



### İneklerde Süperovulasyon Uygulamalarında Son Gelişmeler\*

Uğur KARA<sup>1</sup>, Tayfur BEKYÜREK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji ABD, Kayseri-TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar: Uğur KARA; E-posta: ugunvetkara@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-7977-6826

Atıf yapmak için: Kara U, Bekyürek T. İneklerde süperovulasyon uygulamalarında son gelişmeler. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(3): 224-232.

**Özet:** Süperovulasyon uygulamalarının amacı maksimum sayıda fertilizasyon ve transfer edilebilir embriyo elde etmektir. Süperovulasyon uygulanan sığırlarda ovaryum fonksiyonel cevabındaki farklılıklar ve bu durumun önceden tahmin edilememesi embriyo transfer programlarının karlılığını ve uygulanabilirliğini olumsuz etkilemektedir. Donörlerin süperovulasyon uygulamalarına verdikleri fonksiyonel yanıt farklılıkları gonadotropin uygulamasının başlangıcında ovaryumlar üzerindeki foliküler gelişim aşamalarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Östrus siklusunun 8-12. günleri arasında uygulamaya başlanılan geleneksel süperovulasyon yöntemlerinin yoğun iş gücü gereksinimi ve donörlerin aynı zaman ve siklus aşamasında uygulamaya alınamaması gibi önemli dezavantajları uygulayıcıları alternatif süperovulasyon yöntemlerinin geliştirilmesi arayışına yöneltmiştir. Süperovulasyon yöntemleri saflaştırılmış hipofiz ekstraktları ve progesteron salınımı yapan intravaginal araçların kullanılmaya başlamasından sonra hızla gelişim göstermiştir. Ovaryumun folikül dinamiğinin belirlenmesi, foliküler dalga oluşumunun ekzojen kontrolü ve dominant folikülün baskılayıcı etkisinin ortadan kaldırılmasını temel alan foliküler dalga senkronizasyonu uygulamalarının gerçekleştirilmesi ile siklusun herhangi bir döneminde istenilen sayıda donör hayvana aynı zamanda süperovulasyon uygulanabilmektedir. Ayrıca geliştirilen bu yeni pratik yaklaşımlardan elde edilen sonuçlar geleneksel süperovulasyon yöntemleri ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilir düzeydedir. Sadeleştirilmiş ve optimum sayıda transfer edilebilir embriyo elde edilebilen protokollerin geliştirilmesi embriyo üretimi ve transferi çalışmalarının maliyeti ve uygulanabilirliği üzerine olumlu katkı sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Foliküler dalga, FSH, GnRH, östradiol, süperovulasyon

#### Recent Advances in the Application Superovulation in Cattle

**Summary:** The purpose of superovulation applications is to obtain the maximum number of fertilization and transferable embryos. Differences in ovarian functional responses in superovulated cattle and the unpredictability of this condition negatively affect the profitability and applicability of embryo transfer programs. Differential functional responses of donors to superovulatory applications are due to differences in the stages of follicular development on the ovaries at the onset of gonadotropin administration. The traditional superovulation methods which initiated to be applied between 8-12 days of oestrus cycle the important disadvantages such as the inability of the donors to get into practice at the same time and at the same time as the cycle, have led practitioners to search for alternative superovulation methods. Superovulation methods developed rapidly after the use of purified pituitary extracts and intravaginal devices of progesterone release. Superovulation can be applied to desired number of donor animals at any time during the cycle determination of ovarian follicul dynamic, controlling the exogenous follicular wave appearance and the implementation of synchronization of the follicular wave based on removal of the dominant follicle suppressive effect. Furthermore, the results obtained from these new practical approaches developed are comparable to those obtained by traditional superovulation methods. The development of protocols in which simplified and optimal number of transferable embryos can be obtained will contribute positively to the cost and applicability of embryo production and transfer studies.

**Key words:** Follicular wave, FSH, GnRH, estradiol, superovulation

#### Giriş

Sığırlarda embriyo transferi uygulamaları kullanımı her geçen gün yaygınlaşmakta ancak süperovulasyon uygulamalarının sonuçlarındaki değişkenlik uygulamaların başarısı üzerine günümüzde en önemli

sınırlayıcı faktör olarak etkisini sürdürmektedir (27). Son 10 yılda süperovulasyon ve embriyo transferi (ET) için kullanılan protokol ve tekniklerde yapılan değişikliklere rağmen transfer edilebilir kaliteli embriyo sayısı nispeten değişmeden kalmıştır (63).

Süperovulasyon protokolleri son 40-50 yılda çok hızlı bir gelişim göstermiştir. 1970'lerde ticari hipofiz ekstraktlarının ve prostaglandinlerin (PG), 1980'lerde kısmen saflaştırılmış hipofiz ekstraktları ve progesteron (P4) salınımı yapan araçların geliştirilmesi ile

Geliş Tarihi/Submission Date : 02.08.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 04.03.2019

\*Bu derleme Tagem / Haysüd / 01-09-02-03 kod numaralı Anadolu Alacası Geliştirme Projesi tarafından desteklenen Doktora Tezinden hazırlanmıştır.

