
AKADEMİK PERSPEKTİFTEN VETERİNER DOĞUM VE JİNEKOLOJİSİ

Editör: Prof.Dr. Süleyman ÇİLEK



yaz
yayınları

Akademik Perspektiften Veteriner Doğum ve Jinekolojisi

Editör

Prof.Dr. Süleyman ÇİLEK

yaz
yayınları

2025

**Akademik Perspektiften Veteriner Doğum
ve Jinekolojisi**

Editör: Prof.Dr. Süleyman ÇİLEK

© YAZ Yayınları

Bu kitabın her türlü yayın hakkı Yaz Yayınları'na aittir, tüm hakları saklıdır. Kitabın tamamı ya da bir kısmı 5846 sayılı Kanun'un hükümlerine göre, kitabı yayınlayan firmanın önceden izni alınmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemiyle çoğaltılamaz, yayınlanamaz, depolanamaz.

E_ISBN 978-625-5596-85-7

Haziran 2025 – Afyonkarahisar

Dizgi/Mizanpaj: YAZ Yayınları

Kapak Tasarım: YAZ Yayınları

YAZ Yayınları. Yayıncı Sertifika No: 73086

M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar/AFYONKARAHİSAR

www.yazyayinlari.com

yazyayinlari@gmail.com

info@yazyayinlari.com

İÇİNDEKİLER

Dişi Köpeklerde İnfertilite Sebepleri.....	1
<i>Atakan ÇORTU</i>	
Saha Şartlarında Sığırlarda Ovum Pick Up-in Vitro Fertilizasyon (OPU-IVF) ve Güncel Yaklaşımlar	12
<i>Nevzat SAAT, Cansu GÖKTEPE TURHAN</i>	

"Bu kitapta yer alan bölümlerde kullanılan kaynakların, görüşlerin, bulguların, sonuçların, tablo, şekil, resim ve her türlü içeriğin sorumluluğu yazar veya yazarlarına ait olup ulusal ve uluslararası telif haklarına konu olabilecek mali ve hukuki sorumluluk da yazarlara aittir."

DIŞI KÖPEKLERDE İNFERTİLİTE SEBEPLERİ

Atakan ÇORTU¹

1. GİRİŞ

Son yıllarda, gerek safkan köpeklerin popülasyonlarını artırmak için, gerekse de hayvan sahiplerinin maddi ve manevi gerekçelerinden dolayı, köpeklerde fertilite sorunlarının çözümü için veteriner hekimlerden yardım talebinde artış gözlenmektedir. Fertilitenin devamlılığı, oositin dışı üreme kanalındaki fallopi tüpünde döl lenmesinden, sağlıklı bir şekilde doğum gerçekleşinceye kadar uterustaki gelişimine bağlıdır (Zubair, Rehman, Sajid, 2014). Gebe kalma ve sağlıklı bir şekilde doğumun gerçekleşmesinde sorun yaşanması durumuna infertilite denilmektedir (Dockweiler, Cossic, Donnelly, Gilbert, Buckles, Cheong, 2017). Dışı köpeklerde fertilite oranı %70-80 aralığındadır (England ve Anderton, 1992). Fertilite oranı 3 yaşlı dışı köpeklerde en üst seviyeye çıkarken, 7 yaş ve üzeri olanlarda doğan yavru sayısında belirgin bir azalma gözlenmektedir (Blythe ve England, 1993). Bununla birlikte, her ırkın kendine özgü, bir batında ortalama doğan yavru sayısı olduğu için, bir hayvanı subfertil ya da infertil olarak değerlendirmeden önce, yukarıda sözü edilen durumlar ele alınmalıdır (Borge, Tønnessen, Nødtvedt, Indrebø, 2011). Köpekler; bir batında çok yavru doğuran tür varsayıldıklarından, yavru sayısının az olması, yani subfertilite de infertilite ile birlikte incelenmektedir (Dockweiler, Cossic, Donnelly, Gilbert, Buckles, Cheong, 2017).

¹ Dr. Öğr. Üyesi Atakan ÇORTU, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Ana Bilim Dalı, atakancortu@mehmetakif.edu.tr, ORCID: 0000-0003-1662-3352.

Dişi köpeklerde infertilite birçok faktöre bağlı olarak oluşabilmektedir (Zubair, Rehman, Sajid, 2014). Diğer türlerde olduğu gibi, dişi köpeklerde de infertilite, nedenin yönetimsel, nonenfeksiyöz (konjenital, edinsel ve neoplastik hastalıklar) veya enfeksiyöz olmasına göre kategorize edilebilmektedir (Borge, Tønnessen, Nødtvedt, Indrebø, 2011).

2. YÖNETİMSSEL SEBEPLER

Hayvan sahipleri köpeklerini çiftleşmesi için erkek köpek ile yanlış zamanda bir araya getirebilmekte, ya da zaman sorunundan dolayı erkek köpek ile yalnızca 1 kez çiftleşmesine müsaade edebilmektedirler. Bu durum hayvan sahibine bağlı yönetimsel infertilite sebebi olarak bilinmektedir. Tek bir çiftleşme çoğu zaman fertilizasyon için yeterli olsa da, fertilizasyon başarı oranını artırmak için östrus süresince dişi köpeğin erkek köpek ile bir arada bulundurulmasında ve çiftleştirilmesinde fayda bulunmaktadır. Bunun dışında uygun çiftleşme zamanı; vajinal smear, progesteron ölçümleri ve ovaryumların ultrasonografik muayenesi ile belirlenebilmekte ve böylece infertilite sorununu çözülebilmektedir (Fontbonne ve Malandain, 2006; Johnston, Olson, Root, 1994).

3. NON ENFEKSİYÖZ SEBEPLER

Çeşitli ilaçlar, immun sistemi baskılayan hastalıklar, kromozomal veya ovaryum anomalileri nedeniyle dişi köpeklerde kalıcı anöstrus görülebilmektedir (Sontas, Schwendenwein, Schäfer-Somi, 2014). Örneğin hipotiroidizm bulunan köpeklerde; infertilite, uzun süren anöstrus, abort ve ölü doğumlar rapor edilmiştir (Panciera, Purswell, Kolster, Werre, Trout, 2012). Progesteron ya da androjen içeren ilaçlar da östrusu baskılayarak, anöstrus sorununa yol açabilmektedir (Hollinshead ve Hanlon,

2019). Hipoluteoidizm, dişi köpeklerde gebelik sırasında progesteron seviyesinde azalmaya neden olarak, embriyonal/fetal kayıplara neden olabilmektedir. Gebeliğin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi için plazma progesteron seviyesinin 2 ng/ml olması gerekmektedir (Onclin, Murphy, Verstegen, 2002).

Anormal sayıda kromozomla ilişkili ovaryum displazisini de içeren doğumsal anomaliler (konjenital), dişi köpeklerde steriliteye neden olmaktadır (Johnston, Buoen, Weber, Madl, 1985). Gebelikte hormonların eksojen yolla kullanımı, fetüste müllerian kanalın segmental aplazisine ve müllerian kanal ile ürogenital sinüs arasındaki bağlantı yapısını bozarak steriliteye yol açabilmektedir (McCredie, Ledger, Venetis, 2017). İnterseksüel köpeklerin cinsel organları belirsizdir. Dişi köpeklerde bu durum genellikle dış bakıdaki farklılık nedeniyle belirlenmektedir. Dışarıdan bakıldığında köpek, dişi üreme organlarına sahip gibi görünmektedir ancak pubertas zamanı geldiğinde klitoris büyüyüp gelişebilmekte ve erkeksi davranışlar gelişebilmektedir. İnterseksüel köpeklerin kromozomlarında, gonadlarında ya da fenotiplerinde anormallikler mevcuttur (Meyers-Wallen, Lee, Manganaro, Kuroda, Maclaughlin, Donahoe, 1993). İnterseksüel köpekler bir ovotestis, iki taraflı uterus ve normal vajinaya sahip gerçek hermafroditler; ovotestis ve/veya epididimislere ve penise sahip gerçek hermafroditler ve XX erkek hermafroditler olmak üzere üçe ayrılmaktadırlar. Fenotipik cinsiyet anomalisi bulunan köpeklerde, kromozomal ve gonadal cinsiyet aynı olmasına rağmen; iç veya dış genital organ farklılaşmış durumdadır. Köpekler dişi veya erkek psödohermafrodit olabilir. Dişi psödohermafroditler genellikle gebelik sırasında androjen veya progestojen uygulanması sonucu ortaya çıkar; dış veya iç genital organları erkekleşmiştir ancak iki ovaryum mevcuttur. Klinik görünüm basit klitoral büyümeden neredeyse erkek benzeri dış genital organ oluşumuna kadar

değişkenlik gösterebilmektedir (McCredie, Ledger, Venetis, 2017).

3.1. Neoplaziler

Genital kanal tümörleri genel olarak fiziksel muayene, tam kan muayenesi, abdominal palpasyon, vajinoskopi, vajinal sitoloji, biyopsi, radyografi ve ultrasonografi ile teşhis edilmektedir. Vajinal tümörler köpeklerde en nadir gözlenen tümörlerden olsa da, genital kanal tümörleri arasında en yaygın olanlarıdır (McCredie, Ledger, Venetis, 2017; Zubair, Rehman, Sajid, 2014). Vajinal tümörlerden birisi olan transmissible venerel tümör, özellikle kontrolsüz bir şekilde bir araya gelen sokak köpeklerinde, vajina içerisinde karnabahar benzeri lezyonlara yol açan bir tümör çeşididir. Kötü huyludur. Vajina içerisinde yer alan lezyonlar nedeniyle infertilite sebebi olabilmektedir (Hiblu, Khabuli, Gaja, 2019).

