sürede daha fazla yavru alınabileceği, üstün genetik yapılı vericilerden elde edilmiş üstün genetik yapılı embriyoların yurt dışından ithal edilerek saha şartlarında nakledilerek yavrular alınabileceği, kaliteli embriyo ithali ile yerli ve verimsiz damızlık hayvanlarımızın taşıyıcı olarak kullanılması ile işletmeye daha fazla verim katabilecekleri ve ilerlemiş ülkelerde sun'i tohumlamanın yerine geçmek üzere olan embriyo transferinin saha şartlarında uygulanabileceği ortaya konmuştur.

Deneyssel nitelikte olan bu çalışmanın, natif embriyo naklini içeren birinci bölümünde, ineklerde süperovulasyon, tohumlama, embriyo eldesi, değerlendirmesi ve nakliyle reproduktif yönetim ve embriyo tekniklerinin saha şartlarında uygulanabileceği ve başarılı sonuçlar alınabileceği ortaya konmaktadır. Yine çalışmanın dondurulmuş embriyo naklini içeren kısmında ise çözüm sonrası kriyoprotektan maddelerin uzaklaştırılmasını gerektirmeyen, direkt yöntemle %50'ye yakın gebelikler elde edilmiş olması, deneyssel olarak 1985 yılında embriyo transferi ile ilk yavru alınan ülkemizde, saha şartlarında embriyo nakil çalışmalarını yaygınlaştıramayan hayvancılığımız açısından büyük önem taşımaktadır.

Bilindiği gibi sun'i tohumlama çalışmalarına 1949 yılında başlayan, 1970 yılından bu yana dondurulmuş sperma ile sun'i tohumlama yapan, ancak, sürekli ve kabul edilebilir bir gebelik oranının yakalanamaması nedeniyle, hayvanlarını olması gereken ıslah düzeyine ulaştıramayan ülkemizin, reproduktif tekniklerde ileri olan ülkeleri yakalaması mümkün görülmemektedir. Sun'i tohumlamada başarı sağlansa bile, 6-7 generasyonda belirgin bir ıslah sağlayabilen sun'i tohumlama ile ıslah oldukça zor görünmektedir. Bugün Orta ve Kuzey Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri gibi ülkelerde embriyo transferi ıslah ve üstün genetik yapının devamlılığını sağlamak amacıyla yaygın olarak uygulanmaktadır. Türkiye hayvancılığında da embriyo transfer çalışmalarının uygulanması kaçınılmaz görünmektedir.

Embriyo nakil çalışmaları hayvancılıkta reproduktif teknolojiler açısından çok özel bir konuma sahiptir. Bugün ileri ülkelerde, gerek deneyssel ve gerekse saha uygulaması yapılan, laboratuvar hayvancılığı (in vitro production), transgenik sürülerin

oluşturulması, farmasotik amaçlı hayvancılık, üstün gen kaynağı taşıyan yüksek verimli hayvanları kopyalama ve kopya sürülerin oluşturulması ve identik ikizler oluşturma gibi bir çok üstün tekniğin uygulanmasında embriyo transferine ihtiyaç duyulmaktadır. Kısacası hayvancılıkta ilerleme çabaları büyük oranda bilim adamlarının embriyo tekniklerini kavramasına ve uygulamasına bağlıdır. Bu alışma, gerek natif ve gerekse donmuş embriyonun naklinden gebelikler elde ederek bu alana dikkat çekmektedir.

Bu alışma, direkt transfer yöntemine uygun olarak hazırlanan ve dondurulan embriyolar ile saha şartlarında sun'i tohumlama uygulaması konusunda bilgi ve becerisi olan veteriner hekimlerin sun'i tohumlamaya benzer kolaylıktaki bir uygulama ile embriyo transferi yapabilecekleri ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda, veteriner hekimlerin dikkatleri, embriyo transfer alanına çekilebilir ve veteriner hekimlere yönelik embriyo transferi kursları açılarak ülkemizde hızla embriyo transfer tekniği yaygınlaştırılabilir.

Ülkemizde giderek artan çok sayıda damızlık inek barındıran orta ve büyük ölçekli işletmelerde önemli bir sorun olan damızlık ikamesi sorunu embriyo trasfer tekniği ile çok rahat çözülebilir görünmektedir. Halen 300 ile 700 dolar arasında değişen embriyo fiyatlarının giderek daha da düşeceği göz önüne alınırsa embriyo transfer tekniğinin önemi daha iyi anlaşılacaktır.

Ülkemiz hayvancılığında dişi damızlıkların sayıca fazla olmasına karşın genetik açıdan üstün verim nitelikleri taşımadıkları ve embriyo transferi ile bir nesilde hızlı bir genetik ilerleme sağlanabildiği gerçeğinden hareketle natif ve özellikle de dondurulmuş embriyonun direkt transfer tekniği ile sahaya aktarılması üstün gen kaynaklarının hayvan popülasyonumuz içinde yaygınlaşmasına katkıda bulunabilir.