1990'larda günümüzde kullandığımız protokollerin birçoğunun oluşturulmasını sağlamıştır. Ayrıca real-time ultrasonografinin kullanımı ile foliküler dalga dinamiklerinin öğrenilmesi ve foliküler dalga ortaya çıkışının kontrol edilebilmesini sağlayan yöntemlerin gelişimi yeni pratik yaklaşımların oluşturulmasını sağlamıştır (26). Ancak foliküler dalga senkronizasyonu amacıyla yapılan uygulamalarda ultrason rehberliğinde folikül ablasyonunun deneyimli personel, ultrason ve ekipman gerektirmesi, uygulama alanının oldukça zor olması ve embriyo üretim merkezi dışındaki çiftliklerde uygulama güçlüğü gibi önemli dezavantajları bulunmaktadır. Buna ilave olarak foliküler dalga senkronizasyonu için en yaygın kullanılan hormon olan östradiolün ülkemizde ve birçok ülkede kullanımına izin verilmemesi süperovulasyon ve embriyo üretimi konusunda uygulayıcıların yeni arayışlara yönelmesine neden olmuştur. Bu amaçla gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ya da luteotropik hormon (LH) kullanımı ile ilgili çalışmalar önem kazanmakta ve siklusun değişik dönemlerinde bu iki hormonun farklı zamanlarda uygulanmasıyla dominant folikülün uzaklaştırılması ve yeni foliküler dalga oluşturularak süperovulasyon uygulamalarına başlanması ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (41).

### **Süperovulasyon**

Süperovulasyon donör olarak seçilen dişi hayvanlara ekzojen hormon uygulaması sonucu önceden belirlenen bir zamanda ovaryumlarında birden fazla folikül gelişimi ve bu foliküllerin ovulasyonlarının gerçekleşmesi olarak tanımlanır (6).

İneklerde süperovulasyon uygulamalarının amacı, maksimum sayıda fertilizasyon ve gebelik oluşturma olasılığı yüksek transfer edilebilir embriyolar elde etmektir (10).

### **Süperovulasyon için donör hayvanların seçimi**

Birçok embriyo transfer programlarında donör hayvan seçimi üç ana kritere bağlı olarak yapılmaktadır: genetik üstünlük, üreme yeteneği ve genetiğin pazar değeri (48).

Donör seçiminde; normal bir postpartum dönem geçirmiş olmalı, 18-24 gün aralığında düzenli östrus siklusları göstermeli, vücut kondüsyon skorunun 2,5-4 olmalıdır. Duveller ineklere göre genellikle daha az embriyo üretirler ve embriyo verimi tahmin etmek güçtür bu nedenle verici olarak seçilen duveller 350 kg ve daha fazla olmalı, düzenli östrus siklusu göstermeli ve iyi gelişmiş üreme sistemine sahip olmalı, genellikle genç donörler (3-8 yaş aralığında) tercih edilmelidir (29).

Donör hayvanlar Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) ve Complex Vertebral Malformation (CVM) gibi kalıtsal hastalıkları (34) ve ayrıca fertilitayı etkileyecek BSE, IBR-IPV, Şap, BVD, Lökoz, Tüber-

küloz, Brusellozis gibi enfeksiyöz hastalık etkenlerini taşımalıdır (43).

### **Süperovulasyon uygulamalarında başarıyı etkileyen faktörler**

Süperovulasyon uygulamasının başarısını etkileyen faktörler kullanılan hormon, seçilen donör hayvana bağlı faktörler ve diğer faktörler olarak üç alt başlıkta değerlendirilebilir. Kullanılan hormon bilinen denemiş preparatlar olmalı, dozu, uygulama şekli, uygulama sayısı, muhafazası ve hazırlanmasında prospektüsünde belirtilen hususlara dikkat edilmelidir. Seçilen donörün yaşı, ırkı, vücut ağırlığı, reproduktif geçmişi, uygulamanın başlangıcında ovaryumlarının durumu ve ovaryum üzerinde dominant folikülün varlığı süperovulasyon başarısını etkilemektedir. Diğer faktörler olarak ortam ısısı, çevre ve mevsim sayılabilir (44). Mevsim (11), yaş (37), süt verimi (12), vücut kondüsyon skoru (13), tekrarlanan süperovulasyon uygulamaları (38) ve östrus siklusunun farklı dönemlerinde süperovulasyon uygulamasının (9) embriyo verimi ve kalitesi üzerine etkisiyle ilgili araştırmalar yapılmıştır.

### **Süperovulasyonda kullanılan hormonlar**

Siğirlarda süperovulasyon amacıyla üç farklı tip gonadotropin kullanılmaktadır: Domuz ve diğer evcil hayvan hipofizlerinden elde edilen gonadotropinler, gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) ya da equine chorionic gonadotropin (eCG) ve human menopausal gonadotropin (hMG)'dir (8).