Köpeklerde uterus tümörleri ile oldukça nadiren karşılaşılmaktadır. Öyle ki uterus tümörleri köpeklerde tüm tümör vakalarının %0,3 ila %0,4'ünü oluşturmaktadırlar (Percival, Singh, Zur Linden, Watrous, Patten, Valverde, Ratsep, 2018). En sık gözlenen uterus tümörü tipi leiomyomdur. Köpeklerde uterus tümörlerinin yüzde 85 ila 95'i iyi huyludur (leiomyom) ve yüzde 10'u ise kötü huyludur (leiomyosarkom). Leiomyom; yavaş büyüyen, invaziv ve metastatik olmayan, içi boş organların düz kaslarından köken alan bir tümördür. Östrojen gibi steroid hormonlar leiomyomların patogenezinde rol oynamaktadır çünkü sıklıkla genital leiomyomlu köpeklerde aynı zamanda östrojen üreten foliküler kistlerin de olduğu görülmektedir. Klinik belirtiler tümörün konumuna, boyutuna ve ayrıca metastaza bağlıdır ve bazen pyometra da bu hastalığa eşlik etmektedir. Uterus leiomyomunda semptomlar, ele gelen karın kitlesi, polidipsi, poliüri, anoreksi ve kilo kaybı, kusma, vajinal akıntı ve kabızlık olarak sıralanabilmektedir. Tanıda batın

radıyografisi ve ultrasonografiden yararlanılmaktadır. Tümör kitlesinin histopatolojisi tanının doğrulanmasında en iyi seçenektir (Mohan, Maiti , Palakkara, Kumar, 2018).

Köpeklerde ovaryumların kompleks yapısı nedeni ile farklı histolojik yapıda ovaryum tümörleri görülebilmektedir. Bunları epitelyal tümörler, germ hücreli tümörler, seks kord stromal (gonadostromal) tümörler ve mezenkimal tümörler oluşturmaktadır (Huber, Škrln, Mamić, Smajlović, Musulin, 2022). En önemlileri, büyümeye eğilimli olduğu için abdominal basınca ve asiteze neden olabilen granüloza hücreli tümörleridir. Genellikle metastaza neden olmazlar ve endokrinolojik olarak aktif değildirler. Ancak bazı durumlarda progesteron salgılayarak östrusu baskılayabilmekte ya da östrojen salgılayarak persiste östruse neden olabilmektedirler. Daha nadiren görülen bir ovaryum tümörü ise papiller kistadenokarsinomdur. Genellikle peritoneal lenfatiklere metastaz yaparak obstrüksiyon ve asitez oluşturmaktadırlar (McCredie, Ledger, Venetis, 2017).

4. ENFEKSİYÖZ SEBEPLER

Uterus enfeksiyonları diğer evcil hayvanlarda olduğu gibi köpeklerde de infertilite sebebidir. Kistik endometriyal hiperplazi/pyometra kompleksi gebelik oluşsa bile implantasyonu zorlaştırdığı için gebeliğin sonlanmasına neden olabilmektedir (Verstegen, Dhaliwal, Verstegen-Onclin, 2008). Köpeklerde herpesvirüs enfeksiyonları, gebelik sırasında fetüse bulaşabilmekte ve bu durumda %100 mortaliteye sahip olmaktadır. Bunun dışında yeni doğan yavrular da annenin oronasal salgıları ile enfeksiyona yakalanabilmektedirler (Kraft, Evermann, McKiernan, Riggs, 1986). Köpeklerde yaygın olarak görülen adenovirus, distemper virüs ve parvovirusun da gebelik sırasında abortlara sebep olduğu bazı çalışmalarda raporlanmıştır (Krakowka, Hoover, Koestner, Ketring, 1977; Rossi, Pauli,

Luginbu'hl, Probst, 1972; Truyen, Wolf, Carmichael, 1996). Toksoplazma, insan ve evcil hayvanlarda gözlenebilen önemli bir hücre içi patojendir (Rodriguez ve Szajnman, 2023). Genellikle çiğ ya da az pişmiş etlerin tüketilmesi ile bulaşan bu hastalık köpeklerde transplasental yol ile fetüslere bulaşarak ölümlerine ve gebeliğin sonlanmasına neden olabilmektedir (Calero-Bernal ve Gennari, 2019). Brusella kanis köpeklerde en yaygın olarak gözlenen infertilite nedenlerinden birisidir. Pubertasa ulaşan her köpek brusella açısından riskli durumdadır. Yavru köpekler henüz fetal hayattayken, annelerini emerken ya da enfekte bir köpek ile bir arada bakılırken hastalığa yakalanabilmektedirler. Brusella kanis bulunan gebe köpeklerde en yaygın gözlenen semptom gebeliğin 45. gününden sonra abortların gözlenmesidir. Yaygın görülen semptomlar arasında fetüste subkutan ödem, hemoraji ve konjesyon bulunmaktadır. Abort sonrası annede 1-6 hafta boyunca koyu renkli ve pis kokulu vajinal akıntı gözlenebilmektedir. Uterusta plasentitis ve endometritis patolojilerine sıklıkla rastlanmaktadır. Bu hastalığı geçiren köpeklerde daha sonra kronik infertilite gözlenebileceği gibi normal bir şekilde gebeliği tamamlayıp yavru da doğurabilmektedirler. Doğan yavrular doğumdan hemen sonra ölebilmekte ya da normal bir şekilde büyüyüp, hastalığı etrafa bulaştırıp puberta sonrası klinik olarak enfekte hale dönüşebilmektedirler (Sebzda ve Kauffman, 2023).

5. SONUÇ

Gebeliğin oluşması ve sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi, embriyo-fetüs ve anne arasındaki birçok biyolojik aktiviteye bağlıdır. Olası bir infertilite nedeni incelenmeden önce, detaylı bir anamnez bilgisi edinilmeli, köpeğin yaşı ve ırkı göz önünde bulundurulmalıdır.

Dişi köpeklerde infertilite, fertilite oranı %70-80 civarında olmasına rağmen, hem safkan köpek popülasyonlarının korunması hem de hayvan sahiplerinin maddi ve manevi beklentileri nedeniyle önemli bir sorun olmayı sürdürmektedir. İnfertilite, yönetimsel hatalar, non-enfeksiyöz (konjenital, edinsel ve neoplastik) ve enfeksiyöz sebepler olmak üzere çok çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır. Yönetimsel hatalara bakacak olursak, özellikle yanlış çiftleşme zamanlaması veya yetersiz çiftleşme gibi sorunlar, uygun diagnostik yöntemlerle (vajinal smear, progesteron ölçümleri, ultrason) kolaylıkla çözülebilmektedir. Non-enfeksiyöz sebepler arasında hipotiroidizm, kromozomal anomaliler, interseksüalite ve genital kanal tümörleri gibi durumlar öne çıkarken, özellikle leiomyom ve granüloza hücre tümörü gibi neoplaziler fertiliteyi ciddi şekilde etkileyebilmektedir. Enfeksiyöz sebepler arasında bulunan Brusella kanis, herpesvirüs, toksoplazma ve kistik endometriyal hiperplazi/pyometra kompleksi gibi patolojiler, gebeliğin sonlanması, abortus ve kronik infertiliteye yol açabilmektedir.

KAYNAKÇA

- Blythe, SA. Ve England, GCW. (1993). Effect of age upon reproductive efficiency in the bitch. *Journal of reproduction and fertility*, 47:549.
- Borge, KS. Tønnessen, R. Nødtvedt, A. Indrebø, A. (2011). Litter size at birth in purebred dogs--a retrospective study of 224 breeds. *Theriogenology*, 75(5), 911-919.
- Calero-Bernal, R. ve Gennari, SM. Clinical Toxoplasmosis in Dogs and Cats: An Update. *Frontiers in Veterinary Science*, 26, 6:54.
- Dockweiler, JC. Cossic, B. Donnelly, CG. Gilbert RO, Buckles E, Cheong SH. (2017). Infertility associated with the absence of endometrial progesterone receptors in a bitch. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(1), 174-178.
- England, GCW ve Anderton, DJ. (1992). Determination of progestogen concentrations in the vaginal fluid of bitches in oestrus. *Veterinary Record*, 130, 143-144.
- Fontbonne, A. ve Malandain, E. (2006). Ovarian ultrasonography and follow- up of estrus in the bitch and queen. *Waltham Focus*, 16, 22-29.
- Hiblu, MA. Khabuli, NM. Gaja, AO. (2019). Canine transmissible venereal tumor: First report of three clinical cases from Tripoli, Libya. *Open Veterinary Journal*, 9(2), 103–105.
- Hollinshead, F. ve Hanlon, D. (2019). Normal progesterone profiles during estrus in the bitch: A prospective analysis of 1420 estrous cycles. *Theriogenology*, 125, 37–42.
- Huber, D.,Škrilin, B. Mamić, M. Smajlović, A. Musulin, A. (2022). Ovarian Suture Granuloma Resembling a Tumor

- in a Bitch. *Topics in Companion Animal Medicine*, 50, 100675.
- Johnston, SD. Buoen, LC. Weber, AF. Madl, JE. (1985). X trisomy in an Airedale bitch with ovarian dysplasia and primary anestrus. *Theriogenology*, 24, 597-607.
- Johnston, SO. Olson, PN. Root, MV. (1994). Clinical approach to infertility in the bitch. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 9, 2-6.
- Kraft, S. Evermann, JF. McKiernan, AJ. Riggs, M. (1986). The role of neonatal canine herpesvirusinfection in mixed infections in older dogs. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, 8, 688–696.
- Krakowka, S. Hoover, EA. Koestner, A. Ketring, K. (1977). Experimental and naturally occurring transplacental transmission of canine distemper virus. *American Journal of Veterinary Research*, 38, 919–922.
- McCredie S, Ledger W, Venetis CA. (2017). Anti-Müllerian hormone kinetics in pregnancy and post-partum: a systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*, 34(5), 522-533.
- Meyers-Wallen, VN. Lee, MM. Manganaro, TF. Kuroda, T. Maclaughlin, D. Donahoe, PK. (1993). Mullerian inhibiting substance is present in embryonic testes of dogs with persistent Mullerian duct syndrome. *Biology of Reproduction*, 48, 1410–1418.
- Mohan, D. Maiti, SK. Palakkara, S. Kumar, N. (2018). Surgical management of multiple uterine tumours in a dog. *MOJ Anatomy & Physiology journal*, 5(2), 117–118.
- Onclin, K. Murphy, B. Verstegen, JP. (2002). Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and

nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology*, 57, 1957-1972.