ÖZET

Mersin S, İneklerde natif ve dondurulmuş embriyo nakli üzerine saha çalışması, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, VAN, 2009. Bu çalışmada ineklerde natif ve dondurulmuş embriyo transferinin saha şartlarında uygulanması ve sonuçlarının araştırılması amaçlandı. Çalışmanın birinci kısmında verici ineklerden süperovulasyon ile çoklu embriyo üretimi, değerlendirmesi ve nakli, ikinci kısmında ise ithal edilen dondurulmuş embriyoların alıcılara nakli gerçekleştirildi. Çalışmada, 18-21 aylık 2 adet düve ve 3-6 yaşlı 4 adet inek verici, 3-7 yaşlı 25 adet inek ise taşıyıcı olarak toplamda 31 adet hayvan kullanıldı. Hayvanlar 11 gün arayla 2 PGF_{2α} (i.m.; 15 mg of Klopriptenol) enjeksiyonu ile senkronize edildi. Birinci PGF_{2α} uygulamasından sonraki 8. gün sabah başlayan süperovulasyon, 17.6 mg oFSH'ın (Ovagen, 1., 2., 3. ve 4. günde azalan dozlar halinde sırasıyla 2.55, 2.55, 2.55, 2.55, 2.12, 2.12, 1.27 ve 1.27 mg günlük 2 enjeksiyon) bölünmüş dozlar halinde enjeksiyonuyla uyarıldı. İkinci PGF_{2α} enjeksiyonundan 36 saat sonra 4 gün süreyle, her 12 saate bir kızgınlık tespiti yapıldı. Vericiler kızgınlığın gözlenmesinden sonra 10., 24. ve 36. saatte 3 kez dondurulmuş sperma ile tohumlandı. Dondurulmuş sperma payetleri 34 °C'deki suda 30 sn süreyle çözüldü. Vericilerde oluşan ovaryum yanıtları ultrason yardımıyla folikül ve korpus luteum takibi ve uterus yıkamasından sonra elde edilen embriyo sayısı ile belirlendi. Östrüs tespitinden 7 gün sonra, epidural anestezi ve hafif sedasyon altındaki vericilerin uterusları, 2 kanallı Foley kateteri kullanılarak 1000 ml hazır yıkama medyumuyla yıkandı. Embriyoların yıkanması, değerlendirilmesi ve transfer pipetinde konumlandırılarak hemen naklinde, kullanıma hazır % 0.4 bovine serum albumin (BSA) ve 25 mg/L oranında Kanamycin Sulphate içeren Emcare™ Holding Solution (ICPbio) kullanıldı. Nakledilebilir olarak değerlendirilen 6 adet embriyo hemen epidural anestezi altındaki taşıyıcılara nakledildi. Embriyolar korpus luteumla ipsilateral kornuya nakledildi. Çalışmanın ikinci kısmında, 9 adet dondurulmuş embriyo kullanıldı. Dondurulmuş embriyolar alıcılara kızgınlığın başlamasından 183±3saat sonra nakledildi. Vericilerde FSH ve PGF_{2α} ile östrüs arasında geçen ortalama süre sırasıyla düvelerde 145.00±0.70 ve 55.00±7.77 ineklerde 159.00±12.66 ve 70.42±7.19 saat olarak saptanmıştır. Taşıyıcı ineklerde PGF_{2α} ile östrüs arasında geçen süre 77.20±7.75 idi. Vericilerde süperovulasyona cevap olarak oluşan folikül ve korpus luteum sayısı sırasıyla, 6.17±1.17 ve 4.67±1.12 olarak bulundu. Verici başına ortalama 3.75±0.75 embriyo elde edildi. Korpus luteum sayısı ile elde edilen embriyo sayısı arasındaki ilişki önemli bulundu (P<0.05). Folikül sayısı ile embriyo sayısı arasındaki korelasyon önemsizdi (P>0.05). Düvelerde serviks geçilemediğinden uterus yıkanamadı. Verici başına ortalama nakledilebilir embriyo sayısı 1.5 olarak bulundu. Natif ve dondurulmuş embriyo transferinden sırasıyla % 50.00 ve %44.44 oranında gebelik elde edildi. Çalışma sonunda natif ve dondurulmuş embriyo transferinin saha şartlarında uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnek, Süperovulasyon, Natif, Dondurulmuş, Embriyo, Nakli

SUMMARY

Mersin S, A field study on fresh and frozen embryo transfer in cows, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Institute of Health Sciences of Yüzüncü Yıl University, Ph.D Thesis, Van, 2009. The aims of the study were to evaluate that result of embryo transfers by using fresh or frozen ones in the field conditions. In the first part of the study, embryo production by means multiple ovulation, collecting, classification and transfer of embryos, in the second part, transfer of frozen thawed embryos by direct transfer method and their results were evaluated. In the study, 2 heifers and 38 cows totally 40 animals were used. Donors, 2 heifers aged 18-21 months and 4 cows aged 3-6 years old and recipients, 25 cows aged 3-8 years old, were synchronized by using PGF_{2α} analogue (15 mg of Cloprostenol, i.m.) 11 days apart. Superovulation was induced by twice daily injections of overall 17.6 mg ovine FSH (Ovagen) that was given by decreasing doses as follow, 2.55, 2.55, 2.55, 2.55, 2.12, 2.12, 1.27 and 1.27 mg on 8-12 days after I.PGF_{2α}. Oestrous detection was performed every 12 h for 4 days starting 36 h after the second PGF_{2α} injection. The donors were inseminated tree times with frozen semen at 10, 24 and 36 h after the first standing heat. Payets were thawed in a water bath at 34°C for 30 seconds. The superovulation responses of donors were estimated by scanning of ovarian follicle and corpus luteum by using an ultrasound equipped with a 5/7.5 MHz transducers and embryos after uterine flushing. To embryo collection each donors' uterus was flushed by using Foley catheter with 1000 ml of (ICPbio Emcare Complete) medium on 7 day after detection of oestrus, under epidural anaesthesia and light sedation. The complete holding solution, containing bovine serum albumin, % 0.4, and Canamycin sulphate, 25 mg/l was used to processing of embryos such as washing, searching, evaluating and loading of embryos into transfer payets. The six transferable embryos were transferred into uterine horn ipsilateral to the recipient's corpus luteum, under epidural anaesthesia, as soon as possible. In the second part of the study, 9 frozen embryos were used. Embryos were thawed in water bath at 35°C for 20 sec and loaded transfer gun. Frozen thawed embryos were transferred into recipient by direct transfer method within 183±3 hours after onset of natural oestrus. The time from FSH and PGF_{2α} to onset of standing heat in donors was found to be in heifers, 145.00±0.70 and 55.00±7.77, in cows 159.00±12.66 and 70.42±7.19 hours. The time from PGF_{2α} to standing heat in the recipients was found 77.20±7.75 hours. The response of superovulation in based ovarian follicle and corpus luteum was found to be 6.17±1.17 and 4.67±1.12, respectively. The mean embryo per donor was found to be 3.75±0.75. The correlation between numbers of corpus luteum and collected embryos was found statistically important (P<0.05). There was not a correlation between numbers of follicle and collected embryos (P>0.05). Because of permanent problems with inserting the Foley catheter into cervical opening, donor heifers' uterus could not be flushed. The mean of transferable embryos per donor was found to be 1.5. The pregnancy rate after transfer of fresh and frozen embryos was found to be 50.00 and 44.44 %, respectively. It was concluded that transfers with fresh or frozen embryos could be preferred for rapid genetic improvement in field conditions.