Folikül stimülan hormonun (FSH) ineklerdeki biyolojik yarılanma süresinin çok kısa olduğundan (yaklaşık iki saat) özellikle süperovulasyon çalışmalarında periyodik tekrarlanan dozlar halinde kullanılmalıdır. (6,7,47). Klasik FSH uygulama protokolü 4-5 gün süre ile günlük iki kez intramusküler (i.m.) enjeksiyon şeklindedir. Total doz ham hipofiz ekstraktı için 28-50 mg, NIH-FSH-P1 kısmen saflaştırılmış hipofiz ekstraktı için 260-400 mg'dir. Uygulamanın başlangıcından sonraki 48 ya da 72. saatte lüteolizis için Prostaglandin<sub>F2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) uygulanmakta, östruslar uygulamadan sonraki 36-48 saatte oluşmakta ve bundan 24-36 saat sonra ovulasyonlar başlamaktadır (24).

eCG hem FSH hem de LH aktivitesine sahip kompleks bir glikoproteindir (53). Yarılanma ömrü 40 saatir ve siğir dolaşımında 10 günden fazla süreyle kalır; bu nedenle normal olarak bir kez i.m. enjeksiyonu yapılır ve bunu 48 saat sonra yapılan PGF<sub>2α</sub> enjeksiyonu takip eder (33). eCG'nin yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle devam eden ovaryum aktivitesi, anovulatör folikül gelişimi, anormal endokrin profiller ve embriyo kalitesinde azalma gibi olumsuzluklar oluşmaktadır (51). Bu problemler östrus başlangıcından 12-18 saat sonra ilk tohumlama sırasında anti-eCG'nin intravenöz olarak verilmesi ile büyük ölçüde aşılmıştır (33,36). eCG süperovulasyon amacıyla uygulanan dozu 2500 internasyonal ünite (IU/

inek'dir. Ancak eCG antikorunun (anti-eCG'nin) ticari olarak bulunmaması önemli bir problemdir (44).

Siğirilerde hMG kullanılarak yapılan süperovulasyon çalışmalarında FSH veya PMSG çalışmalarının sonuçları gibi olumlu ve yeterli sonuç alınamaması, yüksek dozlarında bile ovule olmayan follikül sayısının önemli oranda fazla olması bu hormonun önemli dezavantajlarıdır (7).

### **Süperovulatör hormonlarla birlikte kullanılan diğer hormonlar**

Siğirilerde süperovulasyon uygulamaları öncesi, sırası ve sonrasında; östrus senkronizasyonu, foliküler dalga oluşumunun ekzojen kontrolü ve senkronizasyonu, CL'un luteolizisi, dominant folikülün ovulasyonu ya da regresyonu ve ovulasyonların uyarılması amacıyla süperovulasyonu uyarıcı hormonlarla birlikte birçok hormon kullanılmaktadır. Bunlar GnRH, LH, human koryonik gonadotropin (hCG), P4, PGF<sub>2</sub>α, östrojenler ve anti-PMSG'dir (41).

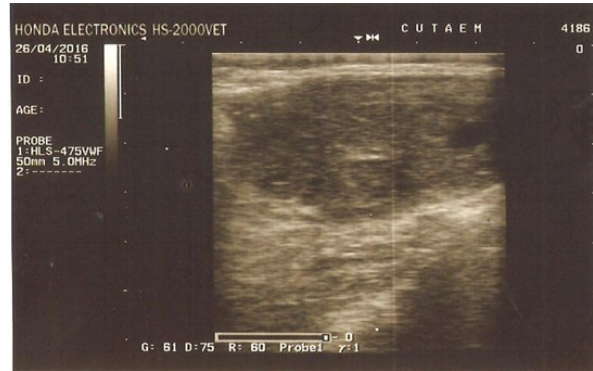
### **Siğirilerde süperovulasyon yöntemleri**

Ticari embriyo transfer programlarının yaygınlaştırılmasından sonra her bir donörden elde edilen embriyo sayısının artırılması amacıyla süperovulasyon yöntemleri sürekli olarak geliştirilmektedir (47). Özellikle 1990'ların başlarında geliştirilen seçilmiş foliküler dalganın ve ovulasyonun kontrolü çiftliklerde yapılan ET çalışmalarında özellikle çok sayıda donör hayvana belirli bir zamanda toplu olarak uygulama yapılabilmesi açısından oldukça önem kazanmıştır (23).

Foliküler dalga ve ovulasyon kontrol programlarının geliştirilmesi süperovulasyon yanıtındaki farklılıkları ortadan kaldırmaya da istenilen zamanda uygulamalara başlanılmasını, donörlerin sabit zamanda tohumlanmasını sağlayarak embriyo transferi çalışmalarına olumlu katkı yapmıştır (24,27,47). Bu gelişmeler doğrultusunda süperovulasyon protokolleri artık daha kullanışlı hale gelmiş, çiftliklerde uygulaması daha kolaylaşmış ve östrus tespit zorunluluğu ortadan kalkmıştır (23).



**Şekil 1.** Süperovulasyon uygulamasına çok iyi fonksiyonel cevap alınmış bir siğir ovaryumu üzerinde tohumlama öncesi süperfolikülasyon görünümü (41).