Panciera, DL. Purswell, BJ. Kolster, KA. Werre, SR. Trout, SW. (2012). Reproductive effects of prolonged experimentally induced hypothyroidism in bitches. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(2), 326-333.

Percival, A. Singh, A. Zur Linden, RA. Watrous, G. Patten, S. Valverde, A. Ratsep, E. (2018). Massive uterine lipoleiomyoma and leiomyoma in a miniature poodle bitch. *The Canadian Veterinary Journal*, 59(8), 845-850.

Rodriguez, JB. Szajnman, SH. (2023). An updated review of chemical compounds with anti-Toxoplasma gondii activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 15, 262:115885.

Rossi, GL. Pauli, B. Luginbuhl, H. Probs, D. (1972). Demonstration by electron microscopy of viruses in cells found by light microscopy to contain inclusion bodies. *Pathol Microbiol (Basel)*, 38, 321-332.

Sebzda, MK. ve Kauffman, LK. Update on Brucella canis: Understanding the Past and Preparing for the Future. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 53(5), 1047-1062.

Sontas, BH. Schwendenwein, I. Schäfer-Somi, S. (2014). Primary anestrus due to dietary hyperthyroidism in a miniature pinscher bitch. *The Canadian Veterinary Journal*, 55(8), 781-785.

Truyen, . Wolf, G. Carmichael, LE. (1996). The “other” parvovirus: first description of the minute virus of canines (Canine parvovirus type 1) in Germany. *Tierärztliche Praxis*, 24, 511-513.

- Verstegen, J. Dhaliwal, G. Verstegen-Onclin, K. (2008). Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*, 70(3), 364-374.
- Zubair, M. Rehman, U. Sajid SM. (2014). Causes of infertility in bitch. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2(10), 565-573.

SAHA ŞARTLARINDA SIĞIRLARDA OVUM PICK UP – İN VİTRO FERTİLİZASYON (OPU- IVF) VE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

Nevzat SAAT¹

Cansu GÖKTEPE TURHAN²

1. GİRİŞ

Sıgır yetiştiriciliğinde genetik ilerlemeyi hızlandırmak amacıyla embriyo üretimi ve transferi uygulamaları son kırk yıldır yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu teknolojilerin gelişmesiyle birlikte, küresel düzeyde her yıl bir milyondan fazla embriyo transfer edilmekte ve bu alan, modern hayvancılığın önemli bir sektörü haline gelmiştir (Viana, 2022). Embriyo üretimindeki artış, bu teknolojinin dünya çapında yaygınlaşmasının temelini oluşturur.

Biyoteknoloji özellikle gelişmiş ülkelerde sağlık, tarım ve hayvancılık gibi farklı sektörlerde yaygınlaşmış; sıgır yetiştiriciliğinde genetik ıslah amacıyla birçok yenilikçi yöntem kullanılmaya başlanmıştır. 1980’li yıllardan itibaren, fertilizasyon teknolojilerinde biyoteknolojik yaklaşımlar ön plana çıkmıştır. Günümüzde, dünya genelinde üretilen embriyoların yaklaşık üçte ikisi laboratuvar ortamında geliştirilmektedir.

¹ Doç. Dr., Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Çağış Yerleşkesi, Paşaköy Mahallesi, Altıeylül, Balıkesir, Türkiye, nevzatsaat@balikesir.edu.tr , ORCID: 0000-0002-8135-6142.

² Doktorant, Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Doğum ve Jinekoloji Doktora Programı, Çağış Yerleşkesi, Paşaköy Mahallesi, Altıeylül, Balıkesir, Türkiye, cansugoktepe@outlook.com , ORCID: 0009-0000-9610-1778.

Hayvancılık sektörü açısından bakıldığında, ticari işletmelerin nihai hedefleri arasında verimlilik, kârlılık ve sürdürülebilirlik ön plandadır. Bu hedeflere ulaşmak için geliştirilen suni tohumlama, *in vivo* ve *in vitro* embriyo transferi gibi üreme teknolojileri, ıslah programlarında yönlendirilmiş çiftleşme stratejileriyle genetik ilerlemeyi desteklemektedir (Lamb vd., 2016; Moore & Thatcher, 2006). Son yıllarda embriyo biyoteknolojisi, yüksek genetik potansiyele sahip dişilerin çoğaltılması amacıyla stratejik olarak kullanılmakta; böylece boğa adayı üretimi mümkün hale gelmektedir (Ferré vd., 2019; Galli vd., 2003).

Türkiye’de ise 2022 yılından itibaren hem *in vivo* hem de *in vitro* embriyo üretiminde gözle görülür bir artış yaşanmıştır. Bu gelişim, başta teknik ekipman ve sarf malzemelere erişimin kolaylaşması ve uzman personel sayısındaki artışla ilişkilendirilebilir. Bugün pek çok özel çiftlik *in vivo* embriyo üretimi yapabilir hale gelmiş, sınırlı sayıdaki çiftlikte ise ovum pick-up – *in vitro* fertilizasyon (OPU-IVF) uygulamaları başlamıştır.

In vivo yöntemde bir donörden ortalama 5 embriyo elde edilirken, hormon uygulamaları nedeniyle her işlemten sonra en az 2 ay dinlendirme süresi gereklidir. Öte yandan, *in vitro* embriyo üretiminde bir OPU seansında donör başına ortalama 2.4 embriyo elde edilebilmekte ve aynı donörden haftada iki defa OPU yapılabilmektedir. Bu sayede, uzun dönemde daha fazla embriyo üretimi sağlanmakta ve donörler daha etkin şekilde değerlendirilebilmektedir (Petyim vd., 2003).

Holstein ırkı sığırlarda uygulanan *in vitro* embriyo transferlerinin başarısı, embriyonun dondurulmuş ya da taze olmasına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Literatürde taze embriyolarla yapılan transferlerde gebelik oranları genellikle %45 ile %60 arasında bildirilmektedir. Bu oranlar, embriyo

kalitesi, alıcı hayvanın fizyolojik durumu ve senkronizasyon protokolü gibi faktörlerden etkilenmektedir (Sanches vd., 2016).

Dondurulmuş embriyolarda ise yöntem farkı önemli bir değişken olarak öne çıkmaktadır. Geleneksel yavaş dondurma (slow freezing) yöntemiyle kriyoprezerve edilen embriyolarda gebelik oranları çoğunlukla %35–45 civarında rapor edilmiştir. Daha modern bir yöntem olan vitrifikasyon (hızlı dondurma) ise embriyonun canlılığını daha iyi korusa da, sahada yapılan transferlerde bu yöntemin gebelik oranları yavaş dondurma ile benzer düzeydedir ve genellikle %36-40 aralığında seyretmektedir. Bazı çalışmalar, optimize kültür ortamları ve protokollerin kullanılmasıyla, dondurulmuş embriyolarla da taze embriyolara yakın sonuçlar elde edilebileceğini öne sürmektedir (Sanches vd., 2016).

Bu bilgiler ışığında, farklı dondurma tekniklerinin ve embriyo tiplerinin gebelik başarısı üzerindeki etkisinin, yalnızca teknik yeterlilikle değil, aynı zamanda uygulanan saha koşulları ve yönetim pratikleriyle de yakından ilişkili olduğu söylenebilir.

Yurtdışından embriyo ithalatıyla kıyaslandığında, yerli üretim amaçlı laboratuvar kurmanın maliyeti daha ekonomik görünmektedir. *İn vivo* embriyo üretim laboratuvarı için yaklaşık 30.000 \$ yatırım gerekirken, *in vitro* üretim sistemleri için bu rakam yaklaşık 120.000 \$ civarındadır. Ancak *in vitro* sistemlerde üretim kapasitesinin daha yüksek olması, maliyet farkının zamanla dengeleneceğini göstermektedir.

2. İN VİTRO EMBRİYO ÜRETİMİ

2.1. *In Vitro* Embriyo Üretim Laboratuvarında Dikkat Edilmesi Gerekenler ve Bulunması Gereken Temel Ekipmanlar

In vitro embriyo üretim laboratuvarlarında temiz ve kirli alanlar net bir şekilde ayrılmalı, bu bölgeler arası geçişler kontrollü olmalıdır. Kontrolsüz insan giriş çıkışları, mümkünse çift kapılı geçiş sistemleri (airlock) ile sınırlandırılmalı ve girişler sadece yetkili personele açık olmalıdır. Laboratuvar ortamının sıcaklığı oda sıcaklığının altına düşmemeli ve sabit tutulmalıdır. Hava kalitesinin sağlanması amacıyla HEPA filtreli havalandırma sistemleri kullanılmalı; pozitif basınç sistemi ile dış ortam havasının içeriye girişi engellenmelidir. Laboratuvardaki ekipman yerleşimi, verimli bir iş akışı sağlayacak şekilde planlanmalıdır. Özellikle inkübatör, laminar flow kabin, mikroskop ve mikromanipülasyon sistemleri ergonomik olarak konumlandırılmalıdır. İnkübatörlerde kullanılan gazların medikal kalite standartlarında olması zorunludur. Ayrıca, inkübatör başta olmak üzere tüm cihazların kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılmalı ve kayıt altına alınmalıdır (Vajta & Kaymaz, 2022).

Tablo 1. *In Vitro* Embriyo Üretim Laboratuvarında Bulunması Gereken Temel Ekipmanlar

Isıtma tablalı stereomikroskop	Masaüstü ısıtma tablası	Otomatik Pipet Seti	Tüp ısıtıcı alüminyum blok	Embriyo Taşıma Çantası
Santrifüj	Su banyosu	Dekanjelatör	Dondurma Cihazı	Transfer Pistolesi
Vorteks	İnkübatör	Buzdolabı	Otoklav	UV lamba

Tablo 1’de belirtilen cihazlar dışında embriyo üretiminde kullanılacak solüsyonlar, falkon tüpleri, eppendorf tüpler, pipet uçları gibi sarf malzemeler gerekmektedir (Vajta & Kaymaz, 2022)

2.2. Ovum Pick-Up Yapmak İçin Gereken Ekipmanlar

- Ultrason cihazı
- Konveks prob
- Prob tutucu – iğne taşıyıcı ataçman
- Vakum pompası
- Tüp ısıtıcı (Toplanan oositlerin sıcak tutulması için)

Bu cihazların haricinde OPU hortumu, OPU iğnesi, falkon tüp gibi sarf malzemeler gerekmektedir (Vajta & Kaymaz, 2022).

2.3. Ovum Pick-Up

Ultrason eşliğinde foliküler aspirasyonla toplanan oositlerden *in vitro* embriyo üretimi, son yıllarda düşük veya marjinal pazara sahip bir yan teknolojiden rutinde kullanılan bir teknoloji konumuna evrilmiştir. Düzenli ve gelişmiş çiftlikler, anaç çiftlikleri, sperma şirketleri genetik iyileştirmeyi hızlandırmak amacıyla yoğun OPU-IVF uygulamaları için çekirdek sürü oluşturmuştur (Kasinathan vd., 2015). Genomik seleksiyonun getirdiği seçim baskısı nedeniyle jenerasyon aralığını kısaltma ihtiyacı, genç donörlerde ve prepubertal buzağılarda OPU-IVF programlarının ticari gelişimini hızlandırmıştır (Taneja vd., 2000).

Ovum pick-up uygulanacak olan donör hayvan travay içerisine alınarak işlem öncesi hazırlıkları yapılır. İlk olarak rektum boşaltıldıktan sonra perineal bölgenin temizlik ve dezenfeksiyonu sağlanır. Donörün işlem sırasında rahat kalması ve manipülasyonların kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi amacıyla alt epidural anestezi uygulanır.

Transvajinal ultrason eşliğinde gerçekleştirilen OPU işlemi sırasında, aspirasyon iğnesi konveks ultrason probunun üzerine monte edilir. Bu iğne, sonografik görüntüleme altında hedeflenen foliküle yönlendirilerek ultrason ekranında görsel

olarak izlenebilir hâle gelir. Aspirasyon iğnesi, genellikle silikon veya teflon malzemeden üretilmiş esnek bir tüp aracılığıyla bir vakum pompasına bağlanır. Bu bağlantı sayesinde, vakum pompası tarafından oluşturulan negatif basınç ile foliküllerin aspirasyonu sağlanır. Yaklaşık 80-100 mmHg olarak uygulanan aspirasyon basıncı, folikül içeriklerinin toplanmasını mümkün kılar. Bu materyal, iğne ile pompa arasına yerleştirilen steril bir toplama kabında biriktirilir. Bu kabın içeriği, daha sonra mikroskop altında değerlendirilerek oositlerin izolasyonu ve sınıflandırılması için kullanılır (Çizmeci vd., 2024).

2.4. Oositlerin Taranması

Aspirasyon işlemi sonrasında, tüp içerisinde toplanan foliküler sıvı özel bir filtre sisteminden geçirilir. Filtrasyonun ardından elde edilen materyal, altı kareli 90 mm çapındaki petri kaplarına aktarılır. Petri kabı içerisinde, stereomikroskop altında "S" şeklinde sistematik bir tarama yöntemi kullanılarak oositlerin varlığı araştırılır. Tespit edilen oositler, dikkatlice toplanarak ayrı bir petri kabına aktarılır. Son aşamada, izole edilen oositlerin morfolojik yapıları değerlendirilerek kalite sınıflandırması yapılır (Kaymaz, 2019).

2.5. Oositlerin Kalite Sınıflandırması

In vitro embriyo üretiminde başarıyı etkileyen temel faktörlerin başında oosit kalitesi gelmektedir. Embriyonik gelişim potansiyeli açısından değerlendirildiğinde, homojen ooplazmaya sahip ve zona pellucidayı tamamen saran, çok katmanlı kumulus hücreleriyle çevrili immatür oositlerin daha avantajlı olduğu bilinmektedir (Brackett & Zuelke, 1993). Morfolojik olarak sağlıklı oositlerde protein sentez mekanizmalarının düzgün işlediği ve bu durumun gelişim süreci üzerinde olumlu etkiler yarattığı bildirilmiştir (Kastrop vd., 1990).

Oositin kalitesi, gelişim evresinde kumulus hücreleri tarafından sağlanan besinsel destek, zona pellucida'nın yapısal

oluşumu ve protein üretimi gibi hayati süreçlerden etkilenmektedir (Camargo vd., 2006). Bu hücreler ayrıca spermin yakalanması, taşınması, hyaluronik asit sentezi ve epidermal büyüme faktörüne yanıt oluşturulması gibi çok sayıda önemli işlevi yerine getirerek oositin genel gelişim kapasitesine doğrudan katkı sunar (Van Soom & de Kruif, 1996).

Oosit kalitesi yalnızca maturasyon ve dölleme süreçleriyle sınırlı kalmayıp, embriyonik gelişim, gebelik oluşumu, gebeliğin devamlılığı ve doğum sonrası yavru sağlığı açısından da belirleyici bir unsurdur (Krisher, 2004). Ancak, oositler foliküler ortamdan ayrıldıktan sonra *in vitro* koşullarda olgunlaşma yeteneğini her zaman sürdürememektedir. Üstelik oositin dış görünüşünden, fertilizasyon ve embriyo gelişimi kapasitesini doğrudan belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle, morfolojik kriterlere dayanan çeşitli değerlendirme sistemleri geliştirilmiştir.

Söz konusu sınıflandırma sistemlerinde; kumulus hücrelerinin varlığı ve yapısı, ooplazmanın homojenliği gibi özellikler göz önünde bulundurularak oositin gelişim potansiyeline dair öngörülerde bulunulabilir (Tablo 2), (Gordon, 2003e). Yapılan çalışmalar, morfolojik olarak normal görünen oositlerin uygun kültür ortamlarında maturasyonlarını başarıyla tamamlayabildiğini; buna karşılık yapısal bozukluk gösteren oositlerde bu başarının oldukça düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle, sitoplazmanın homojen yapıda olması ve en az üç katmanlı sağlam bir kumulus tabakasının varlığı, başarılı *in vitro* maturasyon (IVM) ve sonrasında sağlıklı embriyo gelişimi için önemli kriterler arasında yer almaktadır (Akyol & Sulu, 2005).

Morfolojik değerlendirme sırasında oositin ooplazma yapısı, kumulus hücre tabakalarının sayısı ve bu hücrelerin oosit ile bağlantı durumu esas alınarak kalite sınıflandırması yapılır. Bu

doğrultuda oositler genellikle beş ana sınıfta gruplandırılmaktadır (Jainudeen vd., 2000).

Tablo 2. Oosit kalitelerinin sınıflandırılması ((Jainudeen vd., 2000)

A Kalite	Beşten fazla katmanlı kumulus hücrelerine ve homojen yapılı ooplazmaya sahip oositler
B Kalite	Üç ile beş arasında kumulus hücresi katmanına ve homojen ooplazmaya sahip oositler
C Kalite	Üçten az kumulus katmanına sahip ancak ooplazması homojen olan oositler
D Kalite	Kumulus hücresinden yoksun (çıplak) ve heterojen ooplazmalı oositler
E Kalite	Ağsı dejeneratif yapı gösteren, ileri düzeyde bozulmuş oositler

Bu sınıflandırma, *in vitro* üretim süreçlerinin verimliliğini artırmak amacıyla oosit seçimini kolaylaştıran pratik bir araç olarak kullanılmaktadır.

2.6. Sıyr Oositlerinin *İn Vitro* Maturasyonu

In vitro oosit maturasyonu (IVM), foliküllerden izole edilen oositlerin, kültür ortamında germinal vezikül (GV) evresinden metafaz II (MII) evresine kadar olgunlaşmalarını sağlayan bir süreçtir (Edwards, 1965). Bu süreç, oositlerin *in vivo* ortamdaki doğal gelişim basamaklarını taklit etmeye yönelik olarak tasarlanmıştır. Nükleer maturasyon, döllenme kapasitesi ve erken embriyonik bölünme oranları açısından *in vitro* ve *in vivo* matür oositler benzer özellikler gösterebilir. Ancak bu iki grup arasındaki farklar, özellikle embriyonun blastosist evresine ulaşma hızı ve kalitesi gibi daha ileri gelişim basamaklarında belirginleşebilir (Hyttel vd., 1997). IVM sürecinde oositler, mayozu yeniden başlatanlar ve bu evreye giremeyenler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (Arlotto vd., 1996). GV evresinde kalan oositler, mayoz bölünmeyi başlatamayanlardır. Bu evre genellikle kültüre alındıktan sonraki ilk 0–6 saatlik zaman dilimini kapsamaktadır. Germinal vezikülün kaybı (GVBD) ise 6–8 saatlik periyotta gerçekleşir. *In vitro*

olgunlaştırılan oositlerin, *in vivo* olanlara göre GVBD aşamasına daha erken geçebildikleri bildirilmiştir (De Loos vd., 1994).

Oosit maturasyonundaki bireysel farklılıklar, özellikle birinci kutup cisimciğinin ne zaman serbest bırakılacağını etkileyebilir (Hyttel vd., 1997). GVBD evresinde kromozomlar kaynaşmaya başlarken, 8–10. saatler arasında yoğunlaşırlar. Maturasyonun 10–15. saatleri arasında ise kromozomlar metafaz I evresine ulaşarak ekvatorial düzlem üzerinde sıralanır. Ardından gelen anafaz–I aşamasında homolog kromozomlar ayrılarak kutuplara taşınır. Bu süreç telofaz–I ile birlikte 15–18. saatlik dönemde tamamlanır (Akyol, 2006). Maturasyonun 18–21. saatlerinde birinci kutup cisimciği perivitellin boşluğa atılır ve bu olayın ardından kromozomlar ikinci mayotik bölünme için ooplazma içine konumlanır. Bu aşama, maturasyon sürecinin sonunu temsil eder (Hyttel vd., 1997).

Sığır oositlerinde luteinize edici hormon (LH) etkisiyle başlatılan maturasyon sürecinde, kumulus hücreleri hyaluronik asit üretmeye başlar. Hyaluronik asitin hidrasyonu sonucunda kumulus hücreleri arasındaki boşluklar genişler ve hücreler mukus benzeri bir matriks içinde dağılır. Bu süreç, kumulus ekspansiyonu ve musifikasyon olarak tanımlanmaktadır. Maturasyon sürecinin sonunda granüloza hücreleri östradiol sentezini durdurur, folikül duvarı ovulasyondan hemen önce luteinize olur ve bu da progesteron üretiminde artış ile kumulus hücrelerinde belirgin genişlemeye neden olur (Gordon, 2003c)

Kumulus ekspansiyonu, ovulasyon öncesinde folikülde gerçekleşen en önemli olaylardan biridir. Ovulasyonun ardından sekonder oosit ve onu çevreleyen hücre tabakası oviduk içerisine atılır. Bunu takip eden birkaç saat içerisinde kumulus-oosit kompleksi (KOK) dağılır ve oosit, kumulus hücrelerinden tamamen ayrılarak çıplak hale gelir. Bu olayın, oositin salgıladığı

ve gen ekspresyonunu tetikleyen biyokimyasal sinyaller tarafından desteklendiği düşünülmektedir (Gordon, 2003c).

2.7. *In Vitro* Fertilizasyon

Laboratuvar koşullarında zigot oluşumunu sağlamak amacıyla, seçilmiş ve kapasite kazanmış spermmler, matur hale getirilmiş kumulus-oosit kompleksleriyle bir araya getirilir. *In vitro* fertilizasyon işlemi için sıklıkla Tyrode'un albümin, laktat ve piruvat içeren ortamı ya da glikoz içermeyen, heparinle desteklenmiş sentetik uterin tubal sıvı (SOF) bazlı kültür ortamları tercih edilmektedir (Machaty vd., 2012). Uygun fertilizasyon oranına ulaşmak ve polispermi oranını en aza indirmek amacıyla, her boğa için en uygun sperm konsantrasyonu ön denemelerle belirlenmelidir.

Başarılı bir IVF süreci için fertilizasyon yeteneği yüksek, denenmiş boğa spermmlerinin kullanılması kritik öneme sahiptir (Türk, 2023). Bazı özel durumlarda, genetik açıdan değerli, sınırlı sayıdaki boğadan alınan spermmler kullanılarak yüksek verim elde edilebilir. Ancak bu uygulama, genetik çeşitliliği korumak amacıyla geniş çaplı sığır ıslah programlarında her zaman uygun olmayabilir (Gordon, 2003b).

Fertilizasyon sürecinde spermatozoonlar öncelikle oosit etrafındaki kumulus hücre tabakasını geçer, ardından zona pellusidaya bağlanarak akrozom reaksiyonunu gerçekleştirir ve bu yapıyı delerek içeriye nüfuz eder. Sonrasında sperm hücresi oositin plazma membranına bağlanarak onunla kaynaşır. Bu olayla birlikte oosit aktive olur ve erkek ile dişi pronükleuslar oluşur (Schultz & Kopf, 1995). Koinkübasyon aşamasının ardından kalan kumulus hücreleri zona pellusidadan uzaklaştırılır ve oluşan potansiyel zigotlar, embriyo transferine kadar kültür ortamında geliştirilir (Machaty vd., 2012).

Spermmlerin fertilizasyon yeteneği kazanabilmesi için, dişi üreme kanalında bir dizi fizyolojik dönüşüm geçirmesi gereklidir

(Chang, 1951). Bu dönüşüm “kapasitasyon” olarak adlandırılmakta olup, sperm hücrelerinin oositle başarılı bir şekilde etkileşime girebilmesi için temel bir süreçtir (Austin, 1952). Kapasitasyon esnasında, spermin yüzeyinde kauda epididimis ve seminal plazmadan kaynaklı olarak bulunan bazı proteinler uzaklaştırılır. Bu değişiklikler, spermin zona pellusidayı tanınması ve fertilizasyon sürecini başlatabilmesi için kritik öneme sahiptir (Rodriguez-Martinez, 2007).

Kapasitasyonda görev alan bazı biyomoleküller tanımlanmıştır. Özellikle ovidukt sıvısında bulunan proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar bu süreçte önemli rol oynar. Bu bağlamda, oviduktta doğal olarak bulunan bir glikozaminoglikan olan heparin, sıgır spermlerinin *in vitro* kapasitasyonu için etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, heparinin, ovidukt sıvısındaki diğer bileşiklere kıyasla kapasitasyonu daha etkili biçimde indüklediğini göstermiştir (Machaty vd., 2012).

Sperm yüzeyindeki bu proteinlerin uzaklaştırılması, yalnızca doğal yollarla değil, aynı zamanda laboratuvar ortamında da gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin, spermin yıkanması, santrifüjlenmesi ya da silika boncuklarla oluşturulan süreksiz yoğunluk gradyanlarından geçirilmesi, yüzey proteinlerinin ayrıştırılmasında etkili yöntemlerdir (Mendes vd., 2003).

Fizyolojik açıdan bakıldığında, sperm hücreleri epididimisin düşük bikarbonat içeren ortamından, oviduktun bikarbonatça zengin ortamına doğru ilerlerken bu çevresel değişimlere adapte olur (Mastroianni & Komins, 1975). Bu biyokimyasal farklılık, kapasitasyonla ilişkili olan protein kinaz A aracılı fosforilasyon yollarının aktivasyonunu tetikler. Bu nedenle, *in vitro* ortamda kapasitasyonun başarılı bir şekilde indüklenebilmesi için, spermler genellikle yüksek bikarbonat

içeriğine sahip kültür ortamlarında inkübe edilmektedir (Harrison, 2004).

Bununla birlikte, hyaluronik asidin de sığır sperminin kapasitasyonunda etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalar, spermlerin hyaluronik asit içeren ortamlarda hareket ederken maruz kaldıkları yüksek kesme kuvvetlerinin, yüzeylerindeki dekapasitasyon faktörlerini uzaklaştırabileceğini öne sürmektedir (Shamsuddin vd., 1993).

2.8. Sperm Seçimi

In vitro fertilizasyon (IVF) işlemi öncesinde, boğa sperminin ayrıştırılması, genellikle en yüksek ilerleyici hareketliliğe sahip sperm hücrelerinin seçilmesi amacıyla gerçekleştirilir. Bu işlem aynı zamanda istenmeyen spermler, seminal plazma, kriyoprotektif ajanlar ve diğer kirleticilerin ortamdan uzaklaştırılmasına olanak sağlar. Sperm seçimi, çoğunlukla spermin belirli bir süre boyunca bir kültür ortamında yüzmesine izin verilerek yapılır. Bu süreç, sperm hücrelerinin doğal hareketlilikleri sayesinde, ilerleyici hareketliliğe sahip olanların seçilmesine yardımcı olur (Parrish vd., 1986).

Sperm ayırıştırma işlemi için kullanılan bir diğer yaygın yöntem ise süreksiz Percoll gradyan santrifüjüdür (Lessley & Garner, 1983). Percoll, polivinilpirolidonla kaplanmış kolloidal silika partiküllerinden oluşan bir çözücüdür. Spermin, %45 ve %90'lık Percoll gradyanı boyunca santrifüjlenmesi, spermi yoğunluğuna göre ayırmaya yardımcı olur. İyi nükleer morfolojiye ve hücresel bütünlüğe sahip olan spermler, daha yoğun olduklarından, en yüksek yoğunlukta bulunan Percoll katmanında birikir. Aynı zamanda hareketli spermler, santrifüj kuvvetiyle hizalanarak, santrifüj sırasında daha hızlı birikme eğilimi gösterirler (Le Lannou & Blanchard, 1988).

Bir başka sperm seçimi yöntemi ise cam yünü filtrasyonudur. Bu teknik, hareketli hücrelerin oranını artırmak

için kullanılır. Fiziksel olarak hasar görmüş spermiler, cam yünü filtrasyonunda bariyerleri geçemezler ve bu nedenle mekanik olarak cam yününe hapsolurlar (Rhemrev vd., 1989). Bu yöntem, hasarlı spermilerin ayrılmasında etkili bir yol sunar ve böylece sadece sağlıklı ve hareketli spermier embriyo üretim sürecine dahil edilebilir.

2.9. *In Vitro* Kültür

In vitro fertilizasyon (IVF) süreci sonrasında, kültürde blastosist aşamasına kadar gelişen zigotların oranı halen %30-40 civarlarında kalmaktadır (Rizos vd., 2002). Oosit kalitesi, blastosist oranını belirleyen başlıca faktörlerden biri olarak öne çıkarken, *in vitro* kültür ortamı (IVC) ve ortamın takviyeleri, blastosist kalitesini doğrudan etkilemektedir (Krisher, 2004). *In vitro* embriyo gelişimi, çok çeşitli çevresel ve kültürel stres faktörlerine karşı hassasiyet gösterir (Lane & Gardner DK, 2005). Bu stres faktörleri arasında ortamın formülasyonundaki uygunsuzluklar, ortam takviyelerindeki eksiklikler, kültür sistemine bağlı aksaklıklar, teknik sorunlar ve kalite kontrol süreçlerinin yetersizliği gibi etkenler yer alır (Gordon, 2003a).

Sığır *in vitro* embriyo üretim sistemlerinin verimliliğini artırmak için çeşitli stratejiler uygulanmıştır. Bu stratejilerin başında, sığır oosit ve embriyolarının gelişimsel yeterliliklerini olumlu yönde etkileyen uygun kültür ortamlarının ve kültür sistemlerinin seçilmesi gelmektedir (Marquant-Leguienne & Humblot, 1998). *In vitro* embriyo üretimi için özel ortamların formülasyonu, bu stratejilerin en önemli adımlarından biridir. Farklı kültür ortamları ve koşulları ile embriyo gelişimini iyileştirme adına çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Summers & Biggers, 2003).

Memeli embriyolarının implantasyon öncesi kültürlenmesindeki başarı, kültür koşullarının deneysel olarak değiştirilmesi ve embriyoların beslenme gereksinimlerinin daha

iyi anlaşılmasıyla elde edilmiştir (Barnett & Bavister, 1996). Dünyada 1970'lerin sonları ve 1980'lerde, enerji ve protein kaynaklarıyla desteklenen tuz çözeltisinden oluşan geleneksel somatik hücre kültürü ortamları kullanılarak, sığır embriyolarının blastosist aşamasına kadar başarılı bir şekilde kültürlenmesi sağlanmıştır (Orsi, 2006).

2.10. Embriyo Değerlendirme Sistemi

Morfolojik embriyo değerlendirme yöntemi, elde edilen embriyolar arasındaki ince farklılıkları gözlemlerle analiz etmek için insan gözüne dayanan bir tekniktir. İlk yıllarında bu yöntemin öznel, tutarsız ve hataya açık olması nedeniyle eleştirildiği görülmüştür. Bu nedenle, embriyo kalitesini değerlendirme konusunda daha az öznel ve daha güvenilir olabilecek alternatif yöntemlerin araştırılması önem kazanmıştır. Bu alternatiflerden bazıları, embriyonun IVC sürecindeki gelişim potansiyeli, embriyonik metabolik aktivitelerin ölçülmesi, glikoz alımı, canlı-ölü boyaları kullanımı, bilgisayarlı görüntü analizleri, Floresein diasetat vital boyası, DAPI boyası ile ölü hücrelerin tespiti ve tavşan oviduktlarında *in vivo* kültür gibi tekniklerdir (Jahnke vd., 2014).

Tablo 3. IETS kriterlerine göre düzenlenmiş embriyo değerlendirme skalası

Embriyo Gelişim Aşama Kodu		Embriyo Kalite Kodu	
Aşama Kodu	Aşama	Kalite Kodu	Kalite Tanımı
1	Unfertilize Oosit	1	Mükemmel- İyi
2	2-12 Hücreli	2	Orta
3	Erken Morula	3	Zayıf
4	Kompakt Morula	4	Ölü/Dejenere
5	Erken Blastosist		
6	Blastosist		
7	Ekspanded Blastosist		
8	Hatching/Hatched Blastosist		
9	Ekspanding Hatched Blastosist		

Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğu (IETS), 1974 yılında Denver, Colorado'da kurulmuş ve Avrupa Birliği'nde faaliyet gösteren uluslararası bir organizasyondur. IETS, embriyoları ve özelliklerini daha sistematik bir şekilde tanımlamak amacıyla, iki aşamalı bir kodlama sistemi önermiştir. Bu sistem, embriyonun morfolojik değerlendirmesi tamamlandıktan sonra, embriyonun gelişim aşaması ve kalite derecesine göre iki rakamla ifade edilir. Embriyonik gelişim aşamasını tanımlamak için kullanılan standart kodlama, 1 (unfertilize oosit) ile 9 (genişlemiş, çıkmış blastosist) arasında değişmektedir (Şekil 1). Ayrıca, embriyo kalitesine dayalı olarak, embriyonun morfolojik özelliklerine dayalı olarak kodlanan kalite derecesi sayısal bir değere sahiptir ve 1 (mükemmel/iyi) ile 4 (ölü/dejenere) arasında sıralanır (Tablo 3), (Jahnke vd., 2014).

1 Hücre (Aşama Kodu 1): Embriyo gelişiminin 6-8. gününde, sadece tek bir hücreden oluşan yapı, unfertilize oosit (UFO) olarak adlandırılmaktadır. UFO'lar, morfolojik olarak tamamen homojen değildir. Normal bir UFO, genellikle mükemmel bir şekilde yuvarlak bir zona pellusida, düzgün bir oolemma (oosit zar) ve sitoplazmada nispeten homojen bir granül yapısı ile orta büyüklükte bir perivitellin boşluk içerir. Bunun yanı sıra, bazı UFO'lar, sitoplazma parçalanması veya aşırı yoğunlaşma gibi dejenerasyon belirtileri gösterebilir. Bu durum, blastosel boşluğunun yanılması nedeniyle olabilir ve hücre bölünmesi izlenimi uyandırabilir. Ayrıca, bu tür UFO'lar, kompakt morula aşamasına benzer şekilde karışabilecek morfolojik özellikler gösterebilir (Jahnke vd., 2014).

2-12 Hücre (Aşama Kodu 2): 6-8. günde, 2-12 blastomer içeren bir embriyo ölü ya da dejenere kabul edilir ve kriyoprezervasyon ya da transfer için uygun değildir (Jahnke vd., 2014).

Erken Morula (Aşama Kodu 3): En az 16 hücreden oluşan bir hücresel kitle. Bireysel blastomerlerin ayırt edilmesi zordur. Embriyonun hücresel kütlesi, perivitellin boşluğunun büyük bir kısmını kapsar (Jahnke vd., 2014).

Kompakt Morula (Aşama Kodu 4): Bireysel blastomerler birleşerek yoğun, kompakt bir kütle oluşturur. Embriyo kütlesi, perivitellin boşluğunun %60 ila %70'ini kaplar (Jahnke vd., 2014).

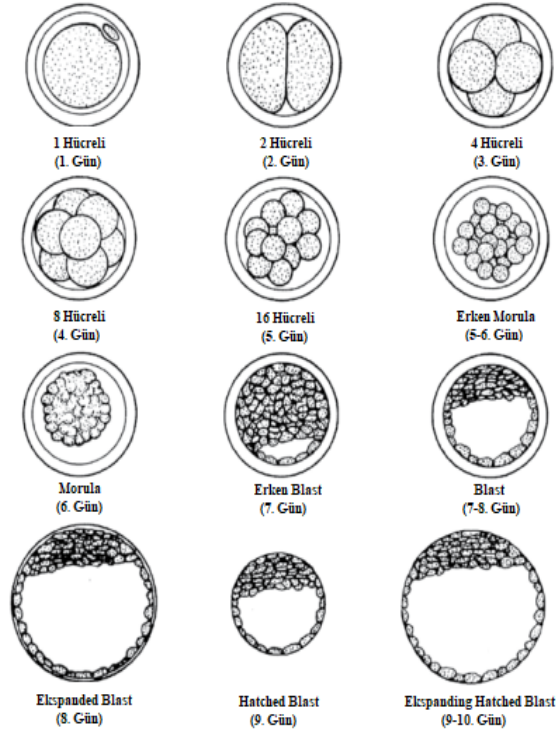
Erken Blastosist (Aşama Kodu 5): Sıvı dolu bir boşluk veya blastosel oluşmuş bir embriyo. Bu aşamada embriyo, perivitellin boşluğunun %70 ila %80'ini doldurur. Başlangıçta, iç hücre kitlesinin trofoblast hücrelerinden ayırt edilmesi zor olabilir (Jahnke vd., 2014).

Blastosist (Aşama Kodu 6): Dış trofoblast tabakası ile daha yoğun ve kompakt iç hücre kitlesi arasındaki farklılaşma belirgindir. Blastosel bariz şekilde görünür ve embriyo, perivitellin boşluğunun büyük bir kısmını kaplar. Bu aşamada, trofoblast ve iç hücre kitlesi arasında görsel olarak ayırım yapılabilir (Jahnke vd., 2014).

Ekspanded Blastosist (Aşama Kodu 7): Zona pellusidanın orijinal kalınlığının yaklaşık üçte birine kadar incelmesi ve embriyonun çapının dramatik şekilde arttığı aşamadır (Jahnke vd., 2014).

Hatching/Çıkmaya Başlayan Blastosist (Aşama Kodu 8): Embriyo, zona pellusidadan çıkma sürecine girebilir ya da tamamen ayrılmış olabilir (Jahnke vd., 2014).

Ekspanding Hatching Blastosist (Aşama Kodu 9): Embriyonun çapı önemli ölçüde büyür, ancak zona pellusidadan tamamen dışarı çıkmış olarak görünen bu aşama, aşama kodu 8 ile benzer görünür (Jahnke vd., 2014).



Şekil 1. Embriyoların günlere göre gelişim aşamaları (Jahnke vd., 2014).

2.11. Embriyo Kalite Derecesi

Embriyo kalite derecesi, embriyonun morfolojik özelliklerine dayanarak görsel olarak belirlenir. Bu değerlendirme, embriyonun blastomerlerinin homojenliği (boyut, renk, şekil), ölü veya dejenere blastomerlerin varlığı, sitoplazmik granülarite derecesi, sitoplazmik vakuoller ve diğer hücresel özellikler göz önünde bulundurularak yapılır.

Kalite Derecesi Kodu 1- Mükemmel veya İyi: Kaliteli 1. derece embriyo, homojen bir blastomer yapısına sahip, simetrik ve küresel bir embriyo kütesine sahiptir. Blastomerler boyut, renk ve yoğunluk açısından birbirine benzer olmalıdır. Zona pellusida sferik şekilli, pürüzsüz olmalı ve embriyonun yüzeyinde

içbükey veya düz yüzeyler bulunmamalıdır. Bu tür embriyolar, kaliteli ve sağlıklı olarak kabul edilir (Jahnke vd., 2014).

Kalite Derecesi Kodu 2- Orta: Embriyonun şeklinde veya blastomerlerin boyut, renk ve yoğunluğunda orta düzeyde düzensizlikler bulunur. Blastomerlerde hafif sitoplazmik pigmentasyon bozuklukları, birkaç vakuol ve bazı düzensizlikler gözlemlenebilir. Yine de embriyo sağlam ve canlıdır ve hücrelerin en az %50'si sağlıklı olmalıdır (Jahnke vd., 2014).

Kalite Derecesi Kodu 3 - Zayıf: Embriyonun şeklinde veya blastomerlerin boyut, renk ve yoğunluğunda belirgin düzensizlikler vardır. Blastomerlerde aşırı pigmentasyon bozuklukları ve çok sayıda vakuol gözlemlenir. Embriyo, gelişiminde zorluk yaşayabilecek ancak hala canlı olan hücrelere sahiptir. Hücrelerin en az %25'i sağlam olmalıdır (Jahnke vd., 2014).

Kalite Derecesi Kodu 4- Ölü veya Dejenere: Kalite derecesi 4 puan alan embriyolar ölü veya dejenere olmuşlardır ve alıcıya transfer edilmemeli ya da dondurulmamalıdır. Bu embriyolar genellikle aşırı koyu sitoplazma, hücre zarlarının bozulması ve diğer ciddi morfolojik kusurlar gösterir (Jahnke vd., 2014).

Embriyo değerlendirmesinin biyolojik bir sistemin öznel bir ölçümü olduğu unutulmamalıdır. Bunun yanı sıra, embriyo transferi sonrasında gebelik şansı, çevresel koşullar, alıcı dişi kalitesi ve teknisyenin deneyimi gibi pek çok faktöre bağlıdır (Mapletoft, 2013).

2.12. Embriyo Dondurma Yöntemleri

Sığır embriyolarının kriyoprezervasyonunda genellikle iki tür prosedür kullanılır; yavaş dondurma ve vitrifikasyon. Vitrifikasyon, buz kristalleri oluşmadan suyun cam benzeri bir yapı olarak katılaşmasını ifade eder. Yavaş hızda dondurmada

düşük konsantrasyonda kriyoprotektan kullanılır, embriyonik hücrelerin dışında buz kristali oluşumu indüklenir ve sıcaklık yavaşça düşürülür, böylece bu buz kristalleri büyür ve hücrelerin içinde buz kristali oluşmadan embriyonik hücrelerden su çeker. Bu işlem, hücreler içindeki kriyoprotektan konsantrasyonu cam benzeri bir yapının oluşmasına izin verecek kadar yüksek olana kadar devam eder. Vitrifikasyonda ise yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan ve çok hızlı soğutma oranları kullanılır, böylece hücrelerin içinde hemen cam benzeri bir yapı oluşur. İki yöntemin bu kısa tanımı, terminolojinin teknik olarak doğru olmadığını göstermektedir çünkü her iki yöntem de sonuçta vitrifikasyonla sonuçlanmaktadır. Bu duruma ulaşmanın farklı yöntemlerini ayırt etmek için kullanılan “yavaş hızda dondurma” ve “vitrifikasyon” terminolojisi kabul görmüş ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Gordon, 2003d).

Yavaş hızda dondurma genellikle kontrollü hızda dondurma olarak adlandırılır çünkü dondurma işleminin çoğu sırasında soğutma hızı kontrol edilir. Kriyoprotektan ile dengeleme ve dondurma için payetleme işlemleri normalde ortam veya oda sıcaklığında gerçekleştirilir. Dondurma işlemi bir cihaz aracılığıyla yapılmaktadır. Sığır embriyoları için genellikle dondurma programının sıcaklığı -6 °C’de başlar. Her geçen dakika sıcaklık 0,3-0,5 °C düşerek soğutma -35°C’ye kadar devam eder. Kısa bir dengeleme süresinden sonra sıvı azota (LN₂) daldırılarak sıcaklık hızla düşürülür (Kenneth, 2014).

Yavaş dondurma metodunun erken fazında kontrollü ve yavaş bir soğutma hızı tercih edilirken, son fazda hücre içi suyun cam benzeri bir yapıya dönüşmesini sağlamak amacıyla hızlı bir soğutma hızı uygulanır. Bu hızlı soğutma, çözme aşamasında da hızlı ısıtmayı zorunlu kılar. Çözünmenin yavaş gerçekleşmesi durumunda, buz kristallerinin oluşması kaçınılmaz hale gelir ve bu durum hücresel yapılarda ciddi hasarlara yol açar. Bu nedenle, çözme işlemi sırasında embriyolar genellikle 30–37 °C

sıcaklıktaki su banyosuna aktarılır ve tüm buzların çözünmesine kadar bu ortamda tutulur. Ancak yapılan çalışmalar, embriyoların LN₂'den çıkar çıkmaz doğrudan sıcak suya alınmaları durumunda zona pellucidada yapısal hasarın arttığını göstermiştir. Bu riskin azaltılabilmesi için, çözme işlemine geçilmeden önce embriyoların yaklaşık 10-30 saniye boyunca havada oda sıcaklığında tutulması ve ardından su banyosuna aktarılması, zona pellucida hasar oranını anlamlı düzeyde azaltmaktadır (Kenneth, 2014).

Kriyoprezervasyonun yaygın bir formu olan vitrifikasyon, klasik yavaş dondurma yönteminden iki temel açıdan farklılık gösterir: daha yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan kullanımı ve son derece hızlı bir soğutma süreci. Vitrifikasyona ilişkin prosedürler çeşitlilik göstermekte olup, günümüzde sığır embriyolarının vitrifikasyonu için evrensel olarak kabul görmüş standart bir yöntem bulunmamaktadır (Kenneth, 2014).

Vitrifikasyonun başarılı olabilmesi için, çözeltinin cam benzeri bir forma geçişini sağlayacak şekilde dakikada 1000 °C veya üzeri soğutma hızlarına ulaşılması gerekmektedir. Ancak bu soğutma hızlarının elde edilebilmesi, yalnızca doğrudan LN₂'ye aktarım ile değil, aynı zamanda yüzey alanı/hacim oranının artırılmasıyla da mümkündür. Bu bağlamda, geleneksel 0.25 mL'lik sperma payetlerinden daha büyük yüzey/hacim oranına sahip taşıyıcılar tercih edilmektedir (Kenneth, 2014).

Sığır embriyolarının vitrifikasyonunda yaygın olarak kullanılan taşıyıcılardan biri "Open Pulled Straw" (OPS) sistemidir. Bu sistem, standart plastik sperma pipetinin ısıtılarak inceltmesi ve çapının daraltılması ile oluşturulmakta, böylece yüzey alanı/hacim oranı artırılmaktadır. Bunun yanı sıra, ultra hızlı soğutma hızları elde etmek amacıyla Cryoloop™, Cryotop™, Cryoleaf™ gibi çeşitli minimal hacimli taşıyıcı sistemler de geliştirilmiştir. Bu sistemler, embriyoların yalnızca

çok küçük bir miktar vitrifikasyon solüsyonu içinde tutulmasını sağlayarak, LN₂'ye doğrudan temasla çok yüksek soğutma hızlarına ulaşılmasına olanak tanır. Ancak, bu taşıyıcılar doğrudan LN₂'ye temas ettiği için, soğutma işlemi tamamlandıktan sonra embriyo ve taşıyıcının kontaminasyon riskine karşı mühürlenebilir bir dış kap içerisine yerleştirilmesi gerekmektedir (Kenneth, 2014).

Aynı yüksek yüzey alanı/hacim oranı prensibi, çözme aşamasında da ultra hızlı ısı transferine olanak sağlar. Bu işlem sırasında embriyolar, genellikle 35–37 °C sıcaklıkta hazırlanmış çözündürme solüsyonlarına aktarılır. Çözündürme solüsyonları çoğunlukla süktroz içermektedir; bu içerik hem kriyoprotektanların kademeli olarak uzaklaştırılmasını hem de hücre içi su dengesinin korunmasını sağlayarak hücrel şışmeyi önler (Kenneth, 2014).

2.13. Embriyo Transferi

Sığırlarda embriyo transferinin başarısı, donör ve alıcı hayvanlarda östrusun senkronizasyonuna büyük ölçüde bağlıdır. Alıcı ve donörün östrusları arasındaki zaman farkının 24 saat içerisinde olması durumunda, embriyo transferi yüksek gebelik oranlarıyla sonuçlanmaktadır (Kenneth, 2014). Alternatif olarak, embriyo transferi daha sonraki bir tarihte yapılacaksa, kriyoprezerve edilmiş embriyoların gelişim evresi ile alıcıların fizyolojik durumu senkronize edilmelidir. Bu senkronizasyon ya doğal yollarla, büyük bir sürünün yönetimiyle sağlanabilir ya da daha ekonomik ve pratik bir yaklaşım olan hormonal östrus senkronizasyon protokolleri kullanılarak gerçekleştirilebilir (Gordon, 2003d).

3. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ovum pick-up, transvajinal ultrasonografi eşliğinde minimal invaziv bir teknik olarak, genetik açıdan değerli donörlerden tekrarlı oosit elde edilmesine olanak tanımakta ve *in vitro* embriyo üretimi verimini artırmaktadır. Embriyoların morfolojik değerlendirmesi, IETS tarafından önerilen çift basamaklı kodlama sistemi ile standartlaştırılmış olup, embriyolar gelişim aşamalarına ve kalite derecelerine göre sistematik biçimde sınıflandırılmaktadır. Bu sistem, embriyo seçimi ve transfer başarısının artırılmasında önemli bir rehber niteliğindedir.

Kriyoprezervasyon yöntemlerinden vitrifikasyon, ultra hızlı soğutma ve çözme prensiplerine dayanan, embriyo canlılığını koruma açısından avantajlı bir tekniktir. Ancak, kullanılan taşıyıcı sistemlerin ve çözdürme protokollerinin hassas şekilde optimize edilmesi gerektiği unutulmamalıdır. Özellikle zona pellucida'nın korunması, vitrifikasyon ve çözülme aşamalarında kritik öneme sahiptir.

Embriyo transferi başarı oranı ise yalnızca embriyo kalitesine değil; alıcı ile donör arasındaki östrus senkronizasyonuna, alıcıların fizyolojik uygunluğuna ve işlemin uygulandığı teknik donanımına da bağlıdır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan cerrahi olmayan transfer yöntemleri hem uygulama kolaylığı hem de saha koşullarına uygunluğu sayesinde önemli avantajlar sağlamaktadır.

Ovum pick-up uygulamalarında kullanılacak donörlerin özenle seçilmesi, ultrasonografi ekipmanının yüksek çözünürlükte olması ve operatörün deneyimi, oosit verimini ve kalitesini doğrudan etkileyen önemli faktörlerdir.

Embriyo değerlendirmelerinde, IETS standartlarının uygulanması, farklı laboratuvarlar arasında ortak bir dilin kullanılmasını sağlar ve embriyo seçiminde tutarlılığı artırır.

Kriyoprezervasyon protokolleri, kullanılan taşıyıcı sistemlerin yüzey alanı/hacim oranına göre optimize edilmeli ve çözündürme aşamasında hızlı ısınma prensipleri titizlikle uygulanmalıdır.

Alıcı hayvanların senkronizasyonu, embriyonun gelişim evresiyle birebir uyumlu olacak şekilde düzenlenmeli ve alıcı fizyolojisinin uygunluğu önceden kontrol edilmelidir.

Son olarak, tüm süreçlerin başarısı, uygulayıcı ekibin bilgi ve deneyim düzeyi, laboratuvar koşullarının standardizasyonu ve hayvan refahı ilkelerine uyum ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle hem pratik uygulamalarda hem de araştırmalarda multidisipliner yaklaşım benimsenmelidir.

KAYNAKÇA

- Akyol, N. (2006). Sığırlarda İn Vivo Oosit Maturasyonu (Derleme). *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 46(2), 47-51.
- Akyol, N., & Sulu, N. (2005). The Effect of Estrous Cow Serum and Fetal Calf Serum on In vitro Embryo Production. *Livestock Studies*, 45(1), 1-8.
- Arlotto, T., Schwartz, J.-L., First, N. L., & Leibfried-Rutledge, M. L. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45(5), 943-956. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00024-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00024-6)
- Austin, C. R. (1952). The 'Capacitation' of the Mammalian Sperm. *Nature*, 170(4321), 326-326. <https://doi.org/10.1038/170326a0>
- Barnett, D., & Bavister, B. (1996). What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 43(1), 105-133.
- Brackett, B. G., & Zuelke, K. A. (1993). Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39(1), 43-64. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90023-X)
- Camargo, L., Viana, J., Sa, W., Ferreira, A., Ramos, A., & Vale Filho, V. (2006). Factors influencing in vitro embryo production. *Animal Reproduction*, 3(1), 19-28.
- Chang, M. (1951). Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tube. *Nature*, 168, 697-698.

- Çizmecı, S. Ü., Dinç, D. A., Bucak, M. N., Yeşilkaya, Ö. F., Çiftçi, M. F., Kivrak, M. B., Sarı, A., Çay, H. A., Gölbaşı, M., & Bodu, M. (2024). Interaction of cumulus-oocyte complex (coc) number, oocyte quality, and blastocyst numbers by repeated ovum pick-up (opu) in in vitro embryo production. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 54(4), 1-8. <https://doi.org/10.56808/2985-1130.1043>
- De Loos, A. M. F., Zeinstra, E., & M. Bevers, M. (1994). Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 39(2), 162-165. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080390207>
- Edwards, R. G. (1965). Maturation in vitro of Mouse, Sheep, Cow, Pig, Rhesus Monkey and Human Ovarian Oocytes. *Nature*, 208(5008), 349-351. <https://doi.org/10.1038/208349a0>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2019). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59(2), 599-616. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01243-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01243-8)
- Gordon, I. (2003a). Culturing and Evaluating the Early Bovine Embryo. İçinde *Laboratory production of cattle embryos* (2. bs, ss. 220-275).
- Gordon, I. (2003b). In Vitro Fertilization. İçinde *Laboratory production of cattle embryos* (2. bs, ss. 176-219).

- Gordon, I. (2003c). Maturing the Bovine Oocyte. İçinde *Laboratory production of cattle embryos* (2. bs, ss. 112-157).
- Gordon, I. (2003d). Preservation of Embryos and Oocytes. İçinde *Laboratory production of cattle embryos* (2. bs, ss. 277-302).
- Gordon, I. (2003e). Recovering the Bovine Oocyte. İçinde I. Gordon (Ed.), *Laboratory production of cattle embryos* (ss. 79-111). CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851996660.0000>
- Harrison, R. A. P. (2004). Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Molecular Reproduction and Development*, 67(3), 337-352. <https://doi.org/10.1002/mrd.20028>
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47(1), 23-32. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6)
- Jahnke, M. M., West, J. K., & Youngs, C. R. (2014). Evaluation of In Vivo Derived Bovine Embryos. İçinde *Bovine Reproduction* (ss. 733-748). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch79>
- Jainudeen, M. R., Wahid, H., & Hafez, E. S. E. (2000). Ovulation Induction, Embryo Production and Transfer. İçinde B. Hafez & E. S. E. Hafez (Ed.), *Reproduction in Farm Animals* (7. bs, ss. 405-430). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119265306>
- Kasinathan, P., Wei, H., Xiang, T., Molina, J. A., Metzger, J., Broek, D., Kasinathan, S., Faber, D. C., & Allan, M. F. (2015). Acceleration of genetic gain in cattle by reduction

- of generation interval. *Scientific Reports*, 5(1), 8674.
<https://doi.org/10.1038/srep08674>
- Kastrop, P. M. M., Bevers, M. M., Destree, O. H. J., & Kruip, Th. A. M. (1990). Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*, 90(1), 305-310.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900305>
- Kaymaz, M. (2019). Yardımcı üreme teknikleri. İçinde A. Semacan, M. Kaymaz, M. Fındık, A. Rıışvanlı, & A. Köker (Ed.), *Çifilik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji* (3. bs, C. 1, ss. 631--718). Medipres Yayınevi.
- Kenneth, B. (2014). Cryopreservation of Bovine Embryos. İçinde R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction*. Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9781118833971>
- Krisher, R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science*, 82 E-Suppl, E14-23. https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE14x
- Lamb, G. C., Mercadante, V. R. G., Henry, D. D., Fontes, P. L. P., Dahlen, C. R., Larson, J. E., & DiLorenzo, N. (2016). Invited Review: Advantages of current and future reproductive technologies for beef cattle production. *The Professional Animal Scientist*, 32(2), 162-171.
<https://doi.org/10.15232/pas.2015-01455>
- Lane, M., & Gardner DK. (2005). Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. *Reproduction, Fertility and Development*, 17(3), 371-378.
- Le Lannou, D., & Blanchard, Y. (1988). Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure.

- Reproduction*, 84(2), 551-556.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840551>
- Lessley, B. A., & Garner, D. L. (1983). Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll®. *Gamete Research*, 7(1), 49-61.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1120070105>
- Machaty, Z., Peippo, J., & Peter, A. (2012). Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology*, 78(5), 937-950.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.003>
- Mapletoft, R. J. (2013). History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*, 10(3), 168-173.
- Marquant-Leguienne, B., & Humblot, P. (1998). Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*, 49(1), 3-11.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00397-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00397-X)
- Mastroianni, Jr. , L., & Komins, J. (1975). Capacitation, Ovum Maturation, Fertilization and Preimplantation Development in the Oviduct. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 6(3-4), 226-233.
<https://doi.org/10.1159/000301519>
- Mendes, J. O. B., Burns, P. D., De La Torre-Sanchez, J. F., & Seidel, G. E. (2003). Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*, 60(2), 331-340.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00029-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00029-3)
- Moore, K., & Thatcher, W. W. (2006). Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1254-1266.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72194-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72194-4)

- Orsi, N. M. (2006). Embryotoxicity of the nitric oxide donor sodium nitroprusside in preimplantation bovine embryos in vitro. *Animal Reproduction Science*, 91(3-4), 225-236. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.008>
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4), 591-600. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90143-3)
- Petyim, S., Båge, R., Hallap, T., Bergqvist, A.-S., Rodríguez-Martínez, H., & Larsson, B. (2003). Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology*, 60(1), 175-188. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01363-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01363-8)
- Rhemrev, J., Jeyendran, R. S., Vermeiden, J. P. W., & Zaneveld, L. J. D. (1989). Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation*†. *Fertility and Sterility*, 51(4), 685-690. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)60622-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60622-2)
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234-248. <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>
- Rodriguez-Martinez, H. (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 68, S138-S146. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.018>
- Sanches, B. V., Lunardelli, P. A., Tannura, J. H., Cardoso, B. L., Colombo Pereira, M. H., Gaitkoski, D., Basso, A. C.,

- Arnold, D. R., & Seneda, M. M. (2016). A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*, 85(6), 1147-1151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.029>
- Schultz, R. M., & Kopf, G. S. (1995). 2 *Molecular Basis of Mammalian Egg Activation* (ss. 21-62). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60563-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60563-3)
- Shamsuddin, M., Rodriguez-Martinez, H., & Larsson, B. (1993). Fertilizing capacity of bovine spermatozoa selected after swim-up in hyaluronic acid-containing medium. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(3), 307. <https://doi.org/10.1071/RD9930307>
- Summers, M. C., & Biggers, J. D. (2003). Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human Reproduction Update*, 9(6), 557-582. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg039>
- Taneja, M., Bols, P. E. J., de Velde, A. Van, Ju, J.-C., Schreiber, D., Tripp, M. W., Levine, H., Echelard, Y., Riesen, J., & Yang, X. (2000). Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes In Vitro and In Vivo: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation1. *Biology of Reproduction*, 62(1), 206-213. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.206>
- Türk, G. (2023). Reprodüktif Biyoteknoloji-Spermatozoonlarda cinsiyet tayini. İçinde M. Soylu, K. Ak, E. Akçay, A. Baran, M. Evecen, & M. Tırpan (Ed.), *Hayvanlarda Reprodüksiyon, Androloji ve Yardımcı Üreme Teknikleri* (1. bs, ss. 273-277). Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.

- Vajta, G., & Kaymaz, M. (2022). Yapı. İçinde Molnár László (Ed.), *Oosit ve Embriyolar Hakkında* (ss. 13-22). Kucsák Könyvkötészeti és Nyomda.
- Van Soom, A., & de Kruif, A. (1996). Oocyte Maturation, Sperm Capacitation and Pre-implantation Development in the Bovine: Implications for in vitro Production of Embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 31(3), 687-701. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1996.tb01441.x>
- Viana, J. (2022). 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*.

AKADEMİK PERSPEKTİFTEN
VETERİNER DOĞUM VE JİNEKOLOJİSİ

yaz
yayınları

YAZ Yayınları
M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar / AFYONKARAHİSAR
Tel : (0 531) 880 92 99
yazyayinlari@gmail.com • www.yazyayinlari.com