Key words: Cow, Superovulation, Fresh, Frozen, Embryo, Transfer

KAYNAKLAR

Adams GP (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. J. Reprod. Fertil., 54 (Suppl.), 17-32.

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP and Ginther OJ (1992). Association between surges of follicle stimulating hormone and emergence of follicular waves in heifers. J Reprod. Fert., 94, 177-188.

Agca Y (1994). Post-thaw survival and pregnancy rates of intact and biopsied and sexed in vitro produced bovine embryos after vitrification. Master Thesis, University of Wisconsin-Madison, Madison WI, USA.

Alaçam E (1994). Reprodüktif Hormonların Klinikte Uygulanmaları, in 'Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun`i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite' Editor, E Alaçam, Birinci baskı, 37-49, Dizgievi, Konya.

Anonim 1. http://www.fp7.org.tr/tubitak_content_files//285/FAFB/FABRE/Ahmet_Gedik_Hayvancilikta_Ozel_Sektor_Uygulamalari-ALL_LANGUAGE.pdf, (Erişim: 20.12.2007).

Anonim 2. http://www.adana.gov.tr/?sayfa=5&alt=tarim_arastirma. (Erişim: 20.12.2007).

Anonim 3, Hinshaw RH., Beal WE, Whitman SS. Roberts III S. Effects of embryo freezing method on pregnancy rate following bovine embryo transfer <http://www.ashbyvets.com/research/AABP98ET.PDF> (Erişim: 20.09.2008).

Anonim 4, İleri Kİ, Türkiyede ilk embriyo transferinden elde edilmiş buzağılar. http://www.haberinyeri.net/Bilim/3-4-kopya-kuzu-daha-yolda..._4914.html (Erişim: 20.01.2009).

Anonim 5, Vyas S, Rai AK, Goswami PK, Singh AK, Sahani MS and Khanna ND, Superovulatory response and embryo recovery after treatment with different gonadotrophins during induced luteal phase in Camelus dromedaries, http://openmed.nic.in/745/01/openemed_1.1.doc (Erişim: 21.01.2009).

Anonim 6, Selk G Embryo Transfer in Cattle <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-1993/ANSI-3158web.pdf> (Erişim: 25.08.2008)

Anonim 7, Ovagen Product Sheet (PDF) <http://www.icpbio repro.com/docs/ovagen.pdf>, (Erişim: 03.09.2008)

Armstrong DT (1993), Recent advances in superovulation of cattle. Theriogenology, 39, 7-24.

- Bağış H, Odaman H, Sağirkaya H and Dinnyes A. (2002), Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 173-179.
- Barati F, Niasari-Naslaji A, Bolourchi M, Razavi K, Naghzali E, Sarhaddi F, (2007), Pregnancy rates of frozen embryos recovered during winter and summer in sistani cows. *Iranian Journal of veterinary research*, University of Shiraz, 8, 2, 19, 151-154.
- Barati F, Niasari-Naslaji A, Bolourchi M, Sarhaddi F, Razavi K, Naghzali E, Thatcher WW (2006), Superovulatory response of sistani cattle to three different doses of fsh during winter and summer, *Theriogenology*, 66, 1149–1155.
- Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer Cl (2003), Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solidsurface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*, 59, 1839-1850.
- Betteridge KJ, (1981), An historical look at embryo transfer. *J. Reprod. Fertil.* 62, 1–13.
- Betteridge KJ (1977), Embryo transfer in farm animals. Monograph, 16 Agriculture, 92, Ottawa, Canada .
- Betteridge KJ, (2003), A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques., *Animal Reproduction Science*. 79, 3, 203-244.
- Biedl A, Peters H, Hofstätter R, (1922), Experimentelle studien über die einnistung und weiterentwicklung des eies im uterus. *Z. Geburtsshilfe Gynäk.* 84, 59–130.
- Biggers JD, (1991), Walter Heape, FRS, A Pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. *J. Reprod. Fertil.* 93, 173–186.
- Bindon BM, Piper LR, Cahill LP, Driancourt MA, O'Shea T (1986), Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*, 25, 53-70.
- Bo GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H and Mapletoft RJ (2002), The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 53-72.
- Boland MP, Goulding D, Roche JF (1991), Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35(1), 5-17.
- Bondioli KR, Westhusin ME and Looney CR (1990), Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33(1), 165-174.
- Bungartz L, Niemann H (1994), Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fert.*, 101, 583-591.
- Butler WR (2003), Energy balance relationships follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest. Prod. Sci.*, 83(2/3), 211-218.

Callesen H, Greve T and Hyttel P (1986), Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 25(1), 71-86.

Casida LEA, Nalbandov V, McShan WH, Meyer RK and Wisnicky W. (1940) Potential fertility of artificially matured and ovulated ova in cattle. *Proc. Am. Soc. An. Prod.*, 32, 302.

Castro Neto AS, Sanches BV, Binelli M, Seneda MM, Perri SH, Garcia JF (2005), Improvement in embryo recovery using double uterine flushing, *Theriogenology*, 63, 1249–1255.

Chang MC, (1947), Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. *Nature*, 159, 602–603.

Chappel S, Looney C, Bondiolo K (1988), Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology*, 29, 235.

Christensen LG (1991), Use of Embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology*, 35(1), 141-149.

Chupin D, Cognié, Y, Combarnous Y, Procureur R, Saumande J (1987), Effect of Purified Lh and Fsh on Ovulation in The Cow and Ewe. In 'Follicular growth and ovulation rate in farm animals' Editors, Roche, JF and O'Callaghan, D Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 66-72.

Coleman DA, Dailey RA, Leffel RE, Baker RD, (1987), Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients, *J. Dairy Sci.*, 70, 858-866.

Contreras DA, Galina CS, Avila JG, Aspron MP, Moreno-Mendozad N (2008), A System to evaluate the quality of frozen embryos through short-term culture, *Animal Reproduction Science*, 106, 369–379.

Dawson J (2000) Bovine embryo transfer. In *Practice*, 22, 80-89.

De Roover R, Bols PEJ, Genicot G, Hanzen C (2005), Characterisation of low, medium and high responders following fsh stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. *Theriogenology*, 63, 1902–1913.

Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X (2000), High developmental rates of vitrified ovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 63, 513-518.

Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S (1998), Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 49, 1051-1058.

Donaldson LE (1986), Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle, *The Veterinary Record.*, 118(24), 661-663.

Donaldson, L E (1984), Effect of age of donor cows on embryo production. *Theriogenology*, 21, 963.

Donaldson, LE, Ward, DN (1986), Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. *Veterinary Record*, 119, 625-626.

Donaldson, LE, Ward, DN, Glenn, SD (1986), Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 25, 747-757.

Elsden RP, Nelson, L D and Seidel, G E (1978), Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, 9, 17.

Evans ACO (2003), Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. dom. Anim.*, 38 (4), 240-246.

Fair T (2003), Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.*, 78(3-4), 203-216.

Ferguson JKW (1941), A study of the motility of intact uterus at term. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 73, 359-66.

Foote, RH (1975), Estrus detection and estrus detection aids. *J. Dairy Sci.*, 58, 248-256.

Getz I, Karadjole M, Samardzija M, Makek Z, Matkovic M, Dobranic T, Cergolj M, (2007), Comparison of different synchronization protocols on OPU/IVF results in FSH stimulated simmental heifers. A.E.T.E. 23rd Annual Meeting, 7-8 September 2007.

Ginther OJ (2000), Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.*, July 2, 60-61, 61-79.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989), Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fert* 87, 223-230.

Goff AK, Greve T, Bousquet D and King WA (1986), Progesterone and luteinizing hormone profiles in heifers used as oocyte donors. *Theriogenology*, 26(5), 577-586.

Gökçen H (2007), Ab uyum sürecinde ülkemizde suni tohumlama ve embriyo transferi çalışmalarının geçmişi ve geleceği. Ab Veteriner Hekim Platformu Raporu Rapor No: 4 <http://www.abveteriner.org/dosyalar/SuniTohumlamaRaporu.doc>

Gong JC, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R, (1996), Suppression in the secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone,

and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin releasing hormone agonist. *Biol Reprod.*, 55, 68-74.

Grasso F, Guilbault LA, Roy GL, Lussier JG (1989), Ultrasonic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with Fsh-p at the beginning of the estrous cycle, *Theriogenology*, 31, 1209-1220.

Greve T, Bousquet D, King WA and Betteridge KJ (1984), In vitro fertilization and cleavage of in vivo matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 22(2), 151-165.

Greve T., Callesen H. and Hyttel P. (1989), Follicular correlates with in-vitro fertilization in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 38 (Suppl.), 117-126.

Greve T, Callesen H, Hyttel P, Høier R and Assey R (1995), The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 43(1), 41-50.

Greve, T and Callesen, H (2005), Embryo technology, implications for fertility in cattle, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24(1), 405-412.

Hafez ESE (1987a), Folliculogenesis, Egg Maturation and Ovulation. In 'Reproduction in Farm Animals', Ed: ESE Hafez, 130-167, Lea Febiger, Philadelphia.

Hafez ESE (1987b), Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryos, In 'Reproduction in Farm Animals', Ed, ESE Hafez, 571-600, Lea Febiger, Philadelphia.

Hafez ESE (1987c), Embryo transfer, IVF and Genetic Engineering, In 'Reproduction in Farm Animals', Ed: ESE Hafez, 528-570, Lea and Febiger, Philadelphia.

Hahn J (1992), Attempts to explain and reduce variability of superovulation, *Theriogenology*, 38, 269-275.

Hanzen CH, Pieterse M, Scenczi O, Drost M. (2000), Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *Vet J.*, 159, 161-70.

Hasler JF, (2004), Factors Influencing the success of embryo transfer in cattle, 23rd World Buiatrics Congress, Quebec, July 11-16.

Hasler JF (2003), The Current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*, 79 (3-4), 245-264.

Hasler JF, McCauley, AD, Schermerhom, EC and Foote RH (1983), Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 9, 83.

Hasler JF, (1998), The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *J. Anim. Sci.*, 76 (Suppl. 3), 52-74.

Hasler JF, (2001), Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56, 1401-1415.

Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH, (1987), Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27,139–168.

Hawk HW (1988), Gamete transport in the superovulated cow. *Theriogenology*, 29, 125–142.

Heape W, (1890), Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc. Roy. Soc. London*, 48, 457–458.

Herrler A, Elsaesser F, Parvizi N, Niemann H, (1991), Superovulation of dairy cows with purified fsh supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology*, 35, 633-643.

Heuweiser W, Oltenacu PA, Lednor AJ, Foote RH (1997) Evaluation of different protocols for prostaglandin synchronization to improve reproductive performance in dairy herds with low estrus detection efficiency, *J Dairy. Sci.*, 80, 2766-2774.

Hunter RHF (1982) *Reproduction of Farm Animals*, 1-160, London, Logmann,

Hunter RHF (1988), *The fallopian tubes: their role infertility and infertility*. Springer-Verlag, New York, Berlin and Heidelberg, 191.

Hunter RHF (2003), *Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation*. Cambridge University Press, New York, 397.

Hyttel P, Fair T, Callesen H and Greve T (1997), Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47(1), 23-32.

Ikemoto S, Mukoyama H, Suzuki S And Furuhashi T (1964) Immunological studies of Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) I, preparation of anti-PMSG and its application to the pregnancy test. *Proceedings of the Japan Academy*, 8; 679-682.

İleri İK (2002), Embriyo Transferi. 17. Bölüm, In ‘Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun’i Tohumlama’. Editör, İK İleri, K Ak, S Pabuccuoğlu ve S Birler. 1. Baskı. İÜ. Veteriner Fakültesi yayınları. 133, İstanbul.

Ireland J, Roche JF (1983), Development of nonovulatory antral follicles in heifers changes in steroid in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*, 112, 150-156.

Ireland JJ and Burns DS (2003), Numbers of antral follicles that grow during different follicular waves in individual cattle are highly repeatable. *Biol. Reprod.*, 68 (Suppl.), 327.

Jun W, WenFa L, XiChun L, ChunQiang W, KeJun W, GuangHui Wand Wang H (2004), Effects of different fsh on superovulation of cow. Journal of Jilin Agricultural University, 26(5), 554-560.

Kafi M, McGowan, M (1997), Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. Animal Reproduction Science, 48, 137-157.

Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N (1995), Manuel of Bovine Embryo Transfer. Japan Livestock Technology Association, p: 1-432.

Kanuya N, Callesen H, Hyttel P, Assey R, Greve T (1997), Superovulatory response of dairy cattle (bos taurus) in a tropical environment Theriogenology, 47, 8, 1583-1593.

Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP (1997), Superovulation in cattle: Effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. Animal Reproduction Science, 46, 1-14.

Kim HI, Son DS, Yeon H, Choi SH, Park SB, Ryu IS, Suh GH, Lee DW, Lee CS, Lee HJ, Yoon JT (2001), Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. Theriogenology, 55, 937-945.

King KK, Seidel GE, Jr, Elsden RP (1985), Bovine embryo transfer pregnancies: abortion rates and characteristics of calves. J. Anim. Sci., 61, 747-757.

Lane Mw, Ahern Tj, Lewis Im, Gardner Dk, Peura Tt (1998), Cryopreservation and direct transfer of in vitro produced bovine embryos: a comparison between vitrification and slowfreezing. Theriogenology, 49, 170.

Leibo SP, Mapletoft RJ (1998), Direct Transfer of cryopreserved cattle embryos in North America. In 'Proceedings of the 17th Annual Convention of the AETA', San Antonio, Texas, 91-98.

Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskeep EK, Dailey, RA, Lewis, P E and Butcher R L (1986), Age, dose of fsh and other factors affecting superovulation in Holstein cows. J. Anim. Sci., 63, 76.

Lindeberg H, Kananen-Anttila, K, Kaimio I, Vartia K, Halmekytö M, (2007), A field-moet studying pregnancy rates of biopsied, frozen-thawed embryos of top breeding dairy cattle. A.E.T.E. 23rd Annual Meeting, 7-8 September, 2007.

Lindner GM, Wright RW (1983), Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology, 20, 407-416.

Lopes da Costa L, Chagas e Silva J, Robalo Silva J (2001), Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle, Theriogenology, 56, 66-77.

Mapletoft RJ, Bó GA (2004), The control of ovarian function for embryo transfer: superstimulation of cows with normal or abnormal ovarian function, 23rd World buiatrics Congress. Quebec, July, 11-16.

Mapletoft, RJ and Hasler JF (2005), Assisted reproductive technologies in cattle: a review, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24(1), 393-403.

Martinez Ag, Matkovic M (1998), Cryopreservation of bovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 49, 1039-1049.

Maurer RR, (1978), Freezing mammalian embryos: A Review of The Techniques, *Theriogenology*, 9, 45-68.

Mermillod P, Oussaid B and Cognié Y (1999), Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 54 (Suppl.), 449-460.

Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, (2003), Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59, 651-674.

Mihm M and Bleach ECL (2003), Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 78(3-4), 217-237.

Moore, NW (1975), The control of time of estrus and ovulation and the induction of superovulation in cattle. *Austr. J Agric Res.*, 26, 295-304.

Mori, J (1999), Textbook on advances farm animal embryo transfer hormone research. JICA., Japan.

Mutter LR, Graden AP and Olds D. (1964) Successful non-surgical bovine embryo transfer. *AI Digest.*, 12, 3.

Nasser L, Adams GP, Bo GA, Mapletoft RJ (1993), Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40, 713-724.

Newcomb R, Rowson LEA, Trounson AO (1976), The entry of superovulated eggs into the uterus. in 'egg transfer in cattle'. Ed, Rowson Lea, Commission European Communities, Luxembourg, 310.

Nicholas JS, (1933), Development of transplanted rat eggs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 30, 1111-1113.

Nigro M, Burry E, Mapletoft RJ, Bó GA, (1996), Respuesta superovulatoria en vacas lecheras tratadas con lutropin-v en la primera inseminación. II. *Simp Internac Reprod Anim*, Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 267 abstr.

- Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y, (2000), The relationship of blood progesteron and estrogen concentration on the day before and the day of frozen-thawed embryo transfer to pregnancy rate in japanese black beef cattle. *J. Reprod. Dev.*, 46, 235-243.
- Nowshari Ma, Brem G (2000), The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 53, 1157-1166.
- Palasz AT, Gustafsson H, Rodriguezmartinez H, Gusta L, Larsson B, Mapletoft Rj (1997), Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. *Theriogenology*, 47, 865-879.
- Palasz AT, Mapletoft RJ (1996), Cryopreservation of mammalian embryos and ocytes: Recent Advances. *Biotechnol. Adv.*, 14, 127-149.
- Peixoto MGCD, Pereira CS, Bergmann JAG, Penna VM and Fonseca CG (2004) Genetic parameters of multiple ovulation traits in Nellore females. *Theriogenology*, 62, 1459–1464.
- Petyim S (2002), Ovum Pick-Up in Dairy Heifers. Ph.D. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 44.
- Pieterse MC, Taverne MAM, Kruip AM, Willemse AH (1990), Detection of corpora lutea and follicles in cows: A comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *Vet. Rec.*, 126, 552-554.
- Pincus G, Kirsch RE (1936), The sterility in rabbits produced by injections of oestrone and related compounds. *Am. J. Physiol.*, 115, 219–228.
- Pugh PA, Ankersmith AEL, Mcgowan LT, Tervit HR (1998), Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: Effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology*, 50, 495-506.
- Pugh PA, Tervit HR, Neimann H (2000), Effect of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Anim. Reprod. Sci.*; 58, 9-22.
- Purcell SH, Beal WE, Gray KR (2005), Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle, *Theriogenology*, 64, 867–878.
- Quaresma MA Lopes da Costa L, Robalo Silva J (2003), Superovulation of mertolenga cows with two FSH preparations (FSH-P and Folltropin) *RPCV.*, 98(546) 81-84.
- Reeves JJ (1992), Endocrinology of Reproduction. In, 'Reproduciton in Farm Animals' Editor, ESE Hafez, 5th ed. Lea and Febiger, 85-107.

Říha J, Machatková M, Pavlok A (2002), Viability of fresh and frozen transferred ivp bovine embryos, Czech J. Anim. Sci., 47(7), 261–267.

Robertson L, Cattoni, JC, Shand, RI and Jeffcoate, IA (1993), A critical evaluation of ultrasonic monitoring of superovulation in cattle. British Vet. Jour., 149, 477-484.

Rowson LEA, Dowling DF (1949), An apparatus for the extraction of fertilized eggs from the living cow. Vet. Rec., 61, 171.

Ruane J and Smith C (1989), The genetic response possible in dairy cattle improvement by setting up a multiple ovulation and embryo transfer (MOET) nucleus scheme. Genet. Selec. Evol., 21, 169-183.

Saacke RG, Nadir S and Nebel RL (1994), Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. Theriogenology, 41(1), 45-50.

Sağırkaya H, Bağış H (2003), Memeli embriyolarinin kriyoprezervasyonu U. Univ. J. Fac. Vet. Med., 22 (1-2-3), 127-135.

Santos JEP, Cerri RLA, Sartori R, (2008), Nutritional management of the donor cow, Theriogenology, 69(1), 88-97.

Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC, (2004), Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with x-sorted or unsorted sperm, Anim. Reprod., 1(1), 86-90.

Savio JD, Boland MP, Hynes N, Roche JF, (1990), Resumption of follicular activity in the early post partum period of dairy cows. J Reprod Fert., 88, 569-579.

Savio, JD, Bongers, H, Drost, M, Lucy, MC and Thatcher WW (1991), Follicular dynamics and superovulatory response in Holstein cows treated with FSH in different endocrine states. Theriogenology, 35, 915.

Schrack FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Wert NE, Wehrman ME (2001), Administration of a prostaglandin inhibitor immediately prior to embryo transfer improves pregnancy rates in cattle. Theriogenology, 55 (Suppl.), 370.

Schrack FN, Scenna FN, Edwards JL, Hockett ME, Saxton AM (2003), More evidence for a direct interaction between prostaglandin f_{2a} and development of bovine embryos. in: proceedings of the CETA and AETA Joint Annu Conv., p. 43–52.

Seidel GE Jr (1981), Superovulation and embryo transfer in Cattle. Science, 211 (4480), 351-358.

Seidel GE Jr and Seidel SM (1991), Training Manual for Embryo Transfer in Cattle. FAO Animal Production and Health Paper 77, Rome, 1-164.

Seidel GE, Eldsen RP, (1989), Embryo Transfer in Dairy Cattle. WH Hoard and Sons Company, USA.

Shaw DW, Good TE (2000), Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 53,1521-1528.

Shore LS, Rios C, Marcus S, Bernstein M, Shemesh M (1998), Relationship between peripheral estrogen concentrations at insemination and subsequent fetal loss in cattle. *Theriogenology*, 50(1), 101-107.

Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP, (2004), A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle, *Theriogenology*, 62, 227–243.

Sirard M-A, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L and Robert C (2003), The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reproduction*, 61 (Suppl.), 117-129.

Spell AR, Beal, WE Corah LR, Lamb GC (2001), Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle, *Theriogenology*, 56, 287-297.

Sprecher DJ, Nebel RL, Whitman SS (1989), The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. *Theriogenology*, 31, 1165-1172.

Sreenan JM, (1978), Non-surgical embriyo transfer in the cow. *J.Reprod. Fertil.* 9, 69.

Sugano M, Shinogi T, Honta I, (2005), Relationship between properties of cervikal mukus and pregnancy after embriyo transfer in recipient heifers and cows. *J. Mamm. Ova. Res.*, 22, 40-44.

Sugano M, Shinogi T, (2002), Superovulation with human menopausal gonadotrophin in Japanese Black Cows. *J.Mamm.Ova. Res.*, 19, 77-80.

Sugie T, (1965) Successful transfer of fertilized bovine egg by non-sugical techniques. *J. Reprod. Fertil.*, 10, 197.

Sungur H ve Yurdaydın N (1994), Sığır embriyosunun dondurulması ve transferi, *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 34, 1-2.

Sungur H, Alaçam E, Tekeli T, Kadak R, Pakdil N, Whitaker, RO (1989), İsviçre esmeri düvelerde dondurulmuş embrio nakli uygulamalari, *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 29, 1-2.

Takahashi, Y, Kanagawa, H (1984), Effects of LH-RH Analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF2 α . *Jpn. J. Vet. Res.*, 32, 183-189.

Teepker G and Keller DS (1989), Selection of sires originating from a nucleus breeding unit for use in a commercial dairy population. *Can. J. anim. Sci.*, 69, 595-604.

Tegegne A; Lahlou-Kassi A; Mukasa-Mugerwa E (1997), The effect of season on superovulatory response, embryo yield and quality in Boran and Boran X Friesian crossbred cows, *Theriogenology*, 47(1), 180.

Tekeli T (1994), Embriyo Nakli, Bölüm: 10, In, 'Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve Infertilite'. Editör, E Alaçam, 1. Baskı, Dizgi evi, Konya.

Thibier M (2003), More Than Half a Million Bovine Embryos Transferred in 2002: A Report of the International Embryo Transfer Society Data Retrieval Committee. *IETS Newsletter*, 21(4), 12-19.

Uechi H, Tsutsumi O, Morita Y, Takai Y, Taketani Y (1999), Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development. *Hum. Reprod.*, 14, 2827-2832.

Umbaugh RE (1949), Superovulation and ovum transfer in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 10, 295-305.

Ushijima M, Eto T, Akiyama K, Miyake K, Kanoh Y, Ogawa S (1993), Application of ballooned cervical dilator for bovine embryo collection. *Journal of Reproduction and Development*, 39, 31-36.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998), Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 51, 53-58.

Valencia J Flores M Sánchez-Aldana A Anta E (2005), Effect of PGF2a Administration before uterine flushing on embryo recovery rate in superovulated cows and heifers, *Veterinaria*, 14, 1-8.

Voeklel SA, Hu, YX, (1992), Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37, 23-37.

Voelkel, SA, (1992), Cryopreservation process for direct transfer of embryos. US Patent 5,160,312. Infigen, Inc. (assignee).

Vyas S, Sahani MS (2002), Real time ultrasonography of ovaries and breeding of the one humped camel (*Camelus Dromedarius*) during the early post partum period., *Animal Reproduction Science*, 59, 179-184.

Waltersa AH, Pryora AW, Baileyb TL, Pearsona RE and Gwazdauskas FC (2002) Milk yield, energy balance, hormone, follicular and oocyte measures in early and mid-lactation Holstein cows. *Theriogenology*, 57(2), 949-961.

- Walton JS, Stubbings RB (1986), Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-friesian cows. *Theriogenology*, 26, 167-177.
- Wang Jh (2000), A Comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation. *Cryobiology*, 41, 1-9.
- Wann RA, Randel RD (1990), Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F2a in multiparous and primiparous Brahman Cows. *J Anim Sci.*, 68, 1389-94.
- Warwick BL, Berry RO, (1949), Inter-generic and intra-specific embryo transfers in sheep and goats. *J. Hered.*, 40, 297-303.
- Warwick BL, Berry RO, Horlacher WR, (1934), Results of mating rams to angora female goats, In, 'Proceedings of the 27th Annual Meeting of the American Society of Animal Production', 225-227.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA and Armstrong DG (2003), Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction*, 61 (Suppl.), 71-90.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972), Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C *Science*, 178, 411-414.
- Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH and Buckner PJ (1951), Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 113 (2931), 247.
- Wilmut I, Rowson L (1973), The successful low temperature preservation of mouse and cow embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 33, 352-353.
- Wilson, J M, Jones, A L and Miller D R (1990), Influence of a dominant follicle on the superovulation response. *Theriogenology*, 33, 349.
- Wilson, J M, Moore, K, Jones, A L and Looney C R (1989), Recombinant bovine folliclestimulating hormone: dose and duration regimens for superovulation of embryo donors. *Theriogenology*, 3, 1, 273.
- Yılmaz, B (1999), *Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi*. Feryal matbaacılık, Ankara
- Zrally Z, Kummer V, Veznik, Z (1980), Use of carbachol for dilation of the cervix in heifers. *Theriogenology*, 13, 217-220.

ÖZET

Mersin S, İneklerde natif ve dondurulmuş embriyo nakli üzerine saha çalışması, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, VAN, 2009. Bu çalışmada ineklerde natif ve dondurulmuş embriyo transferinin saha şartlarında uygulanması ve sonuçlarının araştırılması amaçlandı. Çalışmanın birinci kısmında verici ineklerden süperovulasyon ile çoklu embriyo üretimi, değerlendirilmesi ve nakli, ikinci kısmında ise ithal edilen dondurulmuş embriyoların alıcılara nakli gerçekleştirildi. Çalışmada, 18-21 aylık 2 adet düve ve 3-6 yaşlı 4 adet inek verici, 3-7 yaşlı 25 adet inek ise taşıyıcı olarak toplamda 31 adet hayvan kullanıldı. Hayvanlar 11 gün arayla 2 PGF_{2α} (i.m.; 15 mg of Klosthenol) enjeksiyonu ile senkronize edildi. Birinci PGF_{2α} uygulamasından sonraki 8. gün sabah başlayan süperovulasyon, 17.6 mg oFSH'nin (Ovagen, 1., 2., 3. ve 4. günde azalan dozlar halinde sırasıyla 2.55, 2.55, 2.55, 2.55, 2.12, 2.12, 1.27 ve 1.27 mg günlük 2 enjeksiyon) bölünmüş dozlar halinde enjeksiyonuyla uyarıldı. İkinci PGF_{2α} enjeksiyonundan 36 saat sonra 4 gün süreyle, her 12 saate bir kızgınlık tespiti yapıldı. Vericiler kızgınlığın gözlenmesinden sonra 10., 24. ve 36. saatte 3 kez dondurulmuş sperma ile tohumlandı. Dondurulmuş sperma payetleri 34 °C'deki suda 30 sn süreyle çözüldü. Vericilerde oluşan ovaryum yanıtları ultrason yardımıyla folikül ve korpus luteum takibi ve uterus yıkamasından sonra elde edilen embriyo sayısı ile belirlendi. Östrüs tespitinden 7 gün sonra, epidural anestezi ve hafif sedasyon altındaki vericilerin uterusları, 2 kanallı Foley kateteri kullanılarak 1000 ml hazır yıkama medyumuyla yıkandı. Embriyoların yıkanması, değerlendirilmesi ve transfer pipetinde konumlandırılarak hemen naklinde, kullanıma hazır % 0.4 bovine serum albumin (BSA) ve 25 mg/L oranında Kanamycin Sulphate içeren Emcare™ Holding Solution (ICPbio) kullanıldı. Nakledilebilir olarak değerlendirilen 6 adet embriyo hemen epidural anestezi altındaki taşıyıcılara nakledildi. Embriyolar korpus luteumla ipsilateral kornuya nakledildi. Çalışmanın ikinci kısmında, 9 adet dondurulmuş embriyo kullanıldı. Dondurulmuş embriyolar alıcılara kızgınlığın başlamasından 183±3saat sonra nakledildi. Vericilerde FSH ve PGF_{2α} ile östrüs arasında geçen ortalama süre sırasıyla düvelerde 145.00±0.70 ve 55.00±7.77 ineklerde 159.00±12.66 ve 70.42±7.19 saat olarak saptanmıştır. Taşıyıcı ineklerde PGF_{2α} ile östrüs arasında geçen süre 77.20±7.75 idi. Vericilerde süperovulasyona cevap olarak oluşan folikül ve korpus luteum sayısı sırasıyla, 6.17±1.17 ve 4.67±1.12 olarak bulundu. Verici başına ortalama 3.75±0.75 embriyo elde edildi. Korpus luteum sayısı ile elde edilen embriyo sayısı arasındaki ilişki önemli bulundu (P<0.05). Folikül sayısı ile embriyo sayısı arasındaki korelasyon önemsizdi (P>0,05). Düvelerde serviks geçilemediğinden uterus yıkanamadı. Verici başına ortalama nakledilebilir embriyo sayısı 1.5 olarak bulundu. Natif ve dondurulmuş embriyo transferinden sırasıyla % 50.00 ve %44.44 oranında gebelik elde edildi. Çalışma sonunda natif ve dondurulmuş embriyo transferinin saha şartlarında uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnek, Süperovulasyon, Natif, Dondurulmuş, Embriyo, Nakli

SUMMARY

Mersin S, A field study on fresh and frozen embryo transfer in cows, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Institute of Health Sciences of Yüzüncü Yıl University, Ph.D Thesis, Van, 2009.

The aims of the study were to evaluate that result of embryo transfers by using fresh or frozen ones in the field conditions. In the first part of the study, embryo production by means multiple ovulation, collecting, classification and transfer of embryos, in the second part, transfer of frozen thawed embryos by direct transfer method and their results were evaluated. In the study, 2 heifers and 38 cows totally 40 animals were used. Donors, 2 heifers aged 18-21 months and 4 cows aged 3-6 years old and recipients, 25 cows aged 3-8 years old, were synchronized by using PGF_{2α} analogue (15 mg of Cloprostenol, i.m.) 11 days apart. Superovulation was induced by twice daily injections of overall 17.6 mg ovine FSH (Ovagen) that was given by decreasing doses as follow, 2.55, 2.55, 2.55, 2.55, 2.12, 2.12, 1.27 and 1.27 mg on 8-12 days after I.PGF_{2α}. Oestrous detection was performed every 12 h for 4 days starting 36 h after the second PGF_{2α} injection. The donors were inseminated three times with frozen semen at 10, 24 and 36 h after the first standing heat. Payets were thawed in a water bath at 34°C for 30 seconds. The superovulation responses of donors were estimated by scanning of ovarian follicle and corpus luteum by using an ultrasound equipped with a 5/7.5 MHz transducers and embryos after uterine flushing. To embryo collection each donors' uterus was flushed by using Foley catheter with 1000 ml of (ICPbio Emcare Complete) medium on 7 day after detection of oestrus, under epidural anaesthesia and light sedation. The complete holding solution, containing bovine serum albumin, % 0.4, and Canamycin sulphate, 25 mg/l was used to processing of embryos such as washing, searching, evaluating and loading of embryos into transfer payets. The six transferable embryos were transferred into uterine horn ipsilateral to the recipient's corpus luteum, under epidural anaesthesia, as soon as possible. In the second part of the study, 9 frozen embryos were used. Embryos were thawed in water bath at 35°C for 20 sec and loaded transfer gun. Frozen thawed embryos were transferred into recipient by direct transfer method within 183±3 hours after onset of natural oestrus. The time from FSH and PGF_{2α} to onset of standing heat in donors was found to be in heifers, 145.00±0.70 and 55.00±7.77, in cows 159.00±12.66 and 70.42±7.19 hours. The time from PGF_{2α} to standing heat in the recipients was found 77.20±7.75 hours. The response of superovulation in based ovarian follicle and corpus luteum was found to be 6.17±1.17 and 4.67±1.12, respectively. The mean embryo per donor was found to be 3.75±0.75. The correlation between numbers of corpus luteum and collected embryos was found statistically important (P<0.05). There was not a correlation between numbers of follicle and collected embryos (P>0.05). Because of permanent problems with inserting the Foley catheter into cervical opening, donor heifers' uterus could not be flushed. The mean of transferable embryos per donor was found to be 1.5. The pregnancy rate after transfer of fresh and frozen embryos was found to be 50.00 and 44.44 %, respectively. It was concluded that transfers with fresh or frozen embryos could be preferred for rapid genetic improvement in field conditions.

Key words: Cow, Superovulation, Fresh, Frozen, Embryo, Transfer