**Şekil 2.** Süperovulasyon uygulanmış bir siğir ovaryumunda flushing öncesi korpus luteumların görünümü (41).

### **Geleneksel süperovulasyon yöntemleri**

Siğirilerde embriyo transferi uygulamalarının ilk zamanlarında, korpus luteumun doğal regresyonuyla (siklusun yaklaşık 16. günü) uyumlu olarak eCG ile süperovulasyon uygulamaları yapılmıştır (46). PGF<sub>2</sub>α'nın 1970'ler de kullanılmaya başlanmasıyla araştırmacılar FSH ile süperovulasyon uygulamasına östrus siklusunun herhangi bir döneminde ve özellikle östrustan sonraki 8-12. günler arasında başlamışlardır (25,47). Ultrasonografik muayene bulguları üç dalgalı gösteren ineklerde ikinci foliküler dalganın ovulasyondan sonraki 8.5 günde başladığı (siklusun 9.5 gününde), iki foliküler dalgalı siklus gösteren ineklerde ise ovulasyondan sonraki 9.5 günde (siklusun 10.5 gününde) başladığını göstermiştir (3). Bu nedenle östrustan sonra 8-12. günlerde başlanılan geleneksel süperovulasyon protokolleri iki ya da üç dalgalı sikluslarda ikinci foliküler dalganın başlangıç zamanını kapsayacağından ovaryumda süperovulasyon için bir grup gelişen folikül mevcut olacaktır. Foliküler dalganın başlangıcında başlanılan süperovulasyon uygulamalarında daha yüksek fonksiyonel yanıt elde edilmiştir. Foliküler dalganın ortaya çıkışı ile süperovulasyon uygulamalarına başlanması arasında bir günlük bir senkronizasyon uyumsuzluğu fonksiyonel cevabı önemli derecede azaltmaktadır (56). Birçok uygulayıcı azalan dozlarda FSH uygulaması ve protokolün üçüncü günü (5. ve 6. FSH enjeksiyonları ile aynı zamanda) PGF<sub>2</sub>α enjeksiyonunun dördüncü günde 7. ya da 8. FSH enjeksiyonu ile aynı zamanda yapılmasını tercih etmekte, sonraki günde FSH uygulamamaktadırlar (47). Yapılan bir çalışmada süperovulasyon uygulaması sırasında çift PGF<sub>2</sub>α uygulamasının embriyo sayısı ve kalitesi üzerine sayısal olarak olumlu etkisinin olduğu belirlenmiştir (42).

Geleneksel süperovulasyon protokollerinin iki dezavantajı bulunmaktadır: birincisi aksatmadan sürekli östrus tespiti yapan yetişmiş ve deneyimli personel ihtiyacı; ikincisi belirli bir zamanda uygulamaya başlamak için tüm donörlerin aynı zaman diliminde östrusta olmaları zorunluluğudur (22).

### **Foliküler dalga oluşumunun ekzojen kontrolü**

Bir foliküler dalganın dominant folikülü diğer gelişen foliküllerden daha büyüktür ve ürettiği steroid ve nonsteroid maddeler aracılığıyla diğer foliküllerin gelişimini ve yeni foliküler dalga oluşumunu engellemektedir (2). Folikül gelişiminin senkronizasyonu için birkaç yöntem mevcuttur. Yapılan araştırmaların çoğu mevcut dominant folikülün fiziksel ya da hormonal uygulamalar sonucu diğer foliküller üzerindeki baskılayıcı etkisinin ortadan kaldırılması ve belirli bir zamanda yeni foliküler dalga oluşumunun ortaya çıkışının senkronizasyonunu temel almaktadır. Bu amaçla fiziksel olarak elektrokoterizasyon ya da ultrason rehberliğinde folikül ablasyonu yöntemleri: hormonal olarak ise GnRH, LH, östradiol ve P4 kullanılarak belirli bir zamanda yeni bir foliküler dalga oluşumu uyarılmaktadır. Gonadotropin sekresyonunu inhibe eden veya follikülogenezise müdahale eden ovaryum faktörlerinin belirlenmesi folikül gelişiminin ekzojen kontrolü için yeni yöntemlerin geliştirilmesinde önemlidir (25).

### **Süperovulasyon için foliküler dalga senkronizasyonu**

Süperovulasyon amacıyla foliküler dalga oluşumunun senkronizasyonu için kullanılan üç yöntem vardır;

**Östradiol ve progesteron:** Östradiol, FSH ve muhtemelen LH salınımının baskılanması yoluyla FSH ve LH'ya bağımlı foliküllerin gerilemesine neden olur. Folikül regresyonunun başlamasından ve östradiolün metabolize olmasından hemen sonra tekrar FSH salınır ve bir gün sonra yeni bir foliküler dalga ortaya çıkar. Östrus siklusunun dönemi ve foliküler gelişim aşamasına bakılmaksızın progestin implantı uygulanan ineklerde kısa etkili östradiol-17 $\beta$ 'nin kullanılmasını takiben yaklaşık 3-5 gün (ortalama 4 gün) sonra yeni bir foliküler dalga ortaya çıkmıştır (25). En yaygın kullanılan protokol P4 içeren intravaginal aygıtın uygulanmasıyla birlikte 5 mg östradiol-17 $\beta$  ya da 2.5 mg östradiol benzoat, 100 veya 50 mg P4'un i.m. enjeksiyonunu içerir (27,47). Uygulamadan sonraki ortalama 4. günde yeni bir foliküler dalga oluşumu görülmektedir. Gonadotropin uygulamalarına bu zaman diliminde yani 4 gün sonra başlanmalıdır. Östrojen ve P4 uygulanarak yapılan foliküler dalga manüplasyonu sonrası süperovulasyon uygulamalarında elde edilen sonuçlarda geleneksel süperovulasyon uygulamalarındaki gibi transfer edilebilir embriyo sayıları yüksek olmasa da fertilizasyon oranları yapılan iki çalışmada da oldukça yüksek bulunmuştur (21,25). Ancak östradiolün kullanımı, östrojenik maddelerin gıda zincirindeki etkileri ile ilgili endişeler nedeniyle dünyanın birçok ülkesinde yasaklanmıştır (45).

**Folikül ablasyonu:** Bir diğer alternatif yöntem dominant folikülün ultrason rehberliğinde ablasyonu ile

supresif etkisinin ortadan kaldırılmasıdır (17). Başlangıçtaki çalışmalar 5 mm'den büyük tüm foliküllerin ablasyonunu içeriyordu (18), ancak daha sonra dominant folikülün supresif etkisinin ortadan kaldırılması için en büyük iki folikülün ablasyonunun yeterli olduğu sonucuna varılmıştır (14). Foliküler dalganın ortaya çıkışı folikül ablasyonu uygulamasından 24-36 saat sonra çok tutarlı bir şekilde oluşmaktadır ve süperovulasyon uygulamalarına bu zaman diliminde başlanmalıdır. Bu yöntem oldukça etkilidir ve elde edilen sonuçlar bakımından östrojen ve P4 uygulamaları foliküler dalga manüplasyonu ile elde edilen sonuçlardan farkı yoktur (18), ancak folikül ablasyonuna uygun ultrason ekipmanı ve deneyimli personel gerektirir, ayrıca embriyo üretim merkezi dışındaki uygulamalarda kullanımı biraz zordur (26).

**GnRH ya da LH kullanımı:** Bu yöntem dominant folikülün ovulasyonunu uyararak yeni bir foliküler dalga oluşumunu başlatmak için GnRH ve domuz LH' sının kullanımını içerir. GnRH ile dominant folikülün ovulasyonunun uyarılmasından 1.5-2 gün sonra yeni bir foliküler dalga oluşumu başlamaktadır. Fakat foliküler dalga oluşumu sadece GnRH uygulaması sonrası dominant folikülün ovulasyonu şekillendiğinde ortaya çıkmaktadır (49). Son çalışmalarda östrus siklusunun herhangi bir döneminde GnRH uygulaması sonucu sütçü ineklerde % 44-54 (16), etçi düvelerde % 56 (49) ve etçi ineklerde % 60 oranında ovulasyon elde edildiğini bildirilmektedir (60). Bu nedenle GnRH uygulamasından foliküler dalga oluşumunun başlangıcına kadar geçen süre süperovulasyon uygulamaları için çok tutarlı olmayabilmektedir. GnRH ya da LH'nın temel uygulama şekli olarak P4 içeren bir aygıt kullanılır ve bundan 2-3 gün sonra GnRH enjeksiyonu yapılır, süperovulasyon uygulamalarına ise GnRH enjeksiyonundan 1.5-2.5 gün sonra başlanılabileceği bildirilmiştir. Bir P4 içeren aygıtın olması uygun foliküllerin ovulasyonunu engelleyerek GnRH'nin etkinliğini artırmış olabilir (26).

### **İlk foliküler dalga sırasında süperovulasyon**

Bazı araştırmacılar İkinci dalga folikülleri gibi birinci dalganın foliküllerinde gonadotropin uygulamalarına benzer yanıt verdiği ve süperovulasyon yanıtında fark olmadığını belirtmişlerdir (4). Bununla birlikte ilk foliküler dalga sırasında FSH uygulamasıyla birlikte embriyo kalitesinin olumsuz etkilenmemesi amacıyla P4 içeren bir araç kullanılması gerektiği ifade edilmiştir (55). Bir diğer alternatif PGF $_{2\alpha}$  ve P4 içeren aygıtın aynı zamanda uygulanmasını takiben 7. günde GnRH enjeksiyonu ile foliküler dalga oluşumunun senkronize edilmesidir (2). Bu amaçla tavsiye edilen süperovulasyon protokolü P4 içeren aygıt ve PGF $_{2\alpha}$ 'nın aynı zamanda verilmesinden oluşur. Yedi gün sonra GnRH (P4 aygıtı hala yerinde) persiste folikülün ovulasyonu indüklemek ve foliküler dalga oluşumunu senkronize etmek amacıyla uygulanır. GnRH uygulamasından sonraki 1-2 gün içerisinde

yeni foliküler dalga başlayacaktır. FSH uygulamaları-na GnRH uygulamasından 36 saat sonra başlanılmadır (31). P4 içeren aygıt ve PGF<sub>2</sub>α'nın aynı zamanda verilmesini takiben 10. günde ikinci bir PGF<sub>2</sub>α uygulanması ve P4 içeren aygıtın uzaklaştırılması, bundan 48 saat sonra GnRH uygulanması ve GnRH uygulamasından 36 saat sonra foliküler dalga ortaya çıkışı sırasında süperovulasyon uygulamasına başlanılan bir diğer çalışmada da östradiol ile foliküler dalga senkronizasyonuna benzer sonuçlar elde edilmiştir (32). Folikül ablasyonu sonrası süperovulasyon sırasında endojen progesteron kaynağının uzaklaştırılmasının (PGF<sub>2</sub>α ile) embriyo kalitesi ve sayısı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, endojen progesteron kaynağı (CL) uzaklaştırılan donörlerin toplam embriyo ve transfer edilebilir embriyo sayılarının uzaklaştırılmayanlara göre düşük olduğu bildirilmiştir (63).

#### **Subordinat foliküllerin kullanımı**

Küçük foliküller büyümelerine devam etmek için FSH'ya ihtiyaç duyarlar ve elde edilen bulgular sonucu 1 mm kadar küçük çaptaki foliküllerin FSH'nin etkisi altında büyümeye başlayacağı belirtilmektedir (5). Süperovulasyon için yeni folikül ihtiyacının 4-5 günlük süperovulasyon uygulama protokolünün başlangıç zamanında 3-4 mm çap büyüklüğüne ulaşacak küçük antral foliküller tarafından sağlanabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Günde 1-2 mm'lik bir büyüme hızını göz önüne aldığımızda, 1 mm'lik bir folikülün 3-4 mm büyüklüğe ulaşması 2-3 gün süre alabilir bu durumda süperovulasyon protokolüne 2-3 gün ilave edilmelidir. Subordinat foliküllerin büyümesinin uyarılması ve foliküler dalga içerisine daha fazla folikül dahil edilmesi amacıyla süperovulasyon için hormon uygulamasına başlamadan önceki iki gün günde iki kez küçük doz FSH uygulanmış ve sonra toplam verilen FSH miktarında artış olmadan dört gün süre ile günde iki kez düzenli FSH uygulaması ile süperovulasyon protokolüne başlanılmıştır. Bir diğer alternatif uygulama ise FSH ile iki gün günde iki kez yapılan ön uygulamanın yerine düşük dozda tek uygulama eCG enjeksiyonunun yapılmasıdır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda FSH uygulamasına başlanılmadan önce uygulanan eCG'nin foliküler dalga içerisine ilave yeni folikülleri dahil ettiği varsayımı öne sürülmüştür (26). Bir çalışmada etçi donörlere FSH uygulamasına başlamadan iki gün önce 500 IU eCG uygulanmasının süperovulasyon yanıtını olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (30). Diğer bir çalışmada 400 IU eCG ile ön uygulama yapılan etçi donörlerde, eCG uygulanmadan yapılan süperovulasyon uygulamalarına göre embriyo veriminde artış elde edildiği belirtilmiştir (20).

#### **Tek veya iki FSH enjeksiyonu ile süperovulasyon**

Süperovulasyon uygulamalarında günde iki kez FSH uygulaması zorunluluğunun sürekli dikkat ve iş gücü gerektirmesi çiftlik personeli ve donörler de yaralan-

ma riskini, çiftlik personelinin hatalı uygulama ve yanlış kullanım olasılıklarını artırmaktadır. Buna ek olarak günde iki enjeksiyon donörlerde aşırı strese neden olabilmekte, süperovulasyon yanıtının azalmasına yol açabilmekte (19) ve preovulatör LH profillerinin değişimine neden olabilmektedir (61). Sadeleştirilmiş süperovulasyon protokolleri ile uygulama maliyetleri azaltılabilir ve uysal olmayan hayvanlarda dahi iyi sonuçlar alınması mümkün olabilir (23,28).

FSH'nin toplam uygulama dozunun tek seferde subkutan enjeksiyon şeklinde uygulanması ile, dört gün boyunca günde iki kez i.m. enjeksiyon yapılan protokollerde elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar alındığı bildirilmiştir (19,28). Bununla birlikte süperovulasyon cevabı vücut kondüsyonuyla da ilişkilidir. Deri altı adipoz dokusu fazla olan ineklerde boyun bölgesinden ziyade omuz gerisine yapılan subkutan enjeksiyonlarda yarılanma ömrü kısa olan FSH'nin yağ dokusu içerisinde yavaş emilimi ile oldukça yüksek bir süperovulasyon cevabı alınmıştır. Aslında FSH'nin hızlı emilimine neden olan tüm faktörler (örneğin yağsız hayvanlarda boyun bölgesinden i.m. enjeksiyon gibi) süperovulasyon cevabının azalmasına neden olmuştur (23). Holştayn ineklerde subkutan yağ dokusunun azlığından kaynaklanan tutarsız sonuçlar FSH dozlarının bölünerek %75'nin uygulamanın başlangıcında, kalan %25'nin 48 saat sonra azda olsa adipoz yağ dokusu bulunan omuz bölgesinden yapılmasıyla kısmen aşıldığı bildirilmiştir (28). Son yıllarda birkaç gün boyunca yavaş ve sürekli salınımını sağlayan bir polimer kullanılarak (20 mg/ml hyaluronan) seyreltilmiş FSH'nin tek bir i.m. enjeksiyonu ile çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar bakımından günde iki kez düzenli FSH enjeksiyonu yapılan donörlerin verileriyle karşılaştırıldığında farklılık bulunmamıştır (22,28,62).

#### **Uzun FSH uygulama protokolleri**

Son zamanlarda etçi donörler ile yapılan bir çalışmada FSH uygulamasının uygulanan toplam doz miktarı değişmeden sadece uygulama sayısı ve süresi artırılarak (7 gün, 14 enjeksiyon) yapılmasının süperovulasyon fonksiyonel cevabını artırdığı ve oosit/embriyo gelişimi üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmiştir (35). Uzamış FSH enjeksiyon uygulamalarının folikül gelişimini devam ettirdiği, oosit/embriyo gelişiminde bir azalma olmadan ovulasyon sayısını artırdığı ve daha fazla sayıda foliküle ovulasyon yeteneğini kazandırdığı anlaşılmıştır (23).

#### **Süperovulasyonun final aşamasında eCG kullanımı**

Süperovulasyon sırasında farklı zamanlarda FSH ve LH'ya olan ihtiyaç tartışılmıştır. Folikül gelişimine ilişkin temel çalışmalar FSH'nin folikül oluşumu ve gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir (1). Dominant foliküller seçildikten sonra LH reseptörleri gelişir

ve LH'ya bağımlı hale gelirler (50). Bu nedenle süperovulasyon protokolünün sonuna doğru protokole LH'nın dahil edilmesi süperovulasyon uygulanan donörlerde foliküller gelişime katkı sağlayabilir. eCG hem FSH hem de LH etkisine sahip olduğu için geleneksel FSH süperovulasyon protokollerinin sonlarına doğru büyüyen ve gelişen foliküllerde LH reseptörleri için sürekli bir uyarım oluşturabilir (23).

Süperovulasyon amacıyla FSH uygulamasının dördüncü günü son iki FSH enjeksiyonu yerine 200'er IU eCG enjeksiyonu uygulanan çalışmada toplam ovum/embriyo sayısında ve transfer edilebilir embriyo sayısında kontrol grubuna göre artış olduğunu bildirmiştir (15). Brangus ırkı donörler ile yapılan diğer bir çalışmada kontrol grubunda dört gün boyunca günde iki kez sadece FSH, birinci gruba ilk dört FSH enjeksiyonundan sonra tek doz 400 IU eCG ve ikinci gruba ilk altı FSH uygulamasından sonra 7. ve 8. FSH enjeksiyonu yerine aynı günde iki kez 200'er IU eCG uygulanmıştır. Sonuç olarak 200 IU eCG uygulanan grupta transfer edilebilir embriyo sayısında artış olduğu bildirilmiştir (57). Donör hayvanlarda potansiyel fonksiyonel cevabın istenilen düzeyde olmadığı ve artırılmasının istendiği durumlarda FSH uygulamalarından sonra yapılan eCG uygulamaları ile süperovulasyon fonksiyonel cevabında ve embriyo üretiminde artış elde edilebileceği bildirilmiştir (23).

#### **Folikül sayıları, AMH düzeyi ve süperovulasyon yanıtı**

AMH transforming growth factor- $\beta$  familyasına ait glikoprotein yapıda bir hormondur. Gelişen tüm foliküllerin granuloza hücreleri tarafından üretilir, sağlıklı antral foliküllerde maksimum seviyededir (52). İneklere farklı foliküler dalgalarında gelişen folikül sayısı hayvanlar arasında oldukça değişkenlik gösterir (39). Ayrıca folikül sayılarının dolaşımdaki anti-müllerian hormone (AMH) düzeyi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (40). İneklere üzerinde yapılan bir çalışmada 3-5 mm çapında 30'dan fazla foliküle sahip donörler ile 30'dan az foliküle sahip donörler arasında süperovulasyon sonuçlarında farklılık tespit edildiği bildirilmiştir (59). Benzer şekilde etçi düveler ile yapılan başka bir çalışmada foliküler dalga oluşumu sırasında az sayıda folikül (<15 folikül, >3 mm çapında) bulunan donörlerde çok sayıda folikül (>25 folikül) bulunan donörlerden daha düşük süperovulasyon sonuçları elde edildiği bildirilmiştir (39). Japon siyah inekleri üzerinde yapılan bir çalışmada tohumlama öncesi AMH düzeyleri ile embriyo verimi arasında pozitif bir korelasyon olduğu, yetiştirme döneminde plazma AMH düzeylerinin donör seçiminde süperovulasyon fonksiyonel cevabı ve embriyo verimliliği için başlangıç kriteri olarak kullanılabilirliğini bildirilmiştir (54). Holştayn donörler üzerinde yapılan çalışmada AMH üretimi ile embriyo verimi arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (58).

#### **Sonuç**

Sonuç olarak Embriyo Transferi uygulamaları için sadeleştirilmiş ve optimum sayıda embriyo elde edilebilen protokollerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Son yıllarda geliştirilen foliküler dalga ve ovulasyon kontrol programları süperovulasyon cevabının değişkenliğini ortadan kaldırmaya da istenilen zamanda uygulamalara başlanılmasını sağlayarak embriyo transferi çalışmalarına olumlu katkı sağlamışlardır.

#### **Kaynaklar**

1. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 177-88.
2. Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates. *Can J Anim Sci* 1993; 73: 267-75.
3. Adams GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle; Implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 1994; 4: 19-24.
4. Adams GP, Nasser LF, Bó GA, Garcia A, Del Campo MR, Mapletoft RJ. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 1994; 42: 1103-13.
5. Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Mahli P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 72-80.
6. Alaçam E. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve Infertilite (1.Baskı). Konya 1994; ss. 1-385
7. Akyol N. Sığır embriyo transferinde hormon kullanımı. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg* 2001; 41 (1): 95-105.
8. Alkemade S, Murphy B, Mapletoft R. Superovulation in the cow: effects of biological activity of gonadotropins. In: Proceedings of the 12th Annual Meeting of the American Embryo Transfer Association, Portland, Maine, 1993, pp. 1-19.
9. Andrade JC, Oliveira MA, Lima PF, Guido SI, Bartolomeu CC, Tenório Filho F, Pina VM, Lúnes-Souza TC, Paula NR, Freita JC. The use of steroid hormones in superovulation of Neloro donors at different stages of estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2003; 77: 117-25.
10. Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1993; 39: 7-24.
11. Ayaşan T, Hızlı H, Gök K, Kılıçalp N, Kara U,

- Çamlıdağ A, Karakozak E, Mutlu H, Çoban S, Seğmenoğlu MS. Effect of season upon the embryo quality in donor cows. *J Fac Vet Med Univ Erciyes* 2011; 8(3): 181-6.
12. Ayaşan T, Hızlı H, Çamlıdağ A, Kara U, Gök K, Karakozak E, Çoban S, Mutlu H, Kılıçalp N, Seğmenoğlu MS. The determination of relationship between milk production and the quality of embryo of donor cows. *Indian J Anim Sci* 2011; 81(9): 912-4.
13. Ayaşan T, Asarkaya A, Hızlı H, Gök K, Tekgül A, Karakozak E, Kara U, Seğmenoğlu MS, Çoban S, Mutlu H, Kılıçalp N. The Effect of body condition score on embryo quality of holstein cows. *J Fac Vet Med Univ Kafkas* 2012; 18(1): 91-4.
14. Baracaldo MI, Martinez M, Adams GP, Mapletoft RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1239-50.
15. Barros CM, Barcelos ACZ, Gouvea LM, Meneghel M, Barcelos DS, Barcelos LN, Trinca LA. Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 152 (Abstract).
16. Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3413-24.
17. Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 1994; 42: 895-907.
18. Bergfelt DR, Bó GA, Mapletoft RJ, Adams GP. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the estrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci* 1997; 49: 1-12.
19. Biancucci A, Sbaragli T, Comin A, Sylla L, Monaci M, Peric T, Stradaoli G. Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenology* 2016; 85: 914-21.
20. Bó GA, Carballo Guerrero D, Adams GP. Alternative approaches to setting up donor cows for superovulation. *Theriogenology* 2008; 69: 81-7.
21. Bó GA, Pierson RA, Mapletoft RJ. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro Mate B implants. *Theriogenology* 1991; 36: 169-83.
22. Bó GA, Guerre DC, Tribulo A, Tribulo H, Tribulo R, Rogan D, Mapletoft RJ. New approaches to superovulation in the cow. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 106-12.
23. Bó GA, Mapletoft RJ. Recent Advances in The Control of Follicular Development and Superovulation Protocols in Cattle, 28th Annual Meeting A.E.T.E., September, 7-8, 2012; Saint Malo-France.
24. Bó GA, Baruselli P, Chesta P, Martins C. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 89-101.
25. Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 31-40.
26. Bó GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 40<sup>th</sup> Anniversary Special Issue 2014; 81: 38-48.
27. Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 53-72.
28. Bó GA, Rogan DR, Mapletoft RJ. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology* 2018; 112: 26-33.
29. Bova-Tech Ltd. Web Site, General Information Donors. [http://www.bova-tech.com/general\\_donor\\_cows.php](http://www.bova-tech.com/general_donor_cows.php). Erişim Tarihi: 28 06 2018.
30. Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 495.
31. Carballo Guerrero D, Tribulo A, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four days after progesterone and estradiol administration. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 358.
32. Carballo Guerrero D, Tribulo A, Tribulo R, Tribulo H, Bó GA. Superstimulation in the first follicular wave, without the use of estradiol in bonsmara cattle. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 294 (Abstract).
33. Dieleman S, Bevers M, Vos P, de Loos F. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 1993; 39: 25-42.

34. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine Embryo Technologies. *Theriogenology* 2003; 59: 599-616.
35. García GA, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft RJ. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* 2012; 78(2): 353-60.
36. Gonzalez A, Wang H, Carruthers T, Murphy B, Mapletoft R. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* 1994; 41: 1631-42.
37. Hızlı H, Ayaşan T, Gök K, Kara U, Kılıçalp N, Çamlıdağ A, Karakozak E, Seğmenoğlu MS, Mutlu H, Asarkaya A. The determination of relationship between age and the quality of embryo of donor cows. *J Fac Vet Med Univ Kafkas* 2011;17 (3): 493-7.
38. Hızlı H, Ayaşan T, Kılıçalp N, Kara U, Karakozak E, Özcan BