

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM VE REPRODÜKSİYON HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
REPRODÜKSİYON VE SUN'I TOHUMLAMA BİLİM DALI

TAVŞANLARDA UTERUS YIKAMASI
YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN EMBRYOLARIN KALİTE VE
KANTİTESİ ÜZERİNE BAZI SÜPEROVULATÖR AJANLARIN
ETKİLERİ

111633

111633

DOKTORA TEZİ

SEMA USTA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

DANIŞMAN

Doç.Dr.I.Kamuran İLERİ

111633



Bu alışma TüBiTAK tarafından VHAG-812 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŐEKKÜR

Bağta Doktora danıőmanım olan hocam Doç.Dr.i.Kamuran ileri olmak üzere, Anabilim Dalımız Baőkanı hocam Prof.Dr.Adnan Özkoca'ya değerli bilgi ve desteklerini esirgemediklerinden teőekkürlerimi arz ederim.

Ayrıca ęalıőmalarım sırasında bana yardımlarından dolayı Araő.Gör.Dr.Serhat Pabuęęuoęlu ve Bilim Dalımızda görevli diğer arkadaşlarıma teőekkürü borę bilirim.

iÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	3
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	5
2.1. EMBRYO TRANSFERİ.....	5
2.1.1. Embryo transferinin tarihçesi.....	5
2.1.2. Tavşanlarda embryo transferi.....	6
2.1.3. Embryo transfer planı.....	8
2.2. SÜPEROVULASYON.....	9
2.2.1. Süperovulatör ilaçlar.....	9
2.2.1.1. Gonadotropinler.....	10
2.2.1.2. Sentetik preparatlar.....	16
2.2.2. Süperovulatör ilaçların embryo kalite ve kantitesine etkileri.....	17
2.2.3. Süperovulasyonun hayvanların sonraki reproduktif yaşamına etkisi.....	19
2.3. EMBRYOLARIN KAZANILMASI.....	19
2.3.1. Cerrahi metot.....	19
2.3.2. Cerrahi olmayan metot.....	22
2.3.3. Otopsiden sonra embryo kazanılması.....	23
2.4. EMBRYOLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	23
2.5. ALICILARIN HAZIRLANMASI VE TRANSFER.....	25
3. MATERYAL VE METOT.....	29
3.1. PMSG grubu.....	29
3.2. HMG grubu.....	29
3.2.1. Toplam 75 iü. HMG'nin tek enjeksiyonla verilmesi.....	30
3.2.2. Toplam 75 iü. HMG'nin 3 ayrı enjeksiyonla verilmesi.....	30
3.3. Clomiphene citrate grubu.....	30
3.4. Kontrol grubu.....	30

3.5. Uterus yıkaması yöntemi ile embryoların kazanılması.....	31
3.6. Embryo transfer.....	33
3.6.1. Vericilerin hazırlanması.....	34
3.6.2. Alıcıların hazırlanması.....	34
4. BULGULAR.....	37
4.1. Süperovulasyon çalışmaları.....	37
4.1.1. Ovaryum reaksiyonları.....	37
4.1.1.1. PMSG grubu.....	37
4.1.1.2. HMG grubu.....	38
4.1.1.3. Clomiphene citrate grubu.....	38
4.1.1.4. Kontrol grubu.....	39
4.1.2. Kazanılan hücre sayıları.....	40
4.1.3. Kazanılan sağlıklı embryoların sayısı.....	42
4.1.4. Ovum ve dejenere embryo sayıları.....	45
4.2. Transfer ve gebelik oranları.....	46
4.2.1. Deneme grubu.....	46
4.2.2. Kontrol grubu.....	47
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	49
6. ÖZET.....	58
7. SUMMARY.....	63
8. LİTERATÜR LİSTESİ.....	67
9. RESİMLER.....	76
10. ÖZGEÇMİŞ.....	82

1. GİRİŞ

Bilindiği gibi hayvancılık çoğu ülkede önemli bir gelir kaynağı durumundadır. Özellikle gelişmiş ülkelerde birçok biyoteknolojik yöntemin yardımıyla hayvan ıslahında büyük aşamalar kaydedilmiştir. Büyük bir hayvan potansiyeline sahip olan ülkemizde kültür sığır ırkı ve melezlerinin oranı çok düşük düzeyde olmasına rağmen, bu yönde yapılan ıslah çalışmaları sadece sun' i tohumlama uygulamaları ile sınırlı kalmıştır. Oysa özellikle son yıllarda daha da önem kazanan embryo transferi çalışmaları ile dişi materyali de kullanarak hayvan ıslahında kısa sürede ilerlemeler kaydedilebilmektedir. Bu yöntemle kalıtsal açıdan iyi özelliklere sahip bir dişiden yılda bir yerine 15-20 yavru elde etmek mümkün olmaktadır. Büyük evcil hayvanların östrus siklusları esnasında genellikle tek ovulasyon şekillendiği göz önüne alınırsa, gerek embryo transfer çalışmaları ve gerekse in vitro çalışmalarda süperovulasyon tekniği bir zorunluluk haline gelmektedir. Embryo transferinin amacına ulaşabilmesi için üstün vasıflı hayvanlardan, fazla sayıda sağlıklı embryo kazanmak ve bu embryoları alıcı olarak seçilen verim düzeyleri düşük dişilere transfer etmek gerekmektedir. Kazanılan embryolarda fertilizasyon oranının düşük olması veya embryoların kalitesinde gözlenen değişiklikler uygulamaları güçleştirmekte, bu yüzden de uygun bir süperovulasyon tekniği saptanmasının her bakımdan yararlı olacağı düşünülmektedir.

Yeni yöntemlerin oturtulmasında deney hayvanları ile çalışmak, ekonomik ve teknik açıdan büyük evcil hayvanlara kıyasla çok daha uygun olmaktadır. Böylece de elde edilen deneyimler büyük evcil hayvanlara kolaylıkla adapte

edilebilmektedir. Deney hayvanları içerisinde reproduktif organları ve fizyolojisi açısından manipülasyonlara en uygun tür olan tavşan, bu tip çalışmalarda tercih edilmektedir.

Çalışmamızda tavşanlarda en uygun süperovulatör preparatı seçerek süperovulasyon tekniğini geliştirmek ve böylece embryo transferi ve ilgili çalışmalarda yeterli sayı ve kalitede embryo elde etmek amaçlanmıştır. Bunun için çeşitli süperovulatör preparatlar kullanarak tedavi edilmiş tavşanlardan uterus yıkaması yöntemiyle kazanılan embryolarda (96 saatlik) gözlenen dejenerasyonların, süperovulatör ajanlara bağlı olup olmadığı ve tavşanların süperovulatörlerin değişik doz ve kullanım yöntemlerinden ne şekilde etkilendiği araştırılmıştır. Ayrıca seçilen en uygun preparatın kullanımı ve kazanılan embryoların alıcılara transferi ile, bu preparatın gebelik oranı üzerine etkisi belirlenmek istenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. EMBRYO TRANSFERİ:

2.1.1. Embryo transferinin tarihçesi: Embryo transferi, donör olarak isimlendirilen verici dişiden sağlıklı embryoların toplanıp, resipient adı verilen alıcı dişilere transfer edilmesi işlemlerini kapsayan bir tekniktir. Bu konudaki ilk çalışmanın Walter Heape tarafından 1890 yılında tavşanlarda gerçekleştirildiği bildirilmesine rağmen (10,14,15,25,39,55,56,63), embryo transfer tekniklerine ancak 1940'lı yıllarda ilgi duyulmaya başlanmıştır. Çiftlik hayvanlarında koyun ve keçilerde 1949'da, domuz ve ineklerde 1951 yılında ilk başarılı embryo transfer çalışmaları gerçekleştirilmiştir(10,55,63). Bunu takip eden yıllarda tavşan ve koyunların kullanıldığı araştırmalar ile embryo transfer tekniği hızla gelişmiş ve ilerlemiştir(5,39,63).

Çeşitli hayvan türlerinde gerçekleştirilen ilk başarılı embryo transfer çalışmaları Tablo 1'de yer almaktadır(10).

Tablo 1. ilk başarılı embryo transfer araştırmaları:

<u>Tarih</u>	<u>Tür</u>	<u>Araştırmacı</u>
1891	Tavşan	Heape
1933	Rat	Nicholas
1934	Koyun	Warwick ve ark.
1934	Keçi	Warwick ve ark.
1942	Fare	Fekete ve Little
1949	inek	Umbaugh
1949	Keçi	Warwick ve Berry
1951	inek	Willet ve ark.
1951	Domuz	Kvasnickii
1964	inek	Mutter ve ark.
1968	Ferret	Chang
1974	At	Oguri ve Tsutsumi
1976	Baboon	Kraemer ve ark.
1978	insan	Steptoe ve Edwards
1978	Kedi	Schrifer ve Kraemer
1979	Köpek	Kinney ve ark.

Domuz ve ineklerden başlangıçta hayvanın öldürülmesi ile embryolar kazanılırken, 1928 yılında bu uygulama Allen ve ark. tarafından cerrahi yöntemle gerçekleştirilmiş ve bu yıllardan sonra cerrahi yöntem, daha çok uygulama alanı bulmuştur(10). 1970'li yıllardaki değişik türlerde uygulanan yoğun çalışmalar ise embryo transferinin gelişmesine yardımcı olmuştur(63).

Ülkemizde ilk olarak 1982 yılında Kılıçoğlu ve ark.(37) tarafından tavşanlarda başlatılan çalışmalara, daha sonra değişik kuruluşlarda ve farklı hayvan türlerinde devam edilmiştir. Fakültemizde deney hayvanları dışında sığırlarda yapılan çalışmalar sonucu, ilk buzağı 1985 yılında doğmuştur. Ülkemizdeki embryo transfer çalışmaları yıllara göre Tablo 2'de yer almaktadır.

Tablo 2. Ülkemizdeki embryo transfer çalışmaları.

<u>Tarih</u>	<u>Tür</u>	<u>Araştırmacı</u>
1982	Tavşan	Kılıçoğlu ve ark.(37)
1984	Tavşan	Özkoca ve ark.(49)
1984	Koyun	Kılıçoğlu ve ark.(38)
1986	Siğir	ileri ve ark.(31)
1986	Siğir	ileri ve Sayın(32)
1990	Siğir	Sönmez(59)
1990	Ankara keçisi	Kılıçarslan(36)

2.1.2. Tavşanlarda embryo transferi: Memeli embryosunun tanınması ve erken embryonik gelişimin ortaya konmasında tavşanlardan büyük ölçüde yararlanılmıştır. İlk başarılı embryo transferi tavşanlarda uygulanmış ve gamet araştırmaları için yapılan çalışmalarda da genellikle bu tür tercih edilmiştir. Ticari embryo transfer uygulamaları çoğunlukla sığırlarda

yapılırken, araştırma çalışmaları büyük ölçüde laboratuvar hayvanlarında gerçekleştirilmiştir(10,27,39,56). Gerek barındırma ve besleme koşullarının daha kolay ve ucuz olması, gerekse genital organları ve embryolarının maniplasyonlara elverişliliği nedeniyle tavşanlar birçok araştırmacı tarafından deney hayvanı olarak tercih edilmiştir(10,27,37,44,49,50).

istenilen gelişim dönemindeki embryoların kazanılması tavşan gibi provake ovulasyon yapan hayvanlarda daha kolay olduğu için, kültür çalışmalarının hemen hemen hepsi başlangıçta tavşan embryoları ile yapılmıştır. Tavşanların birçok yönden embryo kazanımı, transfer ve deneysel gebelik maniplasyonlarını kapsayan araştırmalar için çok uygun olduğu ifade edilmiştir(34,2).

Tavşanların genital organ anatomileri incelendiğinde, iki ayrı servix ile vaginaya açılan iki uzun kornuya ve iyi gelişmiş fimbria ile sonlanan oviduktlara sahip oldukları görülmektedir. Çiftlik hayvanlarının aksine tavşanlar düzenli östrus siklusları göstermemektedir. Yabani tavşanlar belirli bir anöstrus periyodu göstermekte ve reproduktif faaliyetlerinde mevsimsel farklılıklar bulunmaktadır. Evcil tavşanlarda anöstrus süresi türlere ve bireylere göre değişmektedir. Bazı dişi tavşanlar yıl boyunca fertilken, bir çoğu yılda 1-2 ay anöstrus göstermektedirler. Reproduktif faaliyetlerinde mevsimsel değişiklikler gözlenebilen evcil tavşanlar, uygun şartlar altında uzun bir süre boyunca folliküler devrede kalmaktadırlar. Bu devrede ovulasyon gerçekleşmezse ovaryumlarda folliküller devamlı olarak gelişmekte ve regrese olmaktadır. Tavşanlarda ovulasyonun, çiftleşme, LH enjeksiyonları, başın veya spinal kordun lumbal bölgesinin elektriksel stimülasyonu ya da diğer dişilerle temas sonucu şekillenen orgasm gibi stimülasyonlardan yaklaşık 10-13 saat sonra meydana geldiği bildirilmiştir(2,25,26,57).

Maurer (44)'in bildirdiğine göre, çiftleşmeden sonra

tavşan embryolarının gelişimi ve reproduktif kanaldaki lokalizasyonu Tablo 3'de görüldüğü gibidir.

Tablo 3. Çiftleşmeden sonra embryoların gelişimi ve reproduktif kanaldaki lokalizasyonu:

Embryo gelişim devresi	Çiftleşmeden sonraki süre(saat)	Lokalizasyon
Zigot	14-12	Ovidukt
2 hücreli	20-28	Ovidukt
4 hücreli	26-32	Ovidukt
8 hücreli	32-44	Ovidukt
Morula	60-72	Ovidukt-Uterus
Blastosist	70-144	Uterus

2.1.3. Embryo transfer planı: Birçok araştırmacı embryo transferi ile ilgili teknikleri; süperovulasyon, donör ve resipientlere östrus senkronizasyonu uygulanması, embryoların kazanılması, değerlendirilmesi ve saklanması, ve embryoların transferi olarak sınıflandırmışlardır (31,36,43,48,49,50,55).

Pineda ve Bowen(52), embryo transfer işlemindeki olaylar zincirinin; donörün sevk ve idaresi, tabii veya sun'î tohumlama, donörden embryo kazanılması ve değerlendirilerek kısa zaman saklanması ile bu embryoların uygun resipientlere transferini kapsadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, donör ve resipientlerin düzenli sağlık kontrollerinin ve her yönden detaylı bir kayıt sisteminin de başarılı bir embryo transferi için gerekli olduğunu ifade etmişlerdir.

Trounson ve Rowson(63), evcil hayvanlardaki embryo transferini ve beraberinde getirdikleri teknikleri şu şekilde sınıflandırmışlardır:

a. Süperovulasyon,

- b. Donor ve resipientlerin senkronize edilmesi,
- c. Embryoların cerrahi ve cerrahi olmayan yollarla toplanması,
- d. Embryoların cerrahi ve cerrahi olmayan yolla transferi,
- e. Embryoların saklanması ve transportu,
- f. Mezbaha materyalinden embryo toplanması,
- g. Cinsel olgunluğa erişmemiş veya yaşlı hayvanlardan embryo kazanılması,
- h. Embryolarda sex tayini,
- 1. Embryoların in vitro kültürü ve maniplasyonu.

2.2. SÜPEROVULASYON:

Erkeğin hergün milyonlarca spermatozoit üretmesine karşın, dişi her kızgınlıkta ancak birkaç adet ovum üretmektedir. Bununla beraber, cinsel yönden olgunlaşmış veya olgunlaşmamış dişilere gonadotropinler tatbik edildiğinde, bir östrusta dişinin 20-100 adet yumurta hücreyi üretmesi mümkün olabilmektedir(2,48, 52,54,63).

Hafez(25), üstün genetik özellikli hayvanlardan daha fazla embryo kazanmak için süperovulator uygulamaların embryo transfer programlarında yaygın olarak kullanılmakta olduğunu belirtmiştir.

2.2.1. Süperovulator ilaçlar: Başta gonadotropinler (PMSG,FSH,HMG) olmak üzere farklı hayvanlardan elde edilen pituitar ekstrakt ve GnRH preparatları ile bazı sentetik preparatlar(Clomiphene citrate, difeniletilen türevleri gibi) süperovulasyon amacı ile kullanılmaktadır. LH ve LH etkili HCG preparatları daha çok ovulasyonları teşvik etmek için uygulanmaktadır(2,9,10,16,22,25,29,35,39,43,48,52,54,63).

2.2.1.1. Gonadotropinler: Gonadotropik hormonlar pituitar ve plasental kökenli olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Pituitar kökenli gonadotropinler; FSH(Follicle Stimulating Hormon), LH(Luteinizing Hormon) ve HMG(Human Menopausal Gonadotrophin), plasental kökenli gonadotropinler ise; PMSG(Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) ve HCG(Human Chorionic Gonadotrophin) olarak ayrılmaktadır. Süperovulasyon amacı ile en çok kullanılan hormon PMSG olmakla beraber, diğerlerinden de geniş ölçüde faydalanılmaktadır(25,29,46,52).

PMSG ya da bir başka adı ile Equine Gonadotropin(eCG), yaklaşık olarak 60.000 molekül ağırlıkta, yarı ömrü 26 saat olan bir glikoproteindir. Bu hormon, gebe kısrağın uterusundaki endometrium içine göç etmiş fetal plasenta hücrelerinden oluşan endometrial cup'lar tarafından üretilmektedir. Gebeliğin 40. ve 140. günleri arasında kısrağın kanında PMSG'nin mevcut olduğu ve 60. ile 110. günler arasında bir pik yaptığı bilinmektedir. Pituitar LH'ya benzer bazı işlevlere de sahip olmasına rağmen, aktivitesi öncelikle pituitar FSH benzeridir ve bu yüzden PMSG'ye "FSH-benzeri" hormon olarak da isim verilmektedir. Renal filtreden geçemediği için enjekte edilen hayvanın kan sirkülasyonunda veya PMSG'yi üreten gebe kısrağın kanında uzun süre kalmaktadır(13,25,46,51,54).

inek ve diğer hayvanlarda süperovulasyonu stimüle etmek için, PMSG'nin multiple ovulasyon oluşturma yeteneğinden geniş ölçüde yararlanılmaktadır (2,8,9,23,46,47,53,63).

Follicitrophin adı ile de anılan FSH, yaklaşık olarak domuzda 29.000, koyunda 32.000 molekül ağırlığında, yarı ömrü 2-4 saat olan glikoprotein yapısında bir hormondur(46).

LH veya ICSH(Interstitial Cell-Stimulating Hormon) olarak isimlendirilen hormon ise koyun ve sığırdaki yaklaşık 30.000 molekül ağırlığa sahip, yarı ömrü 30 dakika olan bir glikoproteindir(25,46).

HCG yaklaşık 30.000 molekül ağırlığına sahip, 8-12 saatlik bir yarı ömrü olan ve insan plasentasının "syncytiotrophoblastic" hücreleri tarafından salgılanan bir glikoproteindir. HCG, gebeliğin başlangıcından birkaç hafta sonra idrarda görülür, gebeliğin yaklaşık 50. gününde bir pik yapar ve daha sonra azalır. Kimyasal olarak LH'dan farklıdır. Fakat bazı FSH benzeri etkileri olmasına rağmen etkisi öncelikle LH karakterindedir. Bu nedenle süperovulasyon çalışmalarında daha çok ovulasyonları uyarmak amacı ile kullanılmaktadır. Bu hormon maymunlarda da gebeliğin 18. ve 35. günleri arasında serumda mevcuttur (21,25,46).

HMG, menapozdaki kadınların idrarından veya insan hipofizinden elde edilen ve bünyesinde FSH ve LH aktivitelerini beraber bulunduran, bu yüzden de folliküler gelişme ve ovulasyon teşviki amacıyla kullanılan bir gonadotropindir(4,11,21).

Kraemer ve Bowen(39), dişi tavşanlarda süperovulasyonu stimüle etmek amacı ile tek doz 150-200 iü. PMSG (s.c. veya i.m.) ve enjeksiyondan 66-80 saat sonra (çiftleşme zamanında) 50 iü. HCG'nin yaygın olarak kullanıldığını bildirmişlerdir.

Tavşanlarda sun'i tohumlamadan 72 saat önce 150 iü. PMSG'yi i.m. olarak aplane eden Spilman(60), tohumlamadan hemen sonra 100 iü. HCG'yi i.v. olarak uygulamış ve ortalama 48.9 ± 1.8 embryo elde ettiğini bildirmiştir.

Toplam 225 iü. PMSG'yi tek enjeksiyon ve 3 enjeksiyonla olmak üzere iki şekilde uygulayan Pabuççuoğlu(50), hayvan başına ortalama ovaryum reaksiyonlarının tek enjeksiyon yönteminde 25.96 ± 4.96 ve 3 enjeksiyon yönteminde ise 28.46 ± 5.64 olarak elde edildiğini bildirmiştir.

Kılıçoğlu ve Tekeli (37), süperovulasyon amacıyla tavşanlara 150 iü. PMSG (i.m.) uygulamışlar ve bu uygulamadan 66-72 saat sonra çiftleştirilen hayvanlara i.v. olarak 50-75 iü. HCG

enjeksiyonu yapmışlardır. Bu işlemin sonunda ovaryumlarda ortalama 19₊₁ ovulasyon odağı saydıklarını, fakat bu sayıya eşit oranda embryo toplayamadıklarını bildirmişlerdir.

Tavşanlarda PMSG ve HMG'nin etkilerini karşılaştırmak amacıyla çalışan Illera ve ark.(29), 1. gruba 120 iü. PMSG (i.m.), 2. gruba toplam 60 iü. HMG'yi 6 eşit dozda 12'şer saat ara ile vermişler ve her iki gruba çiftleşmeden hemen sonra (1. grupta PMSG uygulamasından 60 saat, 2. grupta son HMG enjeksiyonundan 12 saat sonra) 60 iü. HCG (i.v.) uygulamışlardır. Çiftleşmeden 62 saat sonra kesilen hayvanlarda ovidukt ile uterus yıkaması yaparak elde ettikleri sonuçları, aşağıdaki gibi bildirmişlerdir(Tablo 4).

Tablo 4. Toplam korpus luteum ve follikül sayıları, embryo ve ovulasyon oranları.

	Toplam Folliküller	Cl. sayısı	Embryo sayısı	Ovulasyon (%)	Embryo (%)
HMG	48.8 _{+4.0}	32.2 _{+3.8}	30.8 _{+4.3}	65.9	95.65
PMSG	46.7 _{+4.58}	26.6 _{+2.8}	26.2 _{+4.7}	56.9	98.50
Kontrol	15.5 _{+0.5}	11.0 _{+1.0}	10.5 _{+0.5}	71.61	94.59

Sonuç olarak araştırmacılar(29), HMG ile tedavi edilen hayvanların PMSG ile tedavi edilenlere kıyasla, ovaryumlarının küçük olması, korpus hemorajikum sayılarının az olması ve daha çok embryo kazanılması ile süperovulasyon tedavisine daha iyi cevap verdiklerini belirtmişlerdir.

Süperovulasyon amacıyla günlük 0.4 mg.lık dozlarda 4 gün üst üste metilselüloz ile %1 oranında sulandırılmış FSH'nın s.c. yolla kullanılabileceğini belirten Maurer(44), 4. gün ovulasyonları uyarmak amacı ile PLH verilerek sun'i tohumlama uygulamasının gerekli olduğunu ifade etmiştir. Araştırmacı, tavşanlarda ovulasyonların uyarması için i.v. yolla 0.5 mg./kg.

PLH veya 25 iü. HCG verilerek %100 ovulasyon sağlanabileceğini bildirmiş ve ovulasyon teşvikinin, deneyin tam olarak zamanlanabilmesine ve hayvanlardan maksimum yararlanmaya mücade ettiğini ifade etmiştir.

Jagannadha ve ark.(33), rat ve hamsterlerde, ovulasyonun başlatılması mekanizmasında LH'nin ovulasyon teşviki için gerekli olduğunu ve LH olmadan FSH'nin tek başına ovulasyonu teşvik edemediğini ortaya koymuşlardır. Mc Donald(46) pituitar kökenli LH'nin birçok özelliklerine sahip olan HCG'nin, dişi tavşanlarda ovulasyonu sağladığını ve daha ucuz olması nedeniyle tercih edildiğini bildirmiştir.

Tavşanlarda süperovulasyonu gerçekleştirmek için 3 gün boyunca sabah ve akşam her defasında 0.5 mg. FSH-P ve son enjeksiyondan 24 saat sonra 25 mg. PLH veya 80-100 iü. HCG enjeksiyonu uygulanabileceğini belirten Hahn(26), aynı amaçla 75-150 iü. PMSG ve bundan 72 saat sonra da ovulasyon sağlayıcı bir hormonun kullanılabileceğini ifade etmiştir.

Hatton ve ark.(28), yaptıkları çalışmada 75 iü. PMSG'yi s.c. uyguladıktan 66-68 saat sonra i.v. olarak 50 iü. HCG vererek süperovulasyonu sağlamışlar ve çiftleşmeden 72 saat sonra embryoları toplamışlardır. Tam bir senkronizasyon sağlanabilmesi için, resipientler ile donörlara aynı anda i.v. olarak 50 iü. HCG uygulanması gerektiğini bildiren araştırmacılar, çalışmalarında her bir donörden yaklaşık olarak 25 embryo kazandıklarını ve bunların %70-80'inin 8 hücreli ile morula devresindeki normal embryolar olduklarını belirtmişlerdir.

Tavşanlarda embryo kazanılması ve transferi üzerine yaptıkları bir araştırmada, süperovulasyonu gerçekleştirmek için 2 ayrı PMSG preparatını 150 iü. dozda tek enjeksiyonla aplieden özkoca ve ark.(49), bu uygulamadan 72 saat sonra ise vericilerle alıcılara aynı anda i.v. olarak 100 iü. HCG

vermişlerdir. Araştırmacılar bu uygulamanın sonucunda 7 donör tavşanın ovaryumlarında 70 ovulasyon odağı saydıklarını ve ovidukt yıkaması yöntemiyle 37 embryo ve 11 ovum kazandıklarını bildirmişlerdir.

Kraemer ve Bowen(39), tavşanlarda süperovulasyonu sağlamak amacıyla günde iki kez olmak üzere 3 gün boyunca 0.5 mg. FSH uygulamışlar, son enjeksiyondan 12-24 saat sonra 1.5 mg./kg. LH veya 30-50 iü. HCG (i.v.) verdiklerinde, hayvan başına ortalama 40-60 ovulasyon meydana geldiğini açıklamışlardır.

Tavşanlarda süperovulasyonu sağlamak amacıyla PMSG, HMG ve FSH-P hormonlarının ve bunlarla kombine olarak HCG ve P.LH'nin kullanımını Gabler(19), tablodaki gibi belirtmiştir(Tablo 5).

Araştırmacı (19) , 300E. PMSG / 100E. HCG (Anteron/Primogonyl), 225E.PMSG/75E.HCG (ProlanA/Prolan) ve 75E.HMG/100E.HCG (Humegon/Prolan) kombinasyonlarından %100 başarı sağlamış, tüm folliküllerin ovule olduğunu bildirmiştir. 75E.HMG/100E.HCG (Humegon/Primogonyl) ve 3mg.FSH/100E.HCG (FSH-P/Primogonyl) kombinasyonları ile düşük sonuçlar aldığını (sırasıyla %79.2 ve %80.1) bildiren araştırmacı, en düşük sonucun 120E.PMSG/75E.HCG (Anteron/Primogonyl) kombinasyonu ile (%58.8) elde edildiğini ifade etmiştir.

Tablo 5. Süperovulasyonda kullanılan hormon kombinasyonları.

Hormon Kombinasyonu	Hayvan Sayısı	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün
Anteron/Primogonyl	6	30-50E.i.m.	30-50E.i.m.	30-50E.i.m.	-	50 veya 100E.i.v
Anteron/Primogonyl	17	75E.i.m.	75E.i.m.	75E.i.m.	100E.i.v.	-
Anteron/Primogonyl	6	100E.i.m.	100E.i.m.	100E.i.m.	-	100E.i.v
Prolan A/Prolan	11	50-100E.i.m.	50-100E.i.m.	50-100E.i.m.	-	50 veya 100E.i.v
Humegon/Primogonyl	3	25E.i.m.	25E.i.m.	25E.i.m.	100E.i.v.	-
Humegon/Predalon	5	25E.i.m.	25E.i.m.	25E.i.m.	-	100E.i.v
FSH-P./Primogonyl	32	2x0.5mg.i.m.	2x0.5mg.i.m.	2x0.5mg.i.m.	100E.i.v.	-
FSH-P./P.LH	63	2x0.5mg.i.m.	2x0.5mg.i.m.	2x0.5mg.i.m.	2.5mg.i.v.	-
FSH-P./P.LH	37	2x0.5mg.i.m.	2x0.5mg.i.m.	2x0.5mg.i.m.	3.1mg.i.v.	-

2.2.1.2. Sentetik preparatlar: Ovulasyon oranını artırmak veya ovulasyonu teşvik etmek için gonadotropinler yanında bazı sentetik preparatlar da kullanılmaktadır. Antiöstrojenlerden olan ve kadınlarda anovulatör kısırlık tedavisinde sıkça kullanılan klomifen sitrat bu amaçla hayvanlarda da denenmiştir (4,20,21, 58,65).

Döcke(18), devamlı ışığa maruz bırakılan, küçük hipotalamik lezyonlar oluşturulan veya doğumdan sonra düşük dozlarda testesteron propionat enjekte edilen ratlarda anovulasyonun meydana geldiğini, bu gibi hayvanlara klomifen sitrat uygulandığı hallerde ovulasyonun oluştuğunu bildirmiştir.

Koyunlarda klomifen sitratin etkisini sağlıklı ve kısır koyunlar üzerinde deneyen Lindsay ve Robinson(42), klomifenin bu hayvanlarda zayıf bir östrojen gibi etki göstererek hipofizer aktiviteyi baskıladığını ve anöstrus insidensini artırdığını belirtmişlerdir. Kısır ve sağlıklı koyunlarda sonuçların benzer olduğunu ifade eden araştırmacılar, tüm doz seviyelerinde (0.03-6.8 mg/kg/gün) ovaryum aktivitesinin inhibe olduğunu, buna bağlı olarak folliküllerin gelişmediğini ve ovulasyonların meydana gelmediğini bildirmişlerdir.

Land ve Scaramuzzi(40) tarafından yapılan bir çalışma, klomifenin ara dozlarının(20-25ug.)koyunlardaki ovulasyon oranını artırabildiğini göstermiştir. Araştırmacılar klomifenin dozu arttıkça ovulasyon oranının arttığını (anti-östrojenik etki), fakat daha yüksek dozlarda bu oranın inhibe olduğunu (östrojenik etki) ifade etmişlerdir. Ayrıca ovulasyon oranında maksimum artış gerçekleştiren klomifen dozunun değiştiğini belirten araştırmacılar, klomifen kullanarak koyunlarda ovulasyonu teşvik etmenin veya ovulasyon oranında artışlar elde etmenin mümkün olduğunu, buna rağmen uygun dozu belirlemenin zor olduğunu bildirmişlerdir.

2.2.2. Süperovulatör ilaçların embryo kalite ve

kantitesine etkileri: Başarılı bir embryo transfer programı için, süperovulasyondan sonra sağlıklı embryoların elde edilmesi, her bir hayvandaki stimüle edilmiş ovulasyon sayısından daha önemlidir. Süperovulasyon için kullanılan programlarda karşılaşılan en büyük problem, aynı türlerin bireyleri arasında dahi süperovulasyonda gözlenen büyük sayısal farklılıktır. Zira eksojen gonadotropinlere cevap olarak, hayvanların verecekleri ovum veya embryo sayısını önceden belirleyebilecek geçerli bir yol yoktur.

Mc Donald(46), ticari preparatların etki ve kalitesi, hatta preparatın orjini olan türlerdeki farklılıkların, süperovulatör uygulamadan değişik cevaplar alınmasına neden olabildiğini belirtmiştir. Ayrıca donörün genel sağlığı, laktasyonel durumu ve daha önceki reproduktif performansının da süperovulasyona cevabı kesinlikle etkilediğini, mevsimsel etkilerin de bu değişikliklere yardım ettiğini bildirmiştir.

Hahn(27) süperovulasyon uygulanmış ve uygulanmamış donörlardan kazanılan oositlerin in vitro fertilizasyonu ile elde ettiği tavşan embryolarını alıcı hayvanlara transfer etmiş, süperovulasyon uygulanmış hayvanlardan elde edilen embryolarda daha sık olarak implantasyonu kapsayan gelişim anormalliklerinin meydana geldiğini bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca, süperovulasyonun embryolarda kromozomal anormallikleri teşvik ettiğini ve farelerde süperovulasyonu takiben normal ovulasyona göre daha fazla triploid embryoların meydana geldiğini bildirmiştir(%4.6'ya %10.9). Bu verilere rağmen, süperovulasyonun oositler üzerine negatif genetik etkisinin nispeten az olduğunu ve bu etkinin türlere göre değiştiğini de ifade etmiştir.

Adams (2), süperovulasyon amacıyla FSH kullanılan tavşanlardan elde edilen embryoların transferi sonucu, bu

embryoların gelişme potansiyellerinin çok iyi olduğunu, hatta tedavi uygulanmamış donörlara tercih edildiğini bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca seksüel olgunluğa erişmemiş dişilerin HAP (Horse Anterior Pituitary Hormone) ile tedavisi sonucu kazanılan embryolardan normal yavru gelişebildiğini de ifade etmiştir.

120 iü. PMSG uygulamasından 60 saat sonra 60 iü. HCG aplike ederek çiftleştirilen tavşanlardan hayvan başına ortalama 26.2 ± 4.7 embryo kazanan Illera ve ark.(29), 12 saat arayla 6 kez 10 iü. HMG ve son enjeksiyondan 12 saat sonra 60 iü. HCG vererek çiftleştirdikleri tavşanlardan da hayvan başına ortalama 30.8 ± 4.3 embryo elde etmişlerdir. Aynı araştırmacılar kontrol gruplarında ise ortalama 10.5 ± 0.5 embryo kazandıklarını bildirmişlerdir.

Süperovulasyon amacıyla 75 iü. PMSG ve bunu takiben 66-68 saat sonra 50 iü. HCG enjeksiyonu yaparak hayvanları çiftleştiren Hatton ve ark.(28), çiftleşmeden 72 saat sonra donör başına yaklaşık olarak 25 embryo kazandıklarını ve bu embryoların %70-80'inin gelişim sürelerine uygun sağlıklı embryolar olduklarını bildirmişlerdir.

Equoman forte-Pregnyl kombinasyonu ile süperovule ettikleri tavşanlardan hayvan başına ortalama 5.0 ± 4.35 embryo kazandıklarını belirten Özkoca ve ark.(49), FRH 1000-Pregnyl kombinasyonu ile süperovule ettikleri tavşanlarda ise hayvan başına kazandıkları embryo sayısının 5.5 ± 5.80 olduğunu ifade etmişlerdir.

Morula döneminden daha ileri safhadaki embryoların kazanılması amacıyla süperovulasyon tedavisinin uygulanmaması gerektiğini bildiren Hahn(26), uterusda 8-10 taneden daha fazla embryonun bulunması halinde, embryolardaki dejenerasyonun arttığını belirtmiştir. Aynı araştırmacı, süperovulasyon tedavisi uygulanmamış tavşanlarda 8-10 civarında olan embryo sayısının, süperovulasyondan sonra 25-35'e çıktığını, fakat her iki durumda

da bireysel ve mevsimsel dalgalanmalar olabileceğini ifade etmiştir.

Tek ve üç enjeksiyonda toplam 225 iü. PMSG uygulayan Pabuççuoğlu(50), ovidukt yıkaması sonucu sırasıyla hayvan başına ortalama 14.4 ± 4.45 ve 14.3 ± 3.76 hücre kazanıldığını bildirirken, toplam 75 iü. HMG'yi üçe bölerek aplike eden Ahmad(3) hayvan başına ortalama 41.5 ± 15.93 hücre kazandığını belirtmiştir.

2.2.3. Süperovulasyonun hayvanların sonraki reproduktif yaşamına etkisi: Embryo transferi amacıyla yapılan süperovulasyon ve uterus yıkaması çalışmalarının, ineklerin reproduktif fizyolojilerine yönelik ciddi müdahaleler oldukları ve bu uygulamaların yüksek verimli ineklere zarar verebileceği endişesi mevcut olmasına rağmen, genellikle süperovulasyon ve embryo kazanımının donör ineklerin sonraki reproduktif performansı üzerine etkili olmadığı veya çok az etkili olduğuna inanılmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda süperovulasyon ve uterus yıkamasının reproduktif parametreler, genel sağlık ve süt verimi açısından hiç bir negatif genetik etkisinin görülmediği, bazı hayvanlarda kistik ovaryum gelişmesine rağmen, bu durumun tedaviye cevap verdiği ve ayrıca uterus yıkaması esnasında asepsi kurallarına titizlikle uyulması gerektiği bildirilmiştir(6,7, 30).

2.3. EMBRYOLARIN KAZANILMASI:

Gelişme dönemlerine göre embryolar ovidukt veya uterustan, hayvanların öldürülmesinden sonra kazanıldığı gibi, cerrahi veya cerrahi olmayan yolla canlı hayvanlardan da kazanılabilmektedir. Cerrahi veya cerrahi olmayan yolla embryo toplanmasında çeşitli teknikler uygulanmaktadır (2,44,63).

2.3.1. Cerrahi metot: Cerrahi yöntem genel anestezi altında ve asepsi - antisepsi şartlarına uyularak

gerçekleştirilmektedir(2,25,26,49).

Ovumlar veya erken dönemdeki embryolar ovidukt içerisinde yer almaktadır. Tavşanlarda embryoların çiftleşmeden 72-84 saat yani ovulasyondan yaklaşık olarak 60-72 saat sonra oviduktta uterusu geçtikleri bilinmektedir. HCG tedavisi ile ovulasyonun'u olarak teşvik edildiğinde ovum ve embryoların uterusu geçişi biraz daha hızlanmaktadır. Embryoların kazanılma zamanı, arzu edilen gelişim dönemine göre ayarlanmaktadır. Ovidukt içindeki embryolar ya fimbriadan uterusu doğru veya utero-tubal bağlantı yerinden fimbriaya doğru yıkılarak kazanılmaktadır. Yüksek oranda embryo kazanma açısından fimbriaya doğru olan yıkama yöntemi domuz ve at dışındaki türlerde tercih edilmektedir(2,25,26).

Ovidukt yıkamasının uterusu fimbriaya doğru yapıldığını bildiren Hahn(26), iç çapı 1-2mm.olan polietilen bir borunun fimbria açıklığından yaklaşık 1-2 cm. ovidukt içerisinde sokularak plastik bir pens veya ligatür ile fixe edilip, yıkama sıvısının utero-tubal bağlantı yerinin 1-2cm. gerisinden uterus duvarının küt bir kanülle delinmesi ile verilebileceğini, hatta basınçtan dolayı uterus duvarının patlamasını önlemek için kanülün ovidukt içerisinde yönlendirilmesinin daha uygun olacağını belirtmişlerdir. Ovidukt yıkaması için 5ml. yıkama sıvısının yeterli olduğunu ve polietilen borunun serbest ucu altına saat camı yerleştirilerek sıvının toplandığını bildiren araştırmacılar, yıkama sıvısı olarak %20 tavşan serumu ve sodyum bikarbonat ilaveli TCM 199 kullanmışlardır.

Yıkama sıvısı olarak %20 sığır serumu, 0.5 mg. Streptomycin sülfat/ml. ve 100 İÜ. Penicillin kristalize/ml. ilaveli Ringer solüsyonu kullanan özkoca ve ark.(49), laparatomiden sonra iç çapı 1mm. olan polietilen bir boruyu fimbria ovarikadan ovidukt içerisinde 2-3cm. kadar sokarak iki

parmak arasında fixe etmişlerdir. Yıkama için kornu uteriye utero-tubal bağlantı yerine yakın bir yerden küt bir kanülle delen araştırıcılar, 5ml. yıkama sıvısını ovidukt yönüne doğru zevk ederek, polietilen borunun serbest ucu altına yerleştirilen bir saat camı içerisine toplamışlardır.

Embryoların donör tavşanlardan cerrahi yolla veya tavşanların kesilmesiyle toplanabileceğini bildiren Kraemer ve Bowen(39), ilk 72 saatlik süre içerisinde embryoların toplanması için oviduktun ucu kütleştirilmiş 26-no iğne kullanılarak yıkanabileceğini ve genellikle 2 ml. medyumun bu amaç için yeterli olduğunu belirtmişlerdir. Araştırıcılar, ovidukt yıkaması için iç çapı 0.3-0.5 mm. olan ucu kıvrık bir cam kanülün oviduktun fimbrial sonuna yerleştirilerek elle tutulduğunu ve daha sonra ucu küt bir kanülle utero-tubal bağlantı yerine girilerek 5-8 ml. medyumun verildiğini bildirmişlerdir.

Yıkama işleminde farklı türler için çeşitli modifikasyonlar kullanılmaktadır. Koyun ve keçilerde ovidukt yıkaması kornu uterilerden sıvının verilmesi ve fimbriaya yerleştirilen kanülle bir saat camına toplanması ile gerçeleştirilirken, ineklerde sıvı utero-tubal bağlantı yeri yakınından basınçla ovidukt yönüne doğru uterus içerisine verilmekte ve yine fimbriadan toplanmaktadır. işlemdeki bu farklılıklar utero-tubal bağlantı yeri içerisinden sıvının geçme kolaylığına bağlı olmaktadır. Koyun, keçi ve domuzda embryoların östrus başlangıcından 3 gün, at ve siğırda ise 4 gün sonra oviduktan uterusu geçtikleri ve oviduktan embryo kazanma oranının uterusu göre daha fazla olduğu bildirilmektedir(63).

Daha geç dönemdeki embryoların elde edilmesinde uterus yıkaması yöntemi uygulanmaktadır. Uterus yıkaması yönteminde yıkama sıvısının servixten akmasını önlemek amacıyla servixin hemen ön kısmına, her iki kornu uterinin etrafından geçecek

şekilde ligatür yerleştirilmesi gerektiğini belirten Hahn (26), yıkama sıvısının kornu uterinin kranial ucundan küt bir kanülle girilerek verildiğini ve kornu uteri içerisinde yeterli basınç oluştuktan sonra, arkasına lastik bir hortum takılı sivri uçlu bir iğne ile kornunun kaudal ucunun delindiğini ve böylece hortumun serbest ucuna yerleştirilen petri kutuları ile yıkama sıvısının alındığını bildirmişlerdir. 10-20 ml. yıkama sıvısı kullanan araştırmacılar uterustaki delinen bölgelerin kapatılmasına gerek olmadığını da ifade etmişlerdir.

2.3.2. Cerrahi olmayan metot: Cerrahi olmayan teknikler hem donörün yaşamı ve sağlığı açısından daha az riskli olması, hem de cerrahi tekniklerin postoperatif adhezyonlara sebep olması nedeni ile at ve sığırdaki embryo toplanması amacıyla tercih edilmektedir. Bu metot yara izi, doku komplikasyonları ve adhezyonlar oluşturmadığından, ineklerden tekrarlı embryo kazanımına olanak sağlamaktadır. Fakat cerrahi uygulamaya gerek olmadan rutin olarak kullanımının kolay olması yanında, büyük hayvanlar dışında uygulamasının güç olduğu bildirilmiştir (2,25,63).

Tavşanlarda embrioların cerrahi olmayan yolla toplanabileceğini bildiren Tsutsumi ve ark.(64), bu amaçla fertil bir erkekle çiftleştirildikten sonra 20 iü. HCG enjeksiyonu yapılan tavşanlara, çiftleşmeden sonra farklı zamanlarda Oestradiol benzoate, Oestradiol-17 B, Oestrone ve Oestradiol cyclopenthyll-propionate enjeksiyonları aplike etmişlerdir. Yıkama amacıyla tavşanlar sırt üstü yatırılarak external genital organları dezenfekte edilmiş ve bir kateter vulva içinden servixe kadar yavaşça sokulmuştur. 40⁰ meyille başı yukarıda olacak şekilde yatırılan tavşana yaklaşık 50 ml. yıkama sıvısı kateter içinden enjekte edilmiş ve sıvının geri akması beklenmiştir.

Yıkamada kullanılan kateter, insanlarda üretra için kullanılan 2 yollu balonlu kateterden modifiye edilmiştir.

2.3.3. Otopsiden sonra embryo kazanılması: Bu amaç için tavşanlar servikal dislokasyonla öldürüldüğü gibi(44), bu işlem 200 mg/ml. lik pentobarbiton sodium'un 1-2 ml. miktarında i.v. yolla hızlı enjeksiyonu ile de (2) gerçekleştirilmektedir.

Hayvan öldürüldükten sonra sırt üstü yatırılmakta ve median hat ensizyonu ile reproduktif organlar vücut dışına alınarak yağ ve bağ dokularından temizlenmektedir. Ovidukt, utero-tubal bağlantı yerinden ayrılarak 3-5 ml. yıkama medyumu ile yıkanmaktadır. Daha sonra, ovaryumlar çıkarılıp ovulasyon odakları sayılmaktadır. Uterus yıkaması esnasında ise, toplama kabına kan karışmasını önlemek için organ gazlı bez ile kurutulmaktadır(44).

2.4. EMBRYOLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ:

Transfer edilen embryolardan gebelik elde edilmesi, onların yaşama kabiliyetleri ve gelişme kapasitelerine bağlıdır. Memeli embryolarının yaşama kabiliyeti, genellikle onların morfolojik görünümü, metabolik aktivitesi, in vitro gelişimi veya alıcı annelere transfer edildiği zaman gebelik sağlanması ile tayin edilmektedir. Embryoların yaşama kabiliyetinin mikroskopik olarak değerlendirilme kriterleri; zona pellusidanın kalınlığı, blastomerlerin uniform görünümü, blastomer yapısının homojenliği, simetrinin bulunması, dejenerasyonun görülmesi, tavşanlarda musin mantonun varlığı ve embryonik gelişme işaretlerinin değişmesini kapsamaktadır. Erken morula veya erken blastosist dönemindeki embryoların mikroskopik incelenmesi pratik deneyim gerektiren, güç ve aynı zamanda çok subjektif bir değerlendirme olmasına

rağmen, çalışmanın yapıldığı alanda kullanılabilirdiği ve hemen sonuç verdiği için tercih edilmektedir. Embryo yaşama kabiliyetini tayin etmek için kullanılan diğer metotların; in vitro kültür, diğer türlerin oviduktlarında gelişim, biokimyasal aktivitedeki değişimlerin ölçülmesi ve radyoaktif işaretli prekürsörlerin metabolizması olduğu bildirilmektedir (12,41,44, 61).

Hafez(25), aşağıdaki morfolojik anormalliklerden herhangi birisini gösteren kusurlu embryoların kullanılmaması gerektiğini bildirmiştir.

- a. Değişken uniform büyüklükteki blastomerler,
- b. Morulada hücresele yıkıntılar,
- c. Zona pellusidanın oval şekil alması ve içindeki blastosistin çökmesi,
- d. Parçalanmış mitotik figür,
- e. Belirsiz köpüklü blastomerler,
- f. Sitoplazmik ve nükleer materyalin fragmentleşmesi,
- g. Anormal biçimli morula veya blastosist.

Swanson ve ark. (61) embryo kalitesinin tayin edilmesinde fluoresans boyaların kullanılmasının, morfolojik değerlendirme dışındaki metotlara göre daha hızlı sonuç verdiğini ve fluorescein diacetate, nötral red ve trypan blue'nun sığır, tavşan ve fare embryolarının gelişme veya implantasyon kabiliyetlerini etkilemeden, in vitro yaşama kabiliyetlerini tayin etmek için kullanıldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar acridin orange (AO) ve ethidium bromide (EB) fluoresans boyalarını kullanarak yaptıkları bir çalışmanın sonucunda, EB'nin embryolara toksik bir boya olmadığını ve yaşama kabiliyetini tayin etmek için yararlı bir malzeme olabileceğini belirtmişlerdir.

Dorland ve ark. (17), 7 günlük siğir embryolarında yoğunlukla nötral lipitler içeren, büyüklük ve sayı olarak değişebilen veziküller bulunduğunu ve invert faz kontrast mikroskop ile bu veziküllerin ayırt edilebileceğini bildirmişlerdir. Embryo canlılığı ile bağlantılı olan bu veziküllerin önemini saha uygulamalarında değerlendiren araştırmacılar, süperovule (PMSG/Anti PMSG) ineklerden cerrahi olmayan yolla toplanan embryoları sınıflandırarak senkronize resipientlere transfer etmişlerdir. 2-4 ay sonra rektal palpasyonla gebelikler saptanmış ve en yüksek gebelik yüzdesi hem orta hem de küçük vezikül taşıyan grupta (%71) gözlenmiştir. Sadece küçük vezikül taşıyan gruptaki gebelik oranı % 57 ve aynı anda küçük, orta ve büyük vezikül taşıyan embryolarla gebelik oranı %39 olmuştur. Araştırmacılar embryolardaki lipit miktarının veziküllerin büyüklüğü ile bağlantılı olduğunu, lipit miktarı ve vezikül büyüklüğünün embryonun transplantasyondan sonraki yaşama gücüne yardımcı olan önemli faktörler olduğunu ifade etmişlerdir.

Süperovule etçi donör ineklerden östrustan sonraki 4 ve 7. günler arasında kazandıkları değişik dönemlerdeki embryoları 4 farklı grupta (1=Mükemmel, 2= iyi, 3= Kötü, 4= Dejenere) sınıflandıran Casey ve ark. (12), embryolarda zona pellusida değerlendirmeye alınmadan ölçümler yapmışlardır. Genelde en iyi kalite derecesindeki (Derece 1) embryolar 2. ve 3. kalite derecesindeki embryolarla karşılaştırıldığı zaman, daha büyük çapta olduklarını görmüşler ve ayrıca kötü kaliteli embryoların daha yüksek optik dansiteye sahip olduklarını belirtmişlerdir.

2.5. ALICILARIN HAZIRLANMASI VE TRANSFER :

Başarılı bir embryo transferi için hem verici, hem de alıcının aynı östrus siklusu döneminde olması zorunludur.

Genellikle, östrus siklusu bakımından vericinin süre açısından alıcıdan önde olması halinde daha yeterli gebelik sonucu elde edilmektedir (39,48). Tavşanlarda ovulasyonu stimüle etmek için alıcılara HCG veya GnRH uygulanmakta, tekrarlı uygulamalarda HCG etkisiz kaldığından, GnRH bu amaçla tavsiye edilmektedir (2,39). Ayrıca ovulasyonu teşvik etmek için, tavşanları vazektomize erkeklerle çiftleştirmek de mümkün olmaktadır (24,27,39). Trounson ve Rowson (63), tüm türlerde transfer edilen embryoların %50'sinden daha fazlasında gebelik sağlanabilmesi için, tolere edilebilecek maksimum asenkroni süresinin ± 24 saat olduğunu bildirmişlerdir.

Gelişme dönemlerine bağlı olarak ovidukt veya uterusu transfer edilen embryoların, zigot ve 32 hücreli devreye kadar ovidukta, morula ve daha geç dönemdekilerin uterusu transferlerinin uygun olduğu bildirilmektedir (39). Kural olarak embryolar alındıkları bölgelere göre transfer edilmektedir (39,48).

Embryo transferde en önemli konunun alıcı hayvanların, ovaryumlarında ovulasyon odaklarına sahip olup olmadıkları açısından kontrolü olduğunu belirten özkoca ve ark.(49), kazandıkları embryoları bir enjektöre bağlanan pastör pipetinin kapillar ucuna 0.1 ml. medyum içerisinde çekmişler ve kapillar ucu alıcı tavşanın fimbria ovarikasından ovidukta doğru 2-3 cm. yönlendirmişlerdir. Bu işlemi yaparken kapillar uçtaki sıvının dışarı akmasını önlemek için medyundan sonra bir miktar havanın çekilmesini uygun gören araştırmacılar, pastör pipetinin uç kısmına hafif bir eğim verildiğinde oviduktun daha iç kısmına embryoların transferinin gerçekleşebileceğini bildirmişlerdir.

Senkronizasyonu sağlamak için resipient ve donör tavşanlara aynı ovulatör hormonların (2.5 mg. LH veya 50 iü. HCG) enjekte edildiğini ifade eden Maurer ve ark.(45), az miktardaki

medyum içine çekilen embryoların fimbria ovarikadan 2-3 cm. içeriye bırakıldığını bildirmişlerdir. Normal olarak resipientin her bir oviduktuna 5 embryo transfer ettiklerini belirten araştırmacılar, 2'den daha az embryonun asla transfer edilmemesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Kraemer ve Bowen(39), ovidukta transfer edilecek tavşan embryolarının, bir cam pipet yardımıyla fimbriadan infundibulumu kadar 5-10 mm. sokulduğunu ve transfer sıvısının 0.2 ml. den daha çok olmamasına dikkat edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Tavşanlarda transfer edilen embryo sayısının 5-35 arasında değişmesi gebelik oranı üzerinde önemli bir etki oluşturmazken, transfer edilen embryo sayısı arttığı zaman, implante olan embryo oranında düşüş meydana geldiği, bununla beraber tavşan embryolarında transuterin migrasyon görülmediğinden, fetal yaşamın sürdürülmesi için en az 2 implante olmuş embryonun gerekli olduğu bildirilmektedir(2,39).

Tüm resipientlerde yalancı gebeliğin 50 iü. HCG ile oluşturulduğunu bildiren Hatton ve ark.(28), normal olarak her bir fimbriaya 4-6 embryo transfer edildiğini, fakat embryo bulunmadığı durumlarda bir resipiente 3 adet gibi az sayıda embryo da transfer edilebileceğini bildirmişlerdir.

Tavşan embryolarının erken blastosist döneminde uterusu girdiğini ifade eden Kraemer ve Bowen(39), implantasyonun yaklaşık olarak $6^{3/4}$ günde meydana geldiğini ve geç dönemdeki blastosistlere göre morula veya erken blastosistlerin transferinde daha iyi sonuçlar elde edildiğini belirtmişlerdir.

Ovidukt transferi için pratik bir teknik geliştirmeyi isteyen Sloan ve ark.(56), resipient tavşanların oviduktlarına devamlı kalacak bir kanül yerleştirmişler ve kanülün açık kısmını karın derisine tutturmuşlardır. Aynı araştırmacılar transfer esnasında embryoları pipete çektikten sonra pipeti vücut içindeki

kanüle yerleştirmişler ve dışardan 0.5 ml. medyum vererek transferi gerçekleştirmişlerdir. Verilen sıvının geriye akmaması için kanülün ağız bir müddet kapatılmıştır. Bu yöntemle transfer edilen embryoların %44.4 oranında implante olduklarını bildiren araştırıcılar (56), tüm ihtimama rağmen enfeksiyonun çok büyük problem olduğunu ve ayrıca vücut içindeki kanülede tıkanıklık meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Fare ve tavşan embryoları genellikle laparatomiyi takiben ovidukt veya uterusu cerrahi olarak transfer edilirlerken (27), sığırdaki transferler genel olarak cerrahi olmayan yolla uterusu uygulanmaktadır. ineklerde en iyi gebelik sonuçlarının, 5 günlük veya daha yaşlı embryoların transferinden sonra elde edildiğini belirten Trounson ve Rowson(63), östrüsten sonra embryoların transfer edilebileceği son günün ise, koyunda 12, inekte 16 ve domuzda 7 olduğunu belirtmişler, koyun ve sığırdaki her bir kornuya 1 adet olmak üzere 2 embryonun transferinin %75-85 gebelik oranı ve %55-70 embryo yaşama gücü oranı ile sonuçlandığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırmanın materyalini süperovulasyon çalışmaları için 80, gebelik oranlarının değerlendirilmesi için de 25 adet olmak üzere 105 dişi tavşan oluşturdu. Bu tavşanların tohumlanması için ise 8 adet erkek tavşan kullanıldı. Hayvanların seçiminde, onların aynı ırk, yaş grubu ve ağırlıkta olmalarına özen gösterildi. Ayrıca seçilen hayvanlar aynı bakım ve beslenme şartlarında bulunduruldu.

Tavşanlarda süperovulasyon çalışması için 3 değişik preparat ve onların farklı dozları kullanıldı. Sonuçları karşılaştırmak için de bir kontrol grubu oluşturuldu.

1. PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophine) grubu.
2. HMG (Human Menopausal Gonadotrophine) grubu.
3. Clomiphene citrate grubu.
4. Kontrol grubu.

3.1. PMSG grubu: Bu grupta PMSG (Intergonan, Intervet)'nin 3 farklı dozu denendi.

1. 75 iü. PMSG
2. 150 iü. PMSG
3. 200 iü. PMSG

Her farklı doz için 10 adet dişi tavşan ayrıldı ve ilk 10 tavşana 75 iü. , diğerlerine de 150 iü. ve 200 iü. PMSG i.m. olarak tek enjeksiyonla uygulandı. Ovulasyon zamanını senkronize etmek amacıyla uygulamadan 72 saat sonra tüm tavşanlara i.v. olarak 100 iü. HCG (Human Chorionic Gonadotrophine) verildi ve hayvanlar çiftleştirildi.

3.2. HMG grubu: Bu grupta toplam 75 iü. HMG (Humegon, Organon) iki farklı yöntemle verildi.

1. Toplam 75 iü. HMG'nin tek enjeksiyonla verilmesi.

2. Toplam 75 iü. HMG'nin 3 ayrı enjeksiyonla verililişi.

3.2.1. Toplam 75 iü. HMG'nin tek enjeksiyonla verililişi:

Bu gruptaki 10 tavşana 75'er iü. HMG tek enjeksiyonla ve i.m. olarak uygulandı. Bu uygulamadan 48 saat sonra ise 100 iü. HCG damar içi yolla verildi ve hayvanlar çiftleştirildi.

3.2.2. Toplam 75 iü. HMG'nin 3 ayrı enjeksiyonla

verililişi : 75 iü. HMG üç eşit porsiyona bölünerek, 25 iü. lik dozlarda 24 saatlik aralarla tavşanlara kas içi yolla verildi. Son enjeksiyondan 48 saat sonra ise ovulasyonları sağlamak için, 100 iü. HCG damar içi yolla verildi ve hayvanlar çiftleştirildi.

3.3. Clomiphene citrate grubu: Bu grupta Clomiphene citrate(Fertilin, Asfarma)'ın iki ayrı dozu denendi.

1. 100 mg. Clomiphene citrate.
2. 150 mg. Clomiphene citrate.

Her iki grup için 10'ar adet dişi tavşan ayrıldı ve ilk 10 tavşana 100 mg., diğer 10 tavşana ise 150 mg. Clomiphene citrate peros yolla verildi. Bu uygulamadan 24 saat sonra ovulasyonları sağlamak için 100 iü. HCG damar içi yolla verilerek hayvanlar çiftleştirildi.

3.4. Kontrol grubu: Kontrol grubu için ayrılan 10 adet dişi tavşana sadece ovulasyonları sağlamak amacı ile 100 iü. HCG (Pregnyl, Organon) enjeksiyonu damar içi yolla uygulanarak hayvanlar çiftleştirildi.

Grupların hepsinde çiftleşmeyi takiben 96 saat sonra uterus yıkaması yöntemi ile embryolar kazanıldı ve değerlendirildi. Gruplar arası farkı en aza indirmek amacı ile, her gruptan birer tane olmak üzere toplam 8 tavşan aynı gün arka arkaya operasyona alınarak belirtilen uygulamalar

gerçekleştirildi.

Bir operasyon grubunu oluşturan 8 tavşana hormonların uygulanışı ve operasyonun gerçekleştirilmesi Tablo 6'de görüldüğü gibidir.

Tablo 6. Bir operasyon grubunda hormonların uygulanılışı

Tavşan	1.G	2.G	3.G	4.G	5.G	6.G	7.G	8.G	9.G
1	-	PMSG 75 IU	-	-	100 iü HCG+T.	-	-	-	Uterus Yıkaması
2	-	PMSG 150 IU	-	-	100 iü HCG+T.	-	-	-	Uterus Yıkaması
3	-	PMSG 200 IU	-	-	100 iü HCG+T.	-	-	-	Uterus Yıkaması
4	-	-	HMG 75 IU	-	100 iü HCG+T.	-	-	-	Uterus Yıkaması
5	HMG 25 IU	HMG 25 IU	HMG 25 IU	-	100 iü HCG+T.	-	-	-	Uterus Yıkaması
6	-	-	-	C.C. 100mg	100 iü HCG+T.	-	-	-	Uterus Yıkaması
7	-	-	-	C.C. 150mg	100 iü HCG+T.	-	-	-	Uterus Yıkaması
8	KONTROL	GRUBU	-	-	100 iü HCG+T.	-	-	-	Uterus Yıkaması

HMG:Human Menopausal Gonadotrophine; PMSG:Pregnant Mare Serum Gonadotrophine; HCG:Human Chorionic Gonadotrophine; C.C.:Clomiphene citrate; G:Gün; T:Tohumlama.

3.5.Uterus yıkaması yöntemi ile embryoların kazanılması:

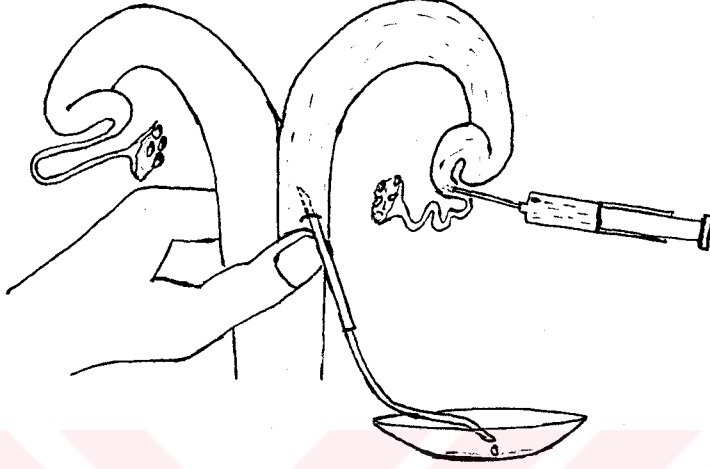
Embryolar, genel anestezi altında laparatomiyi takiben uterus yıkaması ile kazanıldı. Expanded blastosist devresindeki embryoların kazanılması için uterus yıkaması, tohumlamadan 96 saat sonra gerçekleştirildi. Anesteziyi oluşturmak amacı ile tavşanlara kas içi yolla 20-25 mg./kg. Ketalar (1.3 ml.) ve 8 mg./kg. Rompun (0.8 ml.) enjekte edildi. Anestezi oluştuktan sonra tavşan sırt üstü yatırılıp tespit edilerek operasyon bölgesindeki kıllar tıraş edildi. Daha sonra bölgenin dezenfeksiyonu yapıldı ve üzeri steril serviyet ile örtüldü.

Median hat ensizyonu ile reproduktif organlar (uterus, ovidukt ve ovaryumlar) ensizyon hattı dışına çıkarıldı. Daha sonra ovaryum üzerinde bulunan korpus luteum ve follikül sayıları, ovaryum reaksiyonunu değerlendirmek amacıyla kaydedildi.

Uterus yıkamasını gerçekleştirmek için, ucu kütleştirilmiş bir kanül(16-18 numara) utero-tubal bağlantı yerine yakın bir bölgeden uterus içerisine yönlendirilerek baş ve işaret parmakları arasında tespit edildi(Resim 1). Diğer taraftan yıkanacak olan kornu uteri, başka bir yardımcı tarafından serviks uteriye yakın bir yerden baş ve işaret parmakları arasında basınç uygulanarak tespit edildi. 10 ml. yıkama sıvısı içeren bir enjektör kanüle adapte edilerek sıvının bir kısmı (yaklaşık 5 ml.) kornu içerisine verildi. Kornu uterusin gerginleşmesini takiben serviks uteriye yakın bir yerden, uç kısmına polietilen bir boru adapte edilmiş iğne(12 numara) ile uterus lumenine girildi(Resim 2). Polietilen borunun uç kısmı bir saat camı içerisine yerleştirilerek sıvının bu saat camına akması sağlandı(Şekil 1). Yıkama sıvısının tamamı verildikten sonra, ucu küt kanül çıkarıldı ve utero-tubal bağlantı yerinden başlanmak üzere, baş ve işaret parmakları arasında basınç uygulayarak kornu uterideki tüm sıvının geri alınması gerçekleştirildi. Daha sonra polietilen boru adapte edilmiş iğne çıkarılarak aynı işlem diğer kornu uteriye uygulandı.

Yıkama sıvısı olarak steril %0.9'luk NaCl solüsyonu (serum fizyolojik) kullanıldı ve operasyondan önce solüsyonun sıcaklığı vücut ısısına getirildi.

Saat camlarında toplanan yıkama sıvıları, 37°C'a ayarlı sıcak tabla üzerine konuldu. Kazanılan embryolar, mikropipet yardımı ile saat camlarından alınıp, 30x15 mm. ebatlarındaki tek kullanımlık steril plastik kültür kapları (Nunk, Inter Med) içerisine yerleştirilerek değerlendirildi.



Şekil 1. Uterus yıkaması yöntemi.

Embryoların aranmasında ve ilk değerlendirilmesinde zumlu, x10 ila x40 büyütme stereo mikroskop (Olympus; UMZ 4F) kullanıldı (Resim 3). Daha sonraki değerlendirme ve fotoğraf çekimi Olympus;BH-2 mikroskofta yapıldı ve değerlendirme sırasında şu kriterlere dikkat edildi (Resim 4).

- a. Zonanın bütünlüğü ve parlaklığı,
- b. Embryonun zona içini doldurma durumu,
- c. Hücre kitlesinde büzüşme olup olmadığı,
- d. Zonanın şekli (yuvarlak olup olmadığı),
- e. Hücrelerin homojenliği.

Böylece kazanılan hücrelerin sınıflandırılması yapıldı ve kaliteleri hakkında karar verildi.

3.6.Embryo transfer: Bulgular bölümünden de anlaşılacağı üzere, 75 iü. PMSG ve 75 iü. HMG'nin tek enjeksiyonla verildiği gruplarda kalite ve kantite açısından en iyi embryolar elde

edildi. Bu iki preparat arasındaki fark istatistikî olarak önemli bulunmamasına rağmen, gerek sağlıklı embryo sayısı ve gerekse ovaryum cevabı açısından en iyi sonuçlar 75 iü. dozda ve tek enjeksiyonla verilen HMG grubunda elde edildi ve embryo transfer çalışmasında bu uygulama esas alındı.

Bu preparatın gebelik oranı üzerine etkisinin araştırılması için kontrol ve deneme grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu. Deneme grubunda 5 verici ve 10 alıcı olmak üzere toplam 15, kontrol grubunda ise 5 verici ve 5 alıcı olmak üzere toplam 10 tavşanın kullanımı planlandı.

3.6.1. Vericilerin hazırlanması: Deneme grubundaki 5 verici tavşana 75'er iü. HMG tek enjeksiyonla kas içi uygulandı. Bu uygulamadan 48 saat sonra ovulasyonları sağlamak amacı ile 100 iü. HCG damar içi yolla verildi ve hayvanlar çiftleştirildi.

Kontrol grubundaki 5 verici tavşana ise sadece ovulasyonları sağlamak amacı ile 100 iü. HCG damar içi yolla verilerek hayvanlar çiftleştirildi.

3.6.2. Alıcıların hazırlanması: Deneme ve kontrol grubundaki toplam 15 alıcı tavşan, vericilerle aynı anda i.v. olarak 100 iü. HCG enjeksiyonuna tabi tutuldu.

Verici hayvanların çiftleştirilmesinden 96 saat sonra, genel anestezi altında uterus yıkaması yöntemi ile tavşanlardan embryolar kazanıldı ve ovaryum cevapları kaydedildi. Embryo transfer çalışmalarında uterus yıkaması için bu kez yıkama sıvısı olarak Dulbecco'nun PBS medyumu kullanıldı (Tablo 7).

PBS medyumu hazırlanırken Tablo 7'de belirtilen maddeler tartılıp steril 1 lt.lik balon içerisine konuldu. Daha sonra üzerine bir miktar steril bidistile su ilave edilip magnetik karıştırıcıda maddelerin tamamen erimesi sağlandı. Kimyasal

maddeler eritildikten sonra 100 ml. ye 1.5 gr. oranında BSA (Bovine Serum Albumin) ilave edildi ve yine magnetik karıştırıcı aracılığı ile BSA'nın da erimesi sağlandı. BSA da eridikten sonra medyumun hacmi 1 lt.ye tamamlandı ve antibiotik ilavesi yapılarak sterilizasyon amacı ile filtrasyon işlemi gerçekleştirildi. Filtrasyon işlemi, otoklavda sterilize edilmiş ve por genişliği 0.45 um olan milipor filtreden geçirilerek yapıldı. Hazırlanan medyum sterilizasyon sonrası 24 saat süre ile 37°C'lık inkübatörde bekletilerek medyumun kontamine olup olmadığı kontrol edildi.

Tablo 7. Dulbecco'nun PBS (Phosphate Buffered Saline) medyumunun yapısı.

Madde	mg./lt.	Madde	mg./lt.
NaCl	8000	KCl	200
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1150	KH ₂ PO ₄	200
MgCl ₂ .6H ₂ O	100	CaCl	100

Hazırlanan medyuma 100ml.ye 1.5gr. oranında BSA ve her ml.ye 100 iü.kristal penicilline ve 0.5 mg. streptomycine katıldı.

Embryolar kazanıldıktan hemen sonra buldukları yıkama sıvısı içerisinden alınarak, üç ayrı petri kutusu içinde bulunan taze PBS medyumundan ayrı ayrı geçirilerek yıkandı ve böylece, uterustan kaynaklanabilecek zararlı etkilerden korunmaya çalışıldı. Yıkama işleminden sonra değerlendirilen embryolar, senkronize edilmiş sağlıklı alıcılara nakledilene kadar kısa bir süre 37°C'lık sıcak tabla üzerinde bekletildi.

Alıcı hayvanlarda reproduktif organlar, genel anestezi altında median hat ensizyonu ile dışarı alınarak, her bir

ovaryumdaki korpus luteum sayıları kaydedildi. Bu işlemden sonra, yaklaşık 0.01-0.02 ml. medyumla beraber mikropipet içerisine çekilmiş embryolar, ovaryumlardaki korpus luteum sayıları dikkate alınarak utero-tubal bağlantı yerine yakın bir bölgeden ucu küt bir kanülle delinen uterus lumenine transfer edildi.

Transfer sonrasında alıcı hayvanlar ayrı kafeslerde barındırıldı ve transferden yaklaşık olarak 20-22 gün sonra abdominal palpasyon ile gebelik muayeneleri yapıldı.

4. BULGULAR

Araştırmada elde edilen bulgular; süperovulasyon çalışmaları ve transferden sonraki gebelik sonuçları olmak üzere iki bölüm halinde verildi.

4.1. Süperovulasyon çalışmaları: Bu çalışmada elde edilen veriler; ovaryum reaksiyonları, kazanılan hücre sayıları ve sağlıklı embryo sayıları olmak üzere 3 kısımda değerlendirildi.

4.1.1. Ovaryum reaksiyonları: 4 ayrı grupta toplam 80 hayvanda gerçekleştirilen uygulamaların sonucunda elde edilen ovaryum reaksiyonları gruplara göre ayrılarak sunuldu.

4.1.1.1. PMSG grubu: PMSG grubunda 75, 150, 200 iü. PMSG uygulanan 30 hayvanda laparotomi ile saptanan ovaryum reaksiyonları, Tablo 8'de yer almaktadır.

Tablo 8. PMSG grubunda saptanan ovaryum reaksiyonları.

n	75 iü. PMSG				150 iü. PMSG				200 iü. PMSG					
	Sağ ov. Fol	Sağ ov. Cl.	Sol ov. Fol	Sol ov. Cl.	Sağ ov. Fol	Sağ ov. Cl.	Sol ov. Fol	Sol ov. Cl.	Sağ ov. Fol	Sağ ov. Cl.	Sol ov. Fol	Sol ov. Cl.		
1	-	8	2	10	1	27	39	15	37	1	1	3	1	3
1	1	5	-	10	1	2	8	3	9	1	7	7	6	4
1	12	19	12	26	1	10	10	3	24	1	2	14	2	15
1	-	2	-	7	1	2	2	5	3	1	6	12	4	8
1	-	27	2	28	1	3	10	7	16	1	11	38	16	43
1	6	9	4	7	1	5	19	11	17	1	3	9	-	6
1	3	14	6	17	1	3	1	7	3	1	6	4	10	4
1	5	14	-	12	1	2	16	-	26	1	3	12	-	6
1	4	7	5	10	1	7	16	7	7	1	-	12	1	9
1	5	26	7	34	1	2	2	14	5	1	5	11	8	12
10	36	131	38	161	10	63	123	72	147	10	44	122	48	110

4.1.1.2. HMG grubu: 3 enjeksiyon ve tek enjeksiyon yöntemi ile 75 iü. HMG uygulanan 20 tavşanda gözlenen ovaryum reaksiyonları, Tablo 9'da yer almaktadır.

Tablo 9. HMG grubunda gözlenen ovaryum reaksiyonları.

3 Enj. HMG					Tek Enj. HMG					
Sağ ovaryum		Sol ovaryum			Sağ ovaryum		Sol ovaryum			
n	Fol.	Cl.	Fol.	Cl.	n	Fol.	Cl.	Fol.	Cl.	
1	-	35	3	33	1	-	12	5	17	
1	1	19	1	16	1	6	23	11	15	
1	9	12	5	11	1	-	32	-	37	
1	-	23	1	25	1	-	22	-	25	
1	7	16	6	18	1	2	35	1	26	
1	1	4	2	21	1	23	8	12	8	
1	-	55	6	75	1	1	11	1	8	
1	-	9	-	14	1	3	32	-	21	
1	-	18	-	17	1	7	32	12	37	
1	2	46	-	-	1	-	13	1	14	
Toplam	10	20	237	24	230	10	42	220	43	208

4.1.1.3. Clomiphene citrate grubu: Oral yolla 100 mg. ve 150 mg. Clomiphene citrate verilen 20 tavşanda mevcut olan ovaryum reaksiyonları Tablo 10'da yer almaktadır.

Tablo 10. Clomiphene citrate grubundaki ovaryum reaksiyonları.

100 mg. C.C.					150 mg. C.C.					
Sağ ovaryum		Sol ovaryum			Sağ ovaryum		Sol ovaryum			
n	Fol.	Cl.	Fol.	Cl.	n	Fol.	Cl.	Fol.	Cl.	
1	2	4	1	3	1	7	2	7	5	
1	6	3	7	1	1	4	-	4	4	
1	1	1	3	3	1	2	1	5	5	
1	1	-	-	-	1	1	1	2	1	
1	8	1	2	5	1	8	3	8	-	
1	-	5	4	9	1	-	-	-	-	
1	2	7	2	6	1	7	2	3	8	
1	3	1	4	2	1	5	2	4	3	
1	1	2	8	-	1	4	2	2	3	
1	2	1	3	2	1	1	1	3	6	
Toplam	10	26	25	34	31	10	39	14	38	35

4.1.1.4. Kontrol grubu: Kontrol grubunda yer alan ve sadece 100 iü. HCG uygulanan 10 tavşanda gözlenen ovaryum reaksiyonları Tablo 11'de görülmektedir.

Tablo 11. Kontrol grubundaki ovaryum reaksiyonları.

<u>Kontrol grubu</u>					
		<u>Sağ ovaryum</u>		<u>Sol ovaryum</u>	
<u>n</u>	<u>Fol.</u>	<u>Cl.</u>	<u>Fol.</u>	<u>Cl.</u>	
1	2	5	1	5	
1	2	4	1	5	
1	4	7	-	-	
1	-	3	-	3	
1	2	4	4	2	
1	-	7	-	4	
1	-	8	-	1	
1	4	4	-	4	
1	1	2	3	2	
1	5	1	2	3	
<u>Toplam</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>45</u>	<u>11</u>	<u>29</u>

Tablo 8, 9, 10 ve 11'den anlaşılacağı gibi, en yüksek ovaryum cevabı tek enjeksiyon şeklinde 75 iü. HMG verilen grupta belirlendi (Resim 5). Bu grupta hayvan başına ortalama korpus luteum sayısı 42.8 ± 6.30 ve follikül sayısı 8.5 ± 3.65 olarak saptandı.

Diğer gruplardaki hayvan başına ortalama korpus luteum ve follikül sayıları sırasıyla 75 iü. PMSG grubunda 29.2 ± 5.71 ve 7.4 ± 2.28 ; 150 iü. PMSG grubunda 27.0 ± 6.90 ve 13.5 ± 3.49 ; 200 iü. PMSG grubunda 23.2 ± 6.80 ve 9.2 ± 2.61 ; Üç enjeksiyonla 75 iü. HMG verilen grupta 46.7 ± 10.24 ve 4.4 ± 1.61 ; 100mg. Clomiphene citrate grubunda 5.6 ± 1.45 ve 6.0 ± 1.16 ; 150 mg. Clomiphene citrate grubunda 4.9 ± 0.89 ve 7.7 ± 1.54 ; Kontrol grubunda ise 7.4 ± 0.76 ve 3.1 ± 0.78 oldu.

Tablo 12. PMSG ve HMG gruplarında toplam ovaryum reaksiyonları.

75iü. PMSG		150iü. PMSG		200iü. PMSG		3Enj. HMG		Tek Enj.HMG	
n	Fol Cl.	n	Fol. Cl.	n	Fol. Cl.	n	Fol Cl.	n	Fol.Cl.
10	74 292	10	135 270	10	92 232	10	44 467	10	85 428

Fol.: Follikül; Cl.:Corpus luteum.

Tablo 13. Clomiphene citrate ve Kontrol gruplarında toplam ovaryum reaksiyonları.

100 mg. C.C.			150 mg. C.C.			Kontrol		
n	Fol.	Cl.	n	Fol.	Cl.	n	Fol.	Cl.
10	60	56	10	77	49	10	31	74

C.C.: Clomiphene citrate.

Övulasyon oranlarının ise, 75 iü. PMSG grubunda % 79.78; 150 iü. PMSG grubunda % 66.67; 200 iü. PMSG grubunda % 71.60; 3 enjeksiyonla HMG verilen grupta % 91.39; Tek enjeksiyonla HMG verilen grupta % 83.43; 100 mg. Clomiphene citrate grubunda %48.28; 150 mg. Clomiphene citrate grubunda %38.89; Kontrol grubunda % 70.48 olduğu hesaplandı.

4.1.2. Kazanılan hücre sayıları: 9 grup halinde 80 tavşanda uterus yıkaması ile elde edilen toplam hücre (sağlıklı embryo, dejenere embryo ve ovum) sayıları, Tablo 14'de görüldüğü gibidir (Resim 6).

Tablo 14. Uterus yıkamaları sonucunda kazanılan hücre sayıları.

	75iü		150iü		200iü		HMG		HMG		100mg		150mg		K.	
	n	PMSG	n	PMSG	n	PMSG	n	3enj.	n	T.enj	n	C.C.	n	C.C.	n	
	1	18	1	-	1	-	1	59	1	3	1	5	1	-	1	7
	1	-	1	9	1	6	1	22	1	14	1	-	1	-	1	3
	1	52	1	4	1	10	1	2	1	43	1	-	1	-	1	-
	1	5	1	1	1	-	1	49	1	2	1	-	1	2	1	5
	1	45	1	-	1	-	1	27	1	53	1	-	1	2	1	-
	1	3	1	17	1	19	1	19	1	7	1	3	1	-	1	3
	1	12	1	-	1	-	1	4	1	3	1	2	1	1	1	9
	1	10	1	-	1	14	1	19	1	53	1	-	1	1	1	6
	1	10	1	2	1	10	1	10	1	8	1	2	1	-	1	-
	1	42	1	1	1	2	1	17	1	22	1	-	1	-	1	-
Top.	10	197	10	34	10	61	10	228	10	208	10	12	10	6	10	33

Top.: Toplam. K.: Kontrol.

Tüm uygulamalar sonunda en fazla hücre kazanılan grup, 3 enjeksiyon şeklinde 75 iü. HMG verilen grup (228 hücre) oldu. Bu grupta kazanılan hücre sayısı ile ovulasyon odakları karşılaştırıldığında hücre kazanma oranı %48.82 olarak hesaplandı.

Diğer gruplarda kazanılan toplam hücre sayısı ve kazanılma oranı şöyle oldu: 75 iü. PMSG grubunda 197 hücre (% 67.47); 150 iü. PMSG grubunda 34 hücre (% 12.59); 200 iü. PMSG grubunda 61 hücre (% 26.29); Tek enjeksiyonla HMG verilen grupta 208 hücre (%48.60); 100 mg. Clomiphene citrate grubunda 12 hücre (% 21.42); 150 mg. Clomiphene citrate grubunda 6 hücre (% 12.24); ve kontrol grubunda 33 hücre (% 44.59).

Kazanılan hücrelerin hayvan başına ortalama değerleri 75 iü. PMSG grubunda 19.7 ± 6.07 ; 150 iü. PMSG grubunda 3.4 ± 1.75 ; 200 iü. PMSG grubunda 6.1 ± 2.17 ; 3 enjeksiyonla HMG verilen grupta 22.8 ± 5.80 ; Tek enjeksiyonla HMG verilen grupta 20.8 ± 6.63 ; 100mg. clomiphene citrate grubunda 1.2 ± 0.55 ; 150 mg. clomiphene citrate grubunda 0.6 ± 0.26 ; Kontrol grubunda ise 3.3 ± 1.05 olarak saptandı.

Kazanılan hücreler içindeki döllenenmiş ovum, sağlıklı embryo ve dejenere embryoların sayıları Tablo 15'de yer almaktadır.

Tablo 15. Kazanılan toplam hücre sayısı ve bunu oluşturan ovum sağlıklı embryo ve dejenere embryo sayıları.

Tavşan Preparat sayısı ve doz	Kazanılan toplam hücre sayısı	Normal emb.say.	Dejenere emb.say.	Döllenenmiş ovum say.
10 75iü. PMSG	197	127	66	4
10 150iü. PMSG	34	13	20	1
10 200iü. PMSG	61	6	45	10
10 HMG 3 eniek.	228	111	60	57
10 HMG Tek eniek.	208	151	40	17
10 C.C. 100 mg.	12	8	-	4
10 C.C. 150 mg.	6	-	1	5
10 Kontrol	33	24	7	2
Toplam 80	779	440	239	100

4.1.3. Kazanılan sağlıklı embryoların sayısı: Değerlendirme sonunda sağlıklı olduğuna karar verilen embryolar ve bunların kazanılan tüm embryolar içindeki yüzdesi gruplara göre Tablo 16, 17 ve 18'de yer almaktadır.

Tablo 16.PMSG grubunda kazanılan normal embryo sayısı ve oranı.

Tavşan sayısı	75 iü. PMSG	Tavşan sayısı	150 iü. PMSG	Tavşan sayısı	200 iü. PMSG
1	17(% 94.44)	1	-	1	-
1	-	1	3(% 33.33)	1	-
1	47(% 90.38)	1	0	1	0
1	0	1	1(%100.00)	1	-
1	38(% 84.44)	1	-	1	-
1	0	1	7(% 41.18)	1	0
1	6(% 50.00)	1	-	1	-
1	9(% 90.00)	1	-	1	4(%28.57)
1	10(%100.00)	1	2(%100.00)	1	0
1	0	1	0	1	2(%100.00)
Toplam	10 127(% 64.47)	10	13(% 38.24)	10	6(% 9.84)

Tablo 17.HMG grubunda kazanılan normal embryo sayısı ve oranı.

Tavşan sayısı	HMG 3 enjeksiyon	Tavşan sayısı	HMG Tek enjeksiyon
1	50(% 84.75)	1	3(%100.00)
1	17(% 77.27)	1	0
1	0	1	39(% 90.70)
1	44(% 89.80)	1	0
1	0	1	49(% 92.45)
1	0	1	1(% 14.29)
1	0	1	0
1	0	1	37(% 69.81)
1	0	1	0
1	0	1	22(%100.00)
Toplam	10 111(% 48.68)	10	151(% 72.60)

Tablo 18. Clomiphene citrate ve kontrol gruplarında

kazanılan normal embryo sayıları ve oranları.

Tavşan 100 mg. sayısı C.C.	Tavşan 150 mg. sayısı C.C.	Tavşan Kontrol sayısı grubu
1 5(%100.00)	1 -	1 7(%100.00)
1 -	1 -	1 3(%100.00)
1 -	1 -	1 -
1 -	1 0	1 0
1 -	1 0	1 -
1 0	1 -	1 0
1 1(% 50.00)	1 0	1 9(%100.00)
1 -	1 0	1 5(% 83.33)
1 2(%100.00)	1 -	1 -
1 -	1 -	1 -
Toplam 10 8(% 66.67)	10 0	10 24(% 72.73)

Sağlıklı embryoların hayvan başına ortalama değerleri 75 iü. PMSG grubunda 12.7 ± 5.32 ; 150 iü. PMSG grubunda 1.3 ± 0.71 ; 200 iü. PMSG grubunda 0.6 ± 0.62 ; 3 enjeksiyonla HMG verilen grupta 11.1 ± 6.23 ; Tek enjeksiyonla HMG verilen grupta 15.1 ± 6.24 ; 100mg. Clomiphene citrate grubunda 0.8 ± 0.51 ; 150mg. Clomiphene citrate grubunda 0 ; Kontrol grubunda ise 2.4 ± 1.08 olarak saptandı (Resim 7).

Sağlıklı embryoların gelişim devreleri Tablo 19'da yer almaktadır.

Tablo 19. Kazanılan sağlıklı embryoların gelişim devreleri.

Uygulama Grupları	Kompakt Morula	Blastosist	Geç Blastosist	Expanded Blastosist
75 iü. PMSG	1	17	24	85
150 iü. PMSG	2	7	2	2
200 iü. PMSG	1	1	3	1
HMG 3 Enjek.	1	57	17	36
HMG Tek Enj.	6	18	22	105
100mg. C.C.	-	2	1	5
150mg. C.C.	-	-	-	-
Kontrol	3	5	2	14

96 saatlik embryoların bulunması gereken gelişme dönemi olarak, expanded blastosist (Resim 8) devresi kabul edildiği için, bu safhadaki embryoların toplam sağlıklı embryolar içindeki oranı hesaplandı. Bu oran 75 iü. PMSG grubunda %66.93 ; 150 iü. PMSG grubunda %15.38 ; 200 iü. PMSG grubunda %16.67 ; 3 enjeksiyonla HMG verilen grupta %32.43 ; Tek enjeksiyonla HMG verilen grupta %69.54 ; 100 mg. clomiphene citrate grubunda %62.50 ; 150 mg. clomiphene citrate grubunda 0 ; Kontrol grubunda ise %58.33 oldu.

4.1.4. Ovum ve dejenere embryo sayıları: Ovum ve dejenere embryoların hayvan başına ortalama sayısı gruplara göre şöyle oldu: 75 iü. PMSG grubunda 7.0 ± 0.75 ; 150 iü. PMSG grubunda 2.1 ± 1.04 ; 200 iü. PMSG grubunda 5.5 ± 1.55 ; 3 enjeksiyonla HMG verilen grupta 11.7 ± 2.63 ; Tek enjeksiyonla HMG verilen grupta 5.7 ± 1.73 ; 100mg. clomiphene citrate grubunda 0.4 ± 0.04 ; 150mg. clomiphene citrate grubunda 0.6 ± 0.26 ; Kontrol grubunda 0.9 ± 0.54 .

Dejenere embryoların (Resim 9,10 ve 11) gelişim devreleri Tablo 20'de görüldüğü gibidir.

Tablo 20. Dejenere embryoların gelişim devreleri.

	Morula	Blastosist	Exp. Blastosist
75 iü.PMSG	5	7	54
150 iü.PMSG	4	5	11
200 iü.PMSG	27	14	4
HMG 3 Enjek.	42	14	4
HMG Tek Enj.	32	-	8
100mg. C.C.	-	-	-
150mg. C.C.	1	-	-
Kontrol	7	-	-

Kazanılan ovum ve embryoların sayısına dayanarak yapılan hesaplama ile fertilizasyon oranları 75 iü.PMSG grubunda %97.97 ; 150 iü. PMSG grubunda %97.06 ; 200 iü. PMSG grubunda %83.61 ; 3

enjeksiyonla verilen HMG grubunda %75.00 ; tek enjeksiyonla verilen HMG grubunda %91.83 ; 100mg. clomiphene citrate grubunda %66.67 ; 150mg. clomiphene citrate grubunda %16.67 ; Kontrol grubunda ise %93.94 olarak saptandı.

4.2. Transfer ve Gebelik oranları: Tüm bu çalışmaların sonunda yapılan istatistiksel hesaplamalarda 75 iü. dozda PMSG ile, 75 iü. dozda ve tek enjeksiyonla verilen HMG preparatları arasında önemli bir fark görülmedi. Buna rağmen gerek ovaryum cevabı (Tablo 8 ve 9) ve gerekse sağlıklı embryo sayısı açısından (Tablo 15) elde edilen matematiksel görünüme bakılarak, çalışmamızdaki en iyi süperovulator ajanın 75 iü. dozda ve tek enjeksiyonla uygulanan HMG preparatı olduğu kanaati doğdu.

Bu preparatın gebelik oranı üzerine etkisini incelemek amacıyla deneme ve kontrol grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu.

4.2.1. Deneme grubu: 5 verici, 10 alıcı olmak üzere toplam 15 dişi tavşanın kullanımı planlanan bu grupta verici tavşanların ovaryum reaksiyonları ve bu hayvanlardan kazanılan embryo sayısı Tablo 21'de görüldüğü gibi oldu.

Tablo 21. Verici tavşanlarda saptanan ovaryum reaksiyonları ve uterus yıkaması yöntemi ile kazanılan embryo sayısı.

	Ovaryum cevabı				Kazanılan embryo sayısı	
	Sağ ov.		Sol ov.		Sağ kornu	Sol kornu
n	Cl.	Fol.	Cl.	Fol.		
1	22	-	15	3	-	-
1	7	7	9	9	8	9
1	3	2	Atrofiye		1(Daj.)	-
1	12	2	8	2	7	7
1	18	-	19	-	14	19
Toplam	5	62	11	51	14	35

Tablodan da anlaşılacağı gibi, 5 verici tavşanda toplam olarak 113 korpus luteum, 25 adet follükül tespit edildi ve 1 tanesi dejenere olmak üzere toplam 65 embryo kazanıldı ve 64 sağlıklı embryo 7 alıcı tavşana transfer edildi. Fakat bu transferlerin sonucunda gebelik elde edilemedi. Alıcı tavşanlardaki ovaryum reaksiyonları ve transfer edilen embryo sayısı Tablo 22'de yer almaktadır.

Tablo 22. Alıcı tavşanlarda gözlenen ovaryum reaksiyonları ve transfer edilen embryo sayısı.

n	Ovaryum cevabı		Transfer edilen		Doğan yavru			
	Sağ ov.	Sol ov.	embryo sayısı		sayısı			
	Cl.	Fol.	Cl.	Fol.	Sağ kor.	Sol kor.		
1	2	-	2	-	4	3	-	
1	5	-	1	-	5	5	-	
1	6	-	5	-	7	6	-	
1	4	-	4	-	5	5	-	
1	1	-	4	-	3	5	-	
1	2	-	2	-	3	3	-	
1	1	-	5	-	3	7	-	
Toplam	7	21	-	23	-	30	34	-

4.2.2. Kontrol grubu: 5 verici ve 5 alıcı olmak üzere toplam 10 tavşanın kullanımı planlanan bu gruptaki verici hayvanlarda gözlenen ovaryum reaksiyonları ve elde edilen embryo sayıları Tablo 23'de yer almaktadır.

Tablo 23. Verici hayvanlardaki ovaryum reaksiyonları ve elde edilen embryo sayıları.

n	Ovaryum cevabı				Kazanılan embryo sayısı		
	Sağ ov.		Sol ov.		Sağ kornu	Sol kornu	
	Cl.	Fol.	Cl.	Fol.			
1	7	2	5	4	5	4	
1	4	3	7	2	3	8(1'i dej)	
1	3	2	5	1	3	4	
1	-	-	-	-	-	-	
1	-	-	-	-	-	-	
Toplam	5	14	7	17	7	11	16(1'i dej)

Tablodan da anlaşılacağı gibi, bu grupta yer alan 5 verici tavşanın ovaryumlarında 31 korpus luteum ve 14 follikül tespit edilerek, 1 tanesi dejenere olmak üzere toplam 27 embryo kazanıldı ve 26 sağlıklı embryo 3 alıcı tavşana transfer edildi. Bu uygulamalar sonrasında alıcı tavşanlardan biri gebe kalarak 1 adet ölü yavru doğumunu gerçekleştirdi. Alıcı tavşanlardaki ovaryum cevabı, transfer edilen embryo sayısı ve doğan yavru sayısı Tablo 24'de yer almaktadır.

Tablo 24. Alıcı tavşanlardaki ovaryum reaksiyonları, transfer edilen embryo ve doğan yavru sayıları.

n	Ovaryum cevabı				Transfer edilen embryo sayısı		Doğan yavru sayısı	
	Sağ ov.		Sol ov.		Sağ kor.	Sol kor.		
	Cl.	Fol.	Cl.	Fol.				
1	5	2	2	2	6	3	-	
1	4	-	3	-	5	5	1(ölü)	
1	4	3	5	4	3	4	-	
Toplam	3	13	5	10	6	14	12	1(ölü)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hayvan ıslahı açısından büyük önem taşıyan embryo transferi ve bununla ilgili teknikler son yıllarda oldukça geliştirilmiştir. Bu tekniklerin uygulanmasında gerekli olduğu düşünülen süperovulasyon işlemi ise, elde edilecek sonuç açısından hala belirsizliğini korumaktadır. Embryo transferinin genetik seleksiyon amacıyla et, süt ve kombine sığır ırkı yetiştirmelerinde fayda sağladığı ve bu yöntemden yararlanılan programlarda kazanılan genetik gelişmenin, alışılmış test programları ile elde edilene kıyasla ortalama iki katı kadar daha fazla olduğu genetikçiler tarafından bildirilmektedir (63).

Değişik süperovulasyon yöntemleri kullanarak, laboratuvar şartlarında en iyi süperovulasyon tedavisinin belirlenmesi ve daha fazla sayıda, sağlıklı embryolar kazanılması amaçlanan bu çalışmada, 7 deneme ve 1 kontrol olmak üzere 8 grup oluşturulmuş ve tüm gruplarda embryo kalite ve kantitesi incelenmiştir.

Tek enjeksiyon şeklinde 75, 150 ve 200 iü. dozlarda PMSG uygulanan gruplardaki tavşanların ovaryumlarında sırasıyla toplam 366 (74 follikül + 292 korpus luteum), 405 (135 follikül + 270 korpus luteum) ve 324 (92 follikül + 232 korpus luteum) adet oluşum belirlenirken, ovulasyon oranları %79.78, %66.67 ve %71.60 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada üç farklı dozda PMSG uygulanan hayvanlarda belirlenen follikül sayıları, Illera ve ark.(29)'larının 120 iü. PMSG kullanarak saptadıkları olumsuz bir veri olan 46.7 ± 4.58 follikül sayısından çok daha düşük olmuştur.

Yapılan uterus yıkamaları sonucunda bu gruplarda sırasıyla 197 (19.7 ± 6.07), 34 (3.4 ± 1.75) ve 61 (6.1 ± 2.17) tane hücre kazanılırken, hücre kazanma oranları %67.47, %12.59 ve %26.29

olmuş ve kazanılan hücrelerden 75 iü. PMSG grubunda 193 tanesinin (%97.97), 150 iü. PMSG grubunda 33'ünün (%97.06) ve 200 iü. PMSG grubunda ise 51'inin (%83.61) fertil olduğuna karar verilmiştir. PMSG grubunda gerçekleşen bu fertilizasyon oranları gerek kendi içlerinde gerekse kontrol grubu ile kıyaslandığında, farklar istatistikî açıdan önemli olmamıştır.

PMSG grubundaki ortalama korpus luteum sayılarının birbirlerine çok yakın , buna karşın follikül sayılarının 75 iü. PMSG grubunda diğerlerinden daha düşük olduğu, fakat bu farkın istatistikî açıdan önemli olmadığı saptanmıştır. Ovulasyon oranları incelendiğinde ise , 75 iü. PMSG grubunda diğer iki gruba göre daha yüksek bir ovulasyon oranı elde edilmiş ve bu fark da istatistikî açıdan önemli olmamıştır.

Kontrol grubumuzda elde edilen korpus luteum sayısı (74 adet) ile 75 (P<0.01), 150 (P<0.01) ve 200 iü. PMSG (P<0.05) grupları arasındaki fark istatistikî açıdan önemli olurken, kontrol grubundaki ovulasyon oranı (%70.48) ile 75 ve 200 iü. PMSG grubu lehine, 150 iü. PMSG grubu aleyhine olan fark istatistikî açıdan önemli bulunmamıştır.

PMSG gruplarında belirlenen sırasıyla 29.2 ± 5.71 , 27.0 ± 6.90 ve 23.2 ± 5.80 ortalama korpus luteum verilerinin, 150 iü. PMSG ve 50-75 iü. HCG uygulayan Kılıçoğlu ve ark.(37)'nin saptadığı 19 ± 1 korpus luteum verilerinden daha iyi olduğu, yine 225 iü. PMSG'yi tek ve 3 enjeksiyon şeklinde uygulayan Pabuççuoğlu (50)' nun elde ettiği veriler olan 17.53 ± 4.99 ve 15.5 ± 3.59 korpus luteum değerlerinden ise oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bununla beraber, her üç aplikasyonla elde edilen veriler, PMSG' yi tek enjeksiyonda 200 iü. ve 3 gün boyunca 50 iü./gün olmak üzere iki şekilde uygulayan Adams (2)'ın saptadığı, sırasıyla ortalama 61(35-96) ve 38.5(6-135) adet korpus luteum sayısından oldukça düşük olarak gerçekleşmiştir.

PMSG preparatlarını 225 ve 300 iü. dozlarda 3 enjeksiyon şeklinde kullanan Gabler (19)'in, sırası ile saptadığı %91.6 ve %100.0 ovulasyon oranları , araştırmada 75, 150 ve 200 iü. PMSG dozları ile elde edilen sırası ile %79.78, %66.67 ve %71.60 ovulasyon oranı verilerinden yüksek görülürken, aynı araştırmacının 120 iü. PMSG ile kazandığı %58.8'lik veri, değerlerimizden düşük şekillenmiştir. Bununla beraber Illera ve ark.(29)'nın 120 iü. PMSG kullanarak elde ettikleri ortalama 26.6 ± 2.8 korpus luteum veri değeri, 150 iü. PMSG kullanılan grupta saptanan değere (27 ± 6.90) benzer iken, aynı araştırmacı tarafından hesaplanan ovulasyon oranı (%56.9), her üç grubumuzda belirlenen ovulasyon oranı değerlerinden düşük kalmıştır. Aynı durum Özkoca ve ark.(49)'nın 150 iü. PMSG ve 100 iü. HCG ile elde ettikleri ortalama 10.0 ± 4.12 olan korpus luteum verilerinde de görülmektedir.

PMSG grubunda kazanılan hücre sayıları birbirleri ile karşılaştırıldığında, 75 iü. PMSG grubu lehine olan fark istatistikî yönden de önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Bu gruplarda kazanılan hücre sayıları, kontrol grubunda elde edilen hücre sayısı ile (33 adet, ortalama 3.3 ± 1.05) karşılaştırıldığında ise, 75 iü. PMSG grubu lehine olan fark istatistikî yönden önemli olurken ($P < 0.05$), 150 ve 200 iü. PMSG grupları ile olan farkın önemli olmadığı saptanmıştır.

Embryo sayıları incelendiğinde, 75 iü. PMSG grubunda elde edilen 193 adet (ortalama 19.3 ± 6.12) embryo sayısı, 150 iü. PMSG kullanan Özkoca ve ark.(49)'nın kazandıkları ortalama 5.0 ± 5.80 embryo sayısından oldukça fazla iken, 200 iü. PMSG grubundaki 5.1 ± 2.20 adet embryo sayısı aynı araştırmacıların verilerine çok yakın, buna rağmen 150 iü. PMSG grubundaki değerler ise (3.3 ± 1.77) daha düşük gerçekleşmiştir. Yine 75 iü. PMSG ile kazanılan ve en yüksek değer olan 19.3 ± 6.12 ortalama embryo

sayısı, aynı dozda PMSG kullanan Hatton ve ark.(28) ile 120 iü. PMSG kullanan Illera ve ark.(29)'nin verilerinden daha düşük olmuştur.

Kazanılan sağlıklı embryolar PMSG gruplarında sırasıyla 127 (%64.47), 13 (%38.24) ve 6 (%9.84) olarak saptanmış, 75 ve 150 iü. PMSG grupları arasındaki fark önemsiz bulunurken, 75 ve 200 iü. PMSG grupları arasında 75 iü. PMSG lehine olan fark istatistikî açıdan önemli ($P<0.05$), 150 ve 200 iü. PMSG grupları arasındaki fark ise önemsiz olmuştur. Sağlıklı embryoların yüzdeleri açısından, kontrol ile 75 ve 150 iü. PMSG grupları arasındaki farkın önemli olmadığı, buna karşın kontrol (24 adet, %72.73) ile 200 iü. PMSG grubu arasındaki kontrol grubu lehine olan farkın oldukça önemli olduğu ($P<0.01$) saptanmıştır.

96 saatlik embryoların bulunması gereken devre olarak expanded blastosist dönemi kabul edildiği için, kazanılan sağlıklı embryolar içinde bu dönemdeki embryoların sayısı önem taşımaktadır. Expanded blastosist sayısı üç farklı PMSG grubunda sırasıyla 85 (%66.93), 2 (%15.38) ve 1 (%16.67) adet olarak saptanırken, 75 iü. PMSG grubundaki yüzde, diğerlerine göre istatistikî açıdan önemli ($P<0.05$), 150 ve 200 iü. PMSG grupları arasındaki oran ise benzer olmuştur. Kontrol grubu (%58.33) ile deneme grupları karşılaştırıldığında, 150 ve 200 iü. PMSG grupları aleyhine olan fark istatistikî açıdan önemli ($P<0.05$), 75 iü. PMSG grubu lehine olan fark ise önemsiz olmuştur.

Tek ve üç enjeksiyon şeklinde iki ayrı yöntemle 75 iü. HMG uygulanan tavşanların ovaryumlarında sırasıyla toplam 513 (85 follikül + 428 korpus luteum) ve 511 (44 follikül + 467 korpus luteum) adet oluşum belirlenirken, ovulasyon oranları %83.43 ve %91.39 olarak hesaplanmıştır.

HMG'yi toplam 75 iü. dozda ve 3 enjeksiyon şeklinde uygulayan Gabler (19), ovulasyon oranlarını son enjeksiyondan 24

ve 48 saat sonra HCG uyguladığı gruplarda sırası ile %79.2 ve %100.0 olarak bulurken, ilk veri çalışmamızda elde edilen değerlerden düşük olmasına rağmen, ikinci değer oldukça yüksek gerçekleşmiştir.

Yapılan uterus yıkamaları sonucunda tek ve 3 enjeksiyon gruplarında sırasıyla 208 (20.8 ± 6.63) ve 228 (22.8 ± 5.80) tane hücre kazanılırken, hücre kazanma oranları %48.60 ve %48.82 olarak belirlenmiş ve kazanılan hücrelerin tek enjeksiyon grubunda 191 (%91.83), 3 enjeksiyon grubunda ise 171 tanesinin (%75.00) fertil olduğuna karar verilmiştir. Bu fertilizasyon oranları kontrol grubu (%93.94) ile karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistikî açıdan önem taşımamıştır. Kazanılan embryo sayısı açısından ise HMG grupları arasındaki fark önemsiz, kontrol grubu ile tek enjeksiyonla HMG verilen grup arasındaki HMG grubu lehine olan fark önemli ($P < 0.05$) olmuştur.

Elde edilen ovulasyon oranları (%83.43 ve %91.39) ve kazanılan ortalama embryo sayıları (19.1 ± 6.94 ve 17.1 ± 6.73) illere ve ark.(29)'nın HMG uygulamalarından elde ettiği ovulasyon oranı (%65.9) ve kazanılan ortalama embryo sayısı (30.8 ± 4.3) değerleri ile karşılaştırıldığında, ovulasyon oranı değerlerimiz oldukça yüksek görünürken, embryo sayıları ise düşük kalmıştır.

HMG grubunda elde edilen sonuçlar birbiriyle karşılaştırıldığında, ovaryumların ortalama reaksiyon verileri çok benzer bulunmuş ve üç enjeksiyonla HMG uygulanan grup lehine olan korpus luteum değerleri farkı (3.9 ± 3.94) ile ovulasyon oranları farkı (%7.96) istatistikî açıdan önem taşımamıştır. Kontrol ve deneme grupları, korpus luteum sayıları açısından karşılaştırıldığında ise deneme grupları lehine olan fark, istatistikî açıdan oldukça önemli [3 enjeksiyon ($P < 0.01$) ve tek enjeksiyon ($P < 0.001$)] bulunmuş, kontrol grubunda gerçekleşen ovulasyon oranı (%70.48) HMG gruplarından daha düşük olmasına

rağmen istatistiki açıdan önem taşımamıştır.

Her iki HMG grubundaki follikül sayıları sırasıyla ortalama 8.5 ± 3.65 ve 4.4 ± 1.61 olarak belirlenirken, bu değerler illera ve ark.(29)'nın bildirdiği ortalama 48.8 ± 4.0 değerinden oldukça düşük gerçekleşmiştir.

Bu gruplardaki ortalama 42.8 ± 6.30 ve 46.7 ± 10.24 korpus luteum verileri ise, 75 iü. HMG'yi 3'e bölerek aplike eden Ahmad(3)'ün elde ettiği ortalama 48.66 ± 19.21 korpus luteum değerine oldukça yakın iken, 12 saat arayla altı enjeksiyonda toplam 60 iü. HMG uygulayan illera ve ark. (29)'nın saptadığı 32.2 ± 3.8 korpus luteum değeri ile karşılaştırılınca daha yüksek olduğu görülmüştür.

Kazanılan sağlıklı embryo sayıları tek ve 3 enjeksiyonla uygulanan HMG gruplarında sırasıyla 151 (%72.60) ve 111 (%48.68) adet bulunmuş, embryo yüzdeleri arasındaki fark iki grup içerisinde olduğu gibi, kontrol grubumuzda elde edilen sağlıklı embryo yüzdesi (24 adet, %72.73) ile de önemsiz olmuştur. Tek ve 3 enjeksiyon gruplarında sırasıyla %69.54 (105 adet) ve %32.43 (36 adet) olarak saptanan expanded blastosist yüzdeleri arasındaki fark, kendi içlerinde olduğu gibi kontrol grubu ile de önemsiz bulunmuştur.

100 ve 150 mg. dozlarda C.C. verilen çalışmanın bu bölümünde, tavşanlar üzerinde C.C.'in süperovulator etkisiyle ilgili kaynak bulunamadığından, kazanılan sonuçları tartışmak mümkün olamamıştır.

Bu grupta kazanılan ortalama 5.6 ± 1.45 ve 4.9 ± 0.89 korpus luteum verileri, birçok araştırmacının (3,29,37,49,50) PMSG ve HMG ile tavşanlarda elde ettiği verilerden oldukça düşük olmuş ve bu değerler kontrol grubunda saptanan 7.4 ± 0.76 korpus luteum verisi ile karşılaştırıldığında, 100 mg. C.C. aleyhine olan fark önem taşımazken, 150 mg. C.C. aleyhine olan fark istatistiki

açıdan önemli olmuştur ($P < 0.05$).

Yapılan uterus yıkamalarıyla 100 ve 150 mg. C.C. gruplarında sırasıyla 12 (1.2 ± 0.55) ve 6 (0.6 ± 0.26) adet hücre kazanılırken, kazanma oranları %21.42 ve %12.24 olarak belirlenmiş ve elde edilen hücrelerin 100 mg. C.C. grubunda 8 (%66.67), 150 mg. C.C. grubunda ise 1 tanesinin (%16.67) fertil olduğuna karar verilmiştir. Bu iki grup arasındaki fertilizasyon oranları farkı da istatistikî açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Bu oranlar kontrol grubu ile (%93.94) karşılaştırıldığında ise, 150 mg. C.C. grubu aleyhine olan farkın, istatistikî yönden oldukça önemli olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$).

Kazanılan embryolar morfolojik olarak değerlendirildiklerinde, 100 mg. C.C. grubundakilerin hepsinin sağlıklı ve bunlardan 5'inin (%62.50) expanded blastosist olduğuna karar verilirken, 150 mg. C.C. grubundaki embryonun dejenere olduğu saptanmıştır.

Klomifen sitrat kadınlarda süperovulasyon amacıyla yaklaşık olarak 5 veya 7 gün boyunca uygulanmakta ve yeterli sonuçlar elde edilmektedir (4). Tavşanlarda ise bir defalık per os aplikasyonun, süperovulasyon amacıyla yeterli olmadığı sonuçlardan anlaşılmaktadır. C.C.'ın 100 mg. lık dozu gerek fertilizasyon, gerekse sağlıklı embryo ve embryoların bulunması gereken gelişme dönemi oranları açısından oldukça iyi sonuçlar vermesine rağmen, bu doz ile saptanan ovaryum reaksiyonu ve kazanılan toplam embryo sayısı bakımından tatminkar sonuçlar elde edilememiş ve 150 mg. C.C. uygulaması ile saptanan sonuçlar ise, her bakımdan çok daha düşük olmuştur. Bu dozların birkaç güne bölünerek tavşanlarda uygulanması ve sonuçların araştırılması gereklilik göstermektedir.

Çalışmamızda elde edilen tüm veriler incelendiğinde, 75 iü. PMSG'nin diğer PMSG doz seviyelerine tercih edilebilir olduğu

görülmektedir. Kullanılan PMSG dozu arttıkça, gerek sağlıklı, gerekse normal gelişim devresindeki embryo sayısında meydana gelen düşüş, sığırlarda yapılan çalışmalarda da dikkati çekmektedir (1,62). Embryo transfer çalışmalarının önemli aşamalarından biri olan süperovulasyonun, embryo kalitesi ve kantitesi üzerinde etkili olduğu ve bilhassa morula devresi ve daha ileri dönemlerdeki embryolarda dejenerasyonlar oluşturduğu görüşü (26), çalışmamızda da dejenerasyonların özellikle morula devresindeki embryolarda meydana geldiği gözlemi ile paralellik göstermektedir. Bilhassa uterus yıkaması sonucu en çok hücrenin kazanıldığı üç enjeksiyonla 75 iü. HMG verilen grupta, dejenerasyonun daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. HMG uygulamalarında toplam dozun birkaç aplikasyonda verilmesinin daha iyi sonuçlar kazanılmasında gerekli olduğu bildirilmesine rağmen(19,29), çalışmamızda tek enjeksiyonla HMG uygulamasından da yeterli sonuçlar elde edilebileceği ve hatta bu gruptaki tüm verilerin diğer gruplara üstün olduğu görülmüş ve bu uygulama tavşanlarda süperovulasyon amacıyla tavsiye edilebilir olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlara göre en uygun preparat olarak değerlendirilen 75 iü. dozda ve tek enjeksiyon şeklinde uygulanan HMG'nin, gebelik oranı üzerine etkisini belirlemek amacıyla oluşturulan deneme ve kontrol grubunda 96 saatlik embryolarla yürütülen transfer çalışmalarından sadece kontrol grubunda bir tavşanda gebelik elde edilmiş ve 1 adet ölü yavru doğmuştur.

Elde edilen bu sonuç, süperovule embryoların %54.5'unun canlı yavruya geliştiğini bildiren Maurer ve ark(45) ile diğer araştırmacıların (2,44) verileri ile karşılaştırıldığında çok düşük kalmaktadır.

Tavşanlarda implantasyonun yaklaşık $6^{3/4}$ günde meydana geldiğini bildiren Kraemer ve Bowen (39),geç dönem blastosistlere

göre morula veya erken blastosistlerin transferinden daha iyi sonuçların elde edilebileceğini, çiftleşmeden 5^{1/2} -6 günden daha ileri dönemlerdeki uterus yıkamaları sırasında, embryolarda rupturların meydana gelebileceğini ve bu durumun da implantasyon için zararlı olabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda 96 saat ve daha ileri dönemde embryoların (expanded blastosist) kazanıldığı ve transfere kadar geçen sürenin de etkisi göz önüne alındığında, elde edilen gebelik sonuçlarının son derece düşük olması, ancak bu şekilde açıklanabilmektedir.



6. ÖZET

Tavşanlarda en uygun süperovulator preparatı seçmek için planlanan bu çalışmada, PMSG, HMG, C.C. preparatlarının farklı uygulama ve dozlarının etkileri toplam 7 deneme ve bir kontrol grubunda araştırıldı.

Süperovulasyon çalışmaları amacıyla her grup için 10'ar tavşan olmak üzere toplam 80 dişi ve bu hayvanların tohumlanmasında 8 erkek tavşan kullanıldı. En iyi sonuçları veren süperovulator preparat ve dozun seçiminden sonra, bu preparatın gebelik oranı üzerine olan etkisini değerlendirmek amacıyla da toplam 25 dişi tavşanın kullanımı planlandı.

PMSG'nin 75, 150 ve 200 iü. dozları tek enjeksiyon şeklinde HCG ile kombineli olarak uygulandı ve aplikasyondan 96 saat sonra laparotomi ile ovaryumlardaki oluşumlar tespit edilerek hayvanların tümünde uterus yıkaması gerçekleştirildi. 75 iü. PMSG verilen gruptaki tavşanların ovaryumlarında ortalama 36.6 ± 7.99 adet oluşum (follikül + korpus luteum) saptanırken, bunlardan ortalama 7.4 ± 2.28 tanesi patlamamış follikül, 29.2 ± 5.71 tanesi ise korpus luteum idi. Bu grupta ovulasyon oranı %79.78 olarak belirlendi.

150 iü. PMSG grubunda bu değerler ortalama 41.1 ± 10.39 toplam oluşum, 13.5 ± 3.49 follikül, 27.0 ± 5.90 korpus luteum şeklinde iken, ovulasyon oranı ise %66.67 oldu.

200 iü. PMSG grubundaki değerler ortalama 32.4 ± 9.41 toplam oluşum, 9.2 ± 2.61 follikül ve 23.2 ± 6.80 korpus luteum olarak belirlenirken, ovulasyon oranı da %71.60 olarak saptandı.

HMG'nin 75 iü. olarak tek enjeksiyonla uygulandığı grupta ortalama 51.3 ± 9.95 oluşum saptanırken, bunların 8.5 ± 3.65 adeti patlamamış follikül, 42.8 ± 6.30 tanesi ise korpus luteum olarak

belirlendi ve ovulasyon oranı da %83.43 oldu. HMG'nin üç enjeksiyonla verildiği grupta ise ortalama 51.1 ± 11.85 toplam oluşum, 4.4 ± 1.61 follükül, 46.7 ± 10.24 korpus luteum saptandı ve ovulasyon oranı da %91.39 olarak belirlendi.

C.C.'in per os 100 mg. dozda verildiği grupta ortalama 11.6 ± 2.61 adet oluşum saptanırken, bunların 6.0 ± 1.16 tanesinin follükül, 5.6 ± 1.45 'inin ise korpus luteum olduğu belirlendi ve ovulasyon oranı %48.28 olarak tespit edildi. 150 mg. C.C. verilen grupta ise bu değerler 12.6 ± 2.43 toplam oluşum, 7.7 ± 1.54 patlamamış follükül ve 4.9 ± 0.89 adet korpus luteum şeklinde iken, ovulasyon oranı da %38.89 olarak saptandı.

Sadece 100 iü. HCG'nin ovulasyonu stimüle etmek amacı ile verildiği kontrol grubunda ise ortalama 10.5 ± 1.54 adet oluşum, bunların 3.1 ± 0.78 adeti patlamamış follükül, 7.4 ± 0.76 adeti de korpus luteum şeklinde değerlendirilirken, ovulasyon oranı %70.48 olarak hesaplandı.

Yapılan uterus yıkamaları sonucunda, 75 iü. PMSG grubunda hayvan başına ortalama 19.7 ± 6.07 adet hücre kazanıldı ve bunlardan 7.77 ± 4.35 adetinin ovum ve dejenere embryo, 12.7 ± 5.32 tanesinin de sağlıklı embryo olduğu belirlendi. Sağlıklı embryoların (toplam 127 adet) 1 tanesi kompakt morula, 17'si blastosist, 24'ü geç blastosist, 85 adeti de expanded blastosist gelişim devrelerindedi.

150 iü. PMSG grubunda hayvan başına ortalama 3.4 ± 1.75 adet hücre kazanılırken, bunlardan 2.1 ± 1.62 adeti ovum ve dejenere embryo, 1.3 ± 0.73 tanesi ise sağlıklı embryo olarak değerlendirildi. Sağlıklı embryolar (toplam 13 adet), 2 kompakt morula, 7 blastosist, 2 geç blastosist ve 2 adet expanded blastosist gelişim dönemindeydi.

200 iü. PMSG grubunda ise hayvan başına ortalama 6.1 ± 2.17 adet hücre kazanılırken, 5.5 ± 1.75 tanesi ovum ve dejenere embryo,

0.6±0.42 adeti de sağlıklı embryo olarak belirlendi. Sağlıklı embrioların (toplam 6 adet) gelişim devreleri ise, 1 adet kompakt morula, 1 adet blastosist, 3 adet geç blastosist ve 1 adet expanded blastosist idi.

HMG'nin tek enjeksiyonla verildiği grupta ise ortalama 20.8±6.63 adet hücre kazanıldı ve bunlardan 5.7±1.73 tanesi ovum ve dejenere embryo, 15.1±6.24 tanesi ise sağlıklı embryo olarak belirlendi. Sağlıklı embrioların (toplam 151 adet) gelişim devreleri ise 6'sı kompakt morula, 18'i blastosist, 22'si geç blastosist ve 105 tanesi de expanded blastosist olarak değerlendirildi.

üç enjeksiyonla HMG verilen grupta ise ortalama 22.8±5.80 adet hücre kazanılırken, bunların 11.7±2.63 tanesi ovum ve dejenere embryo, ortalama 11.1±6.23 tanesi de sağlıklı embryo olarak belirlendi. Sağlıklı embrioların (toplam 111 adet) gelişim devreleri ise 1 kompakt morula, 57 blastosist, 17 geç blastosist ve 36 adet expanded blastosist dağılımındaydı.

En az hücre kazanımının gerđekleştii C.C. grubunda ise, 100 mg. C.C.'in verildiği tavşanlardan ortalama 1.2±0.55 hücre kazanılırken, bunların 0.4±0.04'ü ovum, 0.8±0.51'i de sağlıklı embryo olarak değerlendirildi. Sağlıklı embrioların (toplam 8 adet) gelişim devreleri ise, 2 blastosist, 1 geç blastosist ve 5 adet de expanded blastosist şeklindeydi. 150 mg. C.C. grubunda ise ortalama 0.6±0.26 hücre kazanıldı ve bunların tamamının ovum ve dejenere embryo olduğu görüldü.

Kontrol grubunda ortalama 3.3±1.05 hücre kazanıldı ve bunlardan 0.9±0.54 tanesinin ovum ve dejenere embryo, 2.4±1.08'inin de sağlıklı embryo olduğu saptandı. Sağlıklı embrioların (toplam 24 adet) gelişim devreleri ise, 3 kompakt morula, 5 blastosist, 2 geç blastosist, 14 adet expanded blastosist dağılımındaydı.

PMSG'nin 75, 150 ve 200 iü. dozlarında verildiği gruplarda elde edilen fertilizasyon oranları sırasıyla %97.97, %97.06 ve %83.61 olarak saptandı. HMG'nin tek enjeksiyonla verildiği grupta fertilizasyon oranı %91.83 iken, 3 enjeksiyonla verildiği grupta %75.00 oldu. C.C. uygulamasında ise fertilizasyon oranları, 100 ve 150 mg. C.C. uygulamalarında sırası ile %66.67 ve %16.67 oldu. Aynı oran kontrol grubunda ise %93.94 olarak saptandı.

Tavşan embryolarının expanded blastosist gelişim devresi, 96 saatlik embryoların bulunması gereken süreye denk kabul edildiği için, bu devredeki embryoların toplam sağlıklı embryolar içindeki oranı hesaplandı ve bu oran 75, 150 ve 200 iü. PMSG gruplarında sırası ile %66.93, %15.38 ve %16.67 iken, 3 enjeksiyonla HMG verilen grupta %32.43, tek enjeksiyonla HMG verilen grupta ise %69.54 olarak saptandı. Aynı gelişim devresindeki embryoların dağılım oranları 100 mg. C.C. grubunda %62.50, 150 mg. C.C. grubunda 0 ve kontrol grubunda ise %58.33 oldu.

Elde edilen veriler ovaryumlardaki toplam oluşum, kazanılan sağlıklı embryo sayıları ve expanded blastosistlerin oranı açısından incelendiğinde, uygulama grupları arasında tek enjeksiyonla 75 iü. HMG verilen grubun üstün olduğu saptandı. Ovulasyon oranı açısından ise 3 enjeksiyonla HMG verilen grubun daha üstün olduğu belirlendi. Fertilizasyon oranı yönünden sonuçlar incelendiğinde, tek enjeksiyonla HMG uygulanan grupta elde edilen verilerin, kontrol grubuna yakın olduğu, 75 ve 150 iü. PMSG verilen grupların sonuçlarından ise daha düşük olduğu görüldü.

Bu verilerin ışığında HMG'nin tek enjeksiyonla uygulanan 75 iü.lük dozu, planlanan embryo transfer çalışmalarında en iyi sonuç veren süperovulator ajan düşüncesi ile kullanıldı ve bu preparatın gebelik oranı üzerine olan etkisi araştırıldı. Bu

maksat ile HMG uygulama grubunda 5 verici 10 alıcı, kontrol amacıyla da 5 verici 5 alıcı olmak üzere toplam 25 tavşanın embryo transfer çalışmalarında kullanılması planlandı. Uygulama grubundaki 5 verici tavşandan çiftleşmeden 96 saat sonra uygulanan uterus yıkaması ile elde edilen 65 embryonun (hayvan başına ortalama 13.0 ± 6.03) değerlendirilmesi sonucu, 1 tanesinin dejenere olduğuna karar verildi. Toplam 64 sağlıklı embryonun 7 alıcı tavşana transferinden hiçbir gebelik elde edilemedi.

Kontrol grubunda ise 5 verici tavşandan kazanılan 27 adet embryonun (hayvan başına ortalama 5.4 ± 2.29) incelenmesi ile 1 tanesinin dejenere olduğu görüldü. Sağlıklı olan toplam 26 embryonun 3 alıcı tavşana transferinden bir gebelik elde edildi.

7. SUMMARY

In order to select the most suitable superovulator agent in rabbits, different doses of PMSG, HMG and C.C. were investigated on seven treatment groups, and a control group.

Each of every 8 ovulation groups contained ten female rabbits and 8 male rabbits were used for matings. Choosing the most effective superovulator agent, 25 female rabbits were kept to evaluate the effect of this agent on pregnancy rates.

75, 150 and 200 iü. doses of PMSG were treated combined with HCG by single enjection, and 96 hours apart, ovarial findings were observed by laparatomy and all uteri were flushed. In the 75 iü. PMSG treatment group, total ovarial findings (follicle + corpus luteum) were 36.6 ± 7.99 . Out of these, 7.4 ± 2.28 were unovulated follicles, 29.2 ± 5.71 were corpora lutea. The ovulation rate for this group was 79.78%.

These values for the 150 iü. PMSG group were 41.1 ± 10.39 total findings, 13.5 ± 3.49 follicles, 27.0 ± 6.90 corpora lutea, and the rate of ovulation was 66.67%.

The values of the 200 iü. PMSG group were 32.4 ± 9.41 total findings, 9.2 ± 2.61 follicles and 23.2 ± 6.80 corpora lutea, and the rate of ovulation was 71.60%.

In the group at which 75 iü. HMG was used by single injection, the mean values were as follows, 51.3 ± 9.95 total findings, 8.5 ± 3.65 unovulated follicles, 42.8 ± 6.30 corpora lutea and the rate of ovulation was 83.43%. In the group at which HMG was treated by 3 injections there were 51.1 ± 11.85 total findings, 4.4 ± 1.61 follicles, 46.7 ± 10.24 corpora lutea and the rate of ovulation was 91.39%.

In the group at which 100 mg. C.C. was used by oral route, there were 11.6 ± 2.61 total findings, out of these 6.0 ± 1.16 were

follicles, 5.6 ± 1.45 were corpora lutea and the ovulation rate was 48.28%. At 150 mg. C.C. treated group, these values were 12.6 ± 2.43 total findings, 7.7 ± 1.54 unovulated follicles, 4.9 ± 0.89 corpora lutea, and the ovulation rate was 38.89%.

In the control group which was treated only by 100 iü. HCG to stimulate ovulation, there were 10.5 ± 1.54 total findings. Out of these 3.1 ± 0.78 were unovulated follicles. 7.4 ± 0.76 were corpora lutea and ovulation rate was 70.48%.

At the 75 iü. PMSG group, average 19.7 ± 6.07 cells were recovered per animal by uterus flushings. Out of those cells 7.77 ± 4.35 were ova and degenerated embryos. The total number of healthy embryos was 127. Out of those embryos 1 was compact morula, 17 blastocysts, 24 late blastocysts and 85 were expanded blastocysts.

In the 150 iü. PMSG treated group, average 3.4 ± 1.75 total findings were noted per animal. Out of those findings 2.1 ± 1.62 were ova and degenerated embryos and 1.3 ± 0.73 were healthy embryos. Number of healthy embryos was 13, and 2 were compact morula, 7 were blastocysts, 2 late blastocysts and 2 were expanded blastocysts.

In the 200 iü. PMSG treated group, average 6.1 ± 2.17 cells were recovered per animal. Out of those findings 5.5 ± 1.75 were ova and degenerated embryos and 0.6 ± 0.42 were healthy embryos. Out of the total 6 healthy embryos, 1 was compact morula, 1 was blastocyst, 3 were late blastocysts and 1 was expanded blastocyst.

In the HMG single injection group, average 20.8 ± 6.63 cells were recovered. Out of these cells 5.7 ± 1.73 were ova and degenerated embryos, and 15.1 ± 6.24 were healthy embryos. Total number of the healthy embryos was 151 and their developmental stages were as follows, 6 were compact morula, 18 were blastocysts, 22 were late blastocysts and 105 were expanded

blastocysts.

In the group which is treated by 3 injections of HMG, average 22.8 ± 5.80 cells were recovered. Out of these cells 11.7 ± 2.63 were ova and degenerated embryos, and 11.1 ± 5.23 were healthy embryos. Total number of healthy embryos was 111 and their developmental stages were as follows, 1 compact morula, 57 blastocysts, 17 late blastocysts and 36 expanded blastocysts.

In the least cell recovered C.C. group, from the 100 mg. C.C. treated does average 1.2 ± 0.55 cells were recovered. Out of those cells 0.4 ± 0.04 were ova, 0.8 ± 0.51 were healthy embryos. Total number of healthy embryos were 8 and their developmental stages were as follows, 2 blastocysts, 1 late blastocyst and 5 were expanded blastocysts. In the 150 mg. C.C. group average 0.6 ± 0.26 cells recovered and all of those cells were ova and degenerated embryos.

In the control group average 3.3 ± 1.05 cells were recovered. 0.9 ± 0.54 of those cells were ova and degenerated embryos and 2.4 ± 1.08 were healthy embryos. Total number of healthy embryos was 24. Developmental stages of those embryos were 3 compact morula, 5 blastocysts, 2 late blastocysts and 14 expanded blastocysts.

In the groups treated with 75, 150 and 200 iü. doses of PMSG, rates of fertilization were 97.97%, 97.06% and 83.61% respectively. In the HMG single injection group, rate of fertilization was 91.83% and in HMG 3 injections group it was 75.00%. In C.C. treated groups, rates of fertilization were as follows. In 100 mg. C.C. group 66.67% and in 150 mg. C.C. group 16.67%. In the control group, rate of fertilization was 93.94%.

Since expanded blastocyst stage of rabbit embryos is considered equal to the developmental stages of 96 hours embryos, the rate of this stage embryos were calculated over the total

healthy embryos and these rates for 75, 150 and 200 iü. PMSG groups were 66.93%, 15.38% and 16.67% respectively. This rate was 32.43% for 3 injections HMG group and 69.54% for single injection HMG group. Rates of the embryos at same developmental stages were 62.50% for 100 mg. C.C. group, 0% for 150 mg. C.C. group and 58.33% for control group.

Among the results of experiments, when total findings, recovered healthy embryos and rate of expanded blastocysts were considered 75 iü. HMG single injection group found superior to others. When fertilization rates were compared HMG single injection groups results found to be close to the results of the control group and lower than the results of 75 and 150 iü. PMSG groups.

Considering these results, single injection of 75 iü. HMG was used for superovulation in the embryo transfer investigations and its effect on pregnancy rates was examined. For this purpose, for HMG treatment 5 donor and 10 recipient rabbits and for control group 5 donor and 5 recipient rabbits were used. In the treatment group, 96 hours after mating, 65 embryos recovered by uterus flushings of 5 donor rabbits (average 13.0 ± 6.03 per animal). 1 embryo was degenerated and other 64 embryos were transferred to 7 recipients. No pregnancy was obtained.

In the control group, total 27 embryos recovered from 5 donor rabbits (average 5.4 ± 2.29 per animal). 1 of the embryos was degenerated. Other 26 healthy embryos were transferred to 3 recipient rabbits and one pregnancy obtained.

8. LİTERATÜR LİSTESİ

1. Abdul Saeed, S., Hutchinson, JSM., Broadbent, P.J., Dolman, D.F. (1989): Hormonal profiles in superovulated hereford x friesian heifers. *Theriogenology*, 31 (1), 253. Abstr.
2. Adams, C.E. (1982): Egg Transfer In The Rabbit. In: *Mammalian Egg Transfer*. Ed.C.E.Adams, Ch.3, p.29-46, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
3. Ahmad, M. (1991): Tavşan Embryolarının Gelişmesinde In Vitro Kültür Mediumunun Etkisi. (Doktora tezi) i.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'ı Tohumlama Bilim Dalı.
4. Atasü, T., Şahmay, S. (1990): Reprodüktif Endokrinoloji. Jinekolojik Endokrinoloji Derneği Yayını, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
5. Austin, C.R. (1969): Fertilization and Development of the Egg. In: *Reproduction in Domestic Animals*. Eds.H.H.Cole and P.T.Cupps. Ch.13, p.355-384. Academic Press, New York.
6. Bak, A., Greve, T. and Schmidt, M.(1989): Effect of Superovulation on Reproduction. *Theriogenology*, 31 (1), 169, Abstr.
7. Bak, A., Greve, T., Schmidt, M. and Liboriussen, T. (1989): Effect of Süperovulation on Milk Production. *Theriogenology*, 31 (1), 170, Abstr.

8. Betteridge, K.J. (1974): Unilateral Stimulation of Bovine Ovaries By Local Injection of Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin. *J.Reprod.Fertil.*, 37, 101-104.

9. Betteridge, K.J. (1977): Techniques and Results in Cattle Superovulation. Embryo Transfer In Farm Animals a review of techniques and applications Monograph, No.16, Ed.K.J.Betteridge. Agriculture, Canada.

10. Betteridge, K.J. (1981): An Historical Look at Embryo Transfer. *J.Reprod.Fertil.*, 62, 1-13.

11. Boland, M.P., Goulding, D. & Roche, J.F.(1991): Alternative Gonadotrophins for Superovulation in Cattle. *Theriogenology*, 35 (1), 5-17.

12. Casey, P.L., Looney, C.R., Casey, D.C., Youngs, C.R. and Godke, R.A. (1989): Evaluating Bovine Embryo Quality by Computerized Image Analysis. *Theriogenology*, 31 (1), 181, Abstr.

13. Catchpole, H.R. (1969): Hormonal Mechanisms During Pregnancy and Parturition. In: *Reproduction In Domestic Animals*. Eds.H.H.Cole and P.T.Cups. Ch.15, p.415-440. Academic Press, New York.

14. Chang, M.C. (1948): Transplantation of Fertilized Rabbit Ova: the Effect on Viability of Age, in vitro storage period and storage Temperature. *Nature*, 161, 978-979.

15. Chang, M.C. (1971): Second Annual Carl G.Hartman Lecture. Experimental Studies of Mammalian Spermatozoa and Eggs. *Biology of Reproduction*, 4, 3-15.

16. Çırak, M. (1986): Embriyo Transferi Araştırması. Kalkınmada Öncelikli Yörelere Başkanlığı. DPT:2029, KÖYB:31.

17. Dorland, M., de Boes-Brouwer, H., Otter, T., Reinders, J.M.C., Bosma, A.A. and Kruip Th.A.M (1990): Vesicles As a Marker For Bovine Embryo Quality. Theriogenology, 33 (1), 216, Abstr.

18. Döcke, F. (1969): Ovulation-inducing action of clomiphene citrate in the rat. J.Reprod.Fertil., 18, 135-137.

19. Gabler, G.(1970): Untersuchungen über die Gewinnung, Konservierung und Transplantation von Eizellen bei Kaninchen unter Berücksichtigung von in vitro- Befruchtungsversuchen. Hannover, Klinik für Geburtshilfe und Gynakologie des Rindes der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Dissertation.

20. Greenblatt, R.B. (1961): Chemical Induction of Ovulation. Fertility & Sterility, 12 (5), 402-404.

21. Gupta, T., Sengupta, K. and Chatterjee, A. (1974): Failure of Clomiphene to Interrupt Gestation In Rats Treated With Reserpine. J.Reprod.Fertil., 41, 379-383.

22. Gustafsson, B.K., Wheaton, J.E. and Afiefy, M.M. (1980): Diphenylethylene Derivatives for Induction of Estrus and LH Release in Sheep and Cattle. 9th International Congress on Animal Reproduction & A.I. Vol.IV Symposia (1-5) p.148-151, Spain-MADRID-Espana.

23. Guthrie, H.D., Henricks, D.M. and Handlin, D.L. (1974): Plasma Hormon Levels and Fertility In Pigs Induced to Superovulate with PMSG. J.Reprod.Fertil., 41, 361-370.
24. Hafez, E.S.E. (1962): Endocrine control of reception, transport, development and loss of rabbit ova. J.Reprod.Fertil., 3, 14-25.
25. Hafez, E.S.E. (1987): Embryo transfer, IVF and Genetic Engineering. In: Reproduction in Farm Animals. 5th Edition. Ch.27 p.528-570. LEA & FEBIGER, Philadelphia.
26. Hahn, J. (1974): Gewinnung, Kultivierung, Konservierung und Transplantation von Eizellen der Spezies Maus, Kaninchen und Rind. In: Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Eds. S.K.Paufler und Mitautoren. Band II. Verlag, M & H. Schaper, Hannover.
27. Hahn, J. (1984): The value of laboratory animal models in embryo transfer research. Theriogenology, 21 (1), 45-59.
28. Hatton, J.B., Kelus, A.S. and Leibo, S.P. (1985): Transfer of fresh and frozen-thawed rabbit embryos to produce live young. Experientia 41, Birkhauser Verlag, CH-4010 Basel-Switzerland. p.755-756.
29. Illera, M.J., Illera, J.C., Munoz, I. y Silvan, G. (1988): Rabbit's comparative study between PMSG and HMG in the superovulation treatments. 11th Inter. Congr. on Anim. Reprod. and Artif.Insem. Vol.2, Brief Communications, 168. University College Dublin, Belfield Dublin.

30. İleri, İ.K. (1986): Süperovulasyon ve uterus yıkaması uygulanan on ineğin daha sonraki dönemde dölverimi sorunları. İstanbul Üniv.Vet.Fak.Derg., 12 (1), 17-22.

31. İleri, İ.K., Özkoca, A., Ak, K., Pabuççuoğlu, S., Usta, S., Soylu, K. (1989): Hayvan ıslahında embrio transfer çalışmalarının yeri ve önemi. Bursa Vet.Hek. Odası, Veteriner hekimliği Bursa II. Mesleki Eğitim Semineri Tebliğ özetleri, Bursa.

32. İleri, İ.K. ve Sayın, T. (1986): Sığırlarda Embryo Transfer Çalışmaları. İstanbul Üniv.Vet.Fak.Derg., 12 (1), 23-35.

33. Jagannadha Rao, A., Moudgal, N.R., Madhwa Raj, H.G., Lipner, H. and Greep, R.O. (1974): The role of FSH and LH in the initiation of ovulation in Rats and Hamsters: A study using Rabbit Antisera to ovine FSH and LH. J.Reprod.Fertil., 37, 323-330.

34. Kane, M.T. (1987): In Vitro Growth of Preimplantation Rabbit Embryos. In: The Mammalian Preimplantation Embryo. Regulation of Growth and Differentiation in vitro. Ch.10 Ed. Barry D.Bavister, Plenum Press, New York and London.

35. Kaufman, M.H. and Whittingham, D.G. (1972): Viability of Mouse Oocytes Ovulated Within 14 Hours of an Injection of Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin. J.Reprod.Fertil., 28, 465-468.

36. Kılıçarslan, R.(1990): Ankara Keçilerinde Embrio Nakli Üzerinde Çalışma.(Doktora tezi) İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Bilim Dalı.

37. Kılıçoğlu, Ç., Tekeli, T. (1982): Tavşanlarda embrio transferi. A.Ü.Vet.Fak.Dergisi 28 (1-4): 1981'den ayrı bssım (Reprint). Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
38. Kılıçoğlu, Ç., Alaçam, E., izgür, H., Tekeli, T. (1984): Koyunlarda Embrio nakli üzerinde çalışmalar. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu Proje No:VHAG 548, Ankara.
39. Kraemer, D.C. and Bowen, M.J. (1987): Embryo transfer and Genetic Engineering. In: Current Therapy in Theriogenology, Morrow 2, p.75-76.
40. Land, R.B. and Scaramuzzi, R.J. (1979): A note on the ovulation rate of sheep following treatment with clomiphene citrate. Anim.Prod., 28, 131-134.
41. Linares, T., Plöen, L., King, W.A., Ekwall, H. and Bane, A. (1980): Evaluation of Morphology in Seven Days Old Blastocyst. 9th International Congress on Animal Reproduction & A.I. Vol. IV Symposia (1-5) p.593-596 Spain-MADRID-Espana
42. Lindsay, D.R. and Robinson, T.J. (1970): The action of Clomiphene in the ewe. J.Reprod.Fertil., 23, 277-283.
43. Mapletoft, R.J. (1983): General Updating of status of embryo transfer. Proceedings of the Annual Conference on Artificial Insemination and Embryo Transfer in Beef Cattle. Denver, Colorado.

44. Maurer, R.R. (1978): Advances in Rabbit Embryo Culture. In: Methods in Mammalian Reproduction. Ed. J.C.Daniel. 12, p.259-272, Academic Press, New York.
45. Maurer, R.R., Hunt, W.L., Van Vleck, L.D. and Foote, R.H. (1968): Developmental Potential of Superovulated rabbit ova. J.Reprod.Fertil., 15, 171-175.
46. Mc Donald, L.E. (1980): The Pituitary Gland. In: Veterinary Endocrinology and Reproduction. Ed. L.E.Mc Donald. Ch.2, p.13-41 Third Edition, Lea & Febiger.
47. Newcomb, R., Christie, W.B., Rowson, L.E.A., Walters, D.E. and Bousfield, W.E.D. (1979): Influence of dose, repeated treatment and batch of hormon on ovarian response in heifers treated with PMSG. J.Reprod.Fertil., 56, 113-118.
48. Özkoca, A. (1986): Sığırlarda Reprodüksiyon ve Infertilite. istanbul Üniv.Vet.Fak.Yay. No:7. Gür-Ay Matbaası, istanbul.
49. Özkoca, A., İleri, İ.K., Sayın, T. (1984): Tavşanlarda oviduct yıkaması yöntemiyle embriyo kazanımı ve transplantasyon üzerinde araştırmalar. istanbul Üniv.Vet.Fak.Derg., 10 (1), 1-15.
50. Pabuççuoğlu, S. (1991): Tavşan embriolarının kazanılması ve kültüre edilmelerinden sonra transferleri üzerinde araştırmalar. (Doktora tezi) İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'İ Tohumlama Bilim Dalı.
51. Papkoff, H. (1981): Variations in the properties of equine chorionic gonadotropin. Theriogenology, 15 (1), 1-11.

52. Pineda, M.H., Bowen, R.A. (1980): Embryo Transfer in Domestic Animals. In: Veterinary Endocrinology and Reproduction. Ed. L.E. Mc Donald. Ch.20, p.476-502. Third Edition, Lea & Febiger.

53. Pivko, J. -Majerciak, P. (1980): Reaction of the Sexual Organs of Heifers and Gilts on PMSG-HCG Stimulation-Histochemical Picture During the Period of Early Embryogenesis. 9th International Congress on Animal Reproduction & A.I. Vol.IV Symposia (1-5) p.66-69, Spain-MADRID-Espana.

54. Seidel, Jr.G.E. (1975): Embryo Transfer II. Procedures Prior To Surgery. Charolais Bull-O-Gram

55. Seidel, Jr.G.E. (1981): Superovulation and Embryo Transfer in Cattle. Science, 211 (23), 351-358. No.4479

56. Sloan, M.H., Coley, S.L. and Johnson, A.D. (1974): The influence of a cannula in the rabbit oviduct. II. Effect on embryo survival. J.Reprod.Fertil., 37, 155-158.

57. Smidt, D. und Ellendorf, F. (1969): Fortpflanzungsbiologie landwirtschaftlicher Nutztiere, BLV Verlagsgesellschaft München Basel Wien s.201-208.

58. Somnath, R., Greenblatt, R.B., Mahesh, V.B. and Jungck, E.C. (1963): Clomiphene Citrate: Further Observations on its use in Induction of Ovulation in the Human and on its Mode of Action. Fertility & Sterility, 14 (6), 575-595.

59. Sönmez, M.E.C. (1990): Sığırlarda Embrio Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması. (Doktora tezi) i.ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı.

60. Spilman, C.H. (1974): Effect of Prostaglandins on the development of rabbit embryos. J.Reprod.Fertil., 39, 403-405.

61. Swanson, S.M., Ijaz, A. and Fahning, M.L. (1987): The use of Acridine Orange and Ethidium Bromide to determine the viability of Preimplantation Mouse Embryos Cultured In Vitro. Br.vet.J., 143, 306-311.

62. Takahashi, Y and Kanagawa, H. (1984): Effects of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF_{2α}. Jpn.J.Vet.Res., 32, 183-189.

63. Trounson, A.O. & Rowson, L.E.A. (1976): Research on Embryo Transfer in Domestic Animals. Journal of the R.A.S.E., 137, 77-85.

64. Tsutsumi, Y., Takeda, T., Yamamoto, K. and Tanabe, Y. (1976): Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits. J.Reprod.Fertil., 48, 393-395.

65. Zavos, P.M., Burchett, M.G. and Edgerton, L.A. (1984): Effect of Clomiphene citrate on pituitary Responsiveness to gonadotropin releasing hormone in Rams and Wethers. Theriogenology, 22 (1), 75-82.

59. Sönmez, M.E.C. (1990): Sığırlarda Embrio Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması. (Doktora tezi) i.ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı.

60. Spilman, C.H. (1974): Effect of Prostaglandins on the development of rabbit embryos. J.Reprod.Fertil., 39, 403-405.

61. Swanson, S.M., Ijaz, A. and Fahning, M.L. (1987): The use of Acridine Orange and Ethidium Bromide to determine the viability of Preimplantation Mouse Embryos Cultured In Vitro. Br.vet.J., 143, 306-311.

62. Takahashi, Y and Kanagawa, H. (1984): Effects of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF_{2α}. Jpn.J.Vet.Res., 32, 183-189.

63. Trounson, A.O. & Rowson, L.E.A. (1976): Research on Embryo Transfer in Domestic Animals. Journal of the R.A.S.E., 137, 77-85.

64. Tsutsumi, Y., Takeda, T., Yamamoto, K. and Tanabe, Y. (1976): Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits. J.Reprod.Fertil., 48, 393-395.

65. Zavos, P.M., Burchett, M.G. and Edgerton, L.A. (1984): Effect of Clomiphene citrate on pituitary Responsiveness to gonadotropin releasing hormone in Rams and Wethers. Theriogenology, 22 (1), 75-82.

59. Sönmez, M.E.C. (1990): Sığırlarda Embrio Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması. (Doktora tezi) i.ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı.

60. Spilman, C.H. (1974): Effect of Prostaglandins on the development of rabbit embryos. J.Reprod.Fertil., 39, 403-405.

61. Swanson, S.M., Ijaz, A. and Fahning, M.L. (1987): The use of Acridine Orange and Ethidium Bromide to determine the viability of Preimplantation Mouse Embryos Cultured In Vitro. Br.vet.J., 143, 306-311.

62. Takahashi, Y and Kanagawa, H. (1984): Effects of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF_{2α}. Jpn.J.Vet.Res., 32, 183-189.

63. Trounson, A.O. & Rowson, L.E.A. (1976): Research on Embryo Transfer in Domestic Animals. Journal of the R.A.S.E., 137, 77-85.

64. Tsutsumi, Y., Takeda, T., Yamamoto, K. and Tanabe, Y. (1976): Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits. J.Reprod.Fertil., 48, 393-395.

65. Zavos, P.M., Burchett, M.G. and Edgerton, L.A. (1984): Effect of Clomiphene citrate on pituitary Responsiveness to gonadotropin releasing hormone in Rams and Wethers. Theriogenology, 22 (1), 75-82.

59. Sönmez, M.E.C. (1990): Sığırlarda Embrio Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması. (Doktora tezi) i.ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı.

60. Spilman, C.H. (1974): Effect of Prostaglandins on the development of rabbit embryos. J.Reprod.Fertil., 39, 403-405.

61. Swanson, S.M., Ijaz, A. and Fahning, M.L. (1987): The use of Acridine Orange and Ethidium Bromide to determine the viability of Preimplantation Mouse Embryos Cultured In Vitro. Br.vet.J., 143, 306-311.

62. Takahashi, Y and Kanagawa, H. (1984): Effects of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF_{2α}. Jpn.J.Vet.Res., 32, 183-189.

63. Trounson, A.O. & Rowson, L.E.A. (1976): Research on Embryo Transfer in Domestic Animals. Journal of the R.A.S.E., 137, 77-85.

64. Tsutsumi, Y., Takeda, T., Yamamoto, K. and Tanabe, Y. (1976): Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits. J.Reprod.Fertil., 48, 393-395.

65. Zavos, P.M., Burchett, M.G. and Edgerton, L.A. (1984): Effect of Clomiphene citrate on pituitary Responsiveness to gonadotropin releasing hormone in Rams and Wethers. Theriogenology, 22 (1), 75-82.

59. Sönmez, M.E.C. (1990): Sığırlarda Embrio Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması. (Doktora tezi) i.ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı.

60. Spilman, C.H. (1974): Effect of Prostaglandins on the development of rabbit embryos. J.Reprod.Fertil., 39, 403-405.

61. Swanson, S.M., Ijaz, A. and Fahning, M.L. (1987): The use of Acridine Orange and Ethidium Bromide to determine the viability of Preimplantation Mouse Embryos Cultured In Vitro. Br.vet.J., 143, 306-311.

62. Takahashi, Y and Kanagawa, H. (1984): Effects of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF_{2α}. Jpn.J.Vet.Res., 32, 183-189.

63. Trounson, A.O. & Rowson, L.E.A. (1976): Research on Embryo Transfer in Domestic Animals. Journal of the R.A.S.E., 137, 77-85.

64. Tsutsumi, Y., Takeda, T., Yamamoto, K. and Tanabe, Y. (1976): Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits. J.Reprod.Fertil., 48, 393-395.

65. Zavos, P.M., Burchett, M.G. and Edgerton, L.A. (1984): Effect of Clomiphene citrate on pituitary Responsiveness to gonadotropin releasing hormone in Rams and Wethers. Theriogenology, 22 (1), 75-82.

59. Sönmez, M.E.C. (1990): Sığırlarda Embrio Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması. (Doktora tezi) i.ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı.

60. Spilman, C.H. (1974): Effect of Prostaglandins on the development of rabbit embryos. J.Reprod.Fertil., 39, 403-405.

61. Swanson, S.M., Ijaz, A. and Fahning, M.L. (1987): The use of Acridine Orange and Ethidium Bromide to determine the viability of Preimplantation Mouse Embryos Cultured In Vitro. Br.vet.J., 143, 306-311.

62. Takahashi, Y and Kanagawa, H. (1984): Effects of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF_{2α}. Jpn.J.Vet.Res., 32, 183-189.

63. Trounson, A.O. & Rowson, L.E.A. (1976): Research on Embryo Transfer in Domestic Animals. Journal of the R.A.S.E., 137, 77-85.

64. Tsutsumi, Y., Takeda, T., Yamamoto, K. and Tanabe, Y. (1976): Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits. J.Reprod.Fertil., 48, 393-395.

65. Zavos, P.M., Burchett, M.G. and Edgerton, L.A. (1984): Effect of Clomiphene citrate on pituitary Responsiveness to gonadotropin releasing hormone in Rams and Wethers. Theriogenology, 22 (1), 75-82.

59. Sönmez, M.E.C. (1990): Sığırlarda Embrio Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması. (Doktora tezi) i.ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı.

60. Spilman, C.H. (1974): Effect of Prostaglandins on the development of rabbit embryos. J.Reprod.Fertil., 39, 403-405.

61. Swanson, S.M., Ijaz, A. and Fahning, M.L. (1987): The use of Acridine Orange and Ethidium Bromide to determine the viability of Preimplantation Mouse Embryos Cultured In Vitro. Br.vet.J., 143, 306-311.

62. Takahashi, Y and Kanagawa, H. (1984): Effects of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF_{2α}. Jpn.J.Vet.Res., 32, 183-189.

63. Trounson, A.O. & Rowson, L.E.A. (1976): Research on Embryo Transfer in Domestic Animals. Journal of the R.A.S.E., 137, 77-85.

64. Tsutsumi, Y., Takeda, T., Yamamoto, K. and Tanabe, Y. (1976): Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits. J.Reprod.Fertil., 48, 393-395.

65. Zavos, P.M., Burchett, M.G. and Edgerton, L.A. (1984): Effect of Clomiphene citrate on pituitary Responsiveness to gonadotropin releasing hormone in Rams and Wethers. Theriogenology, 22 (1), 75-82.

59. Sönmez, M.E.C. (1990): Sığırlarda Embrio Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması. (Doktora tezi) i.ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı.

60. Spilman, C.H. (1974): Effect of Prostaglandins on the development of rabbit embryos. J.Reprod.Fertil., 39, 403-405.

61. Swanson, S.M., Ijaz, A. and Fahning, M.L. (1987): The use of Acridine Orange and Ethidium Bromide to determine the viability of Preimplantation Mouse Embryos Cultured In Vitro. Br.vet.J., 143, 306-311.

62. Takahashi, Y and Kanagawa, H. (1984): Effects of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF_{2α}. Jpn.J.Vet.Res., 32, 183-189.

63. Trounson, A.O. & Rowson, L.E.A. (1976): Research on Embryo Transfer in Domestic Animals. Journal of the R.A.S.E., 137, 77-85.

64. Tsutsumi, Y., Takeda, T., Yamamoto, K. and Tanabe, Y. (1976): Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits. J.Reprod.Fertil., 48, 393-395.

65. Zavos, P.M., Burchett, M.G. and Edgerton, L.A. (1984): Effect of Clomiphene citrate on pituitary Responsiveness to gonadotropin releasing hormone in Rams and Wethers. Theriogenology, 22 (1), 75-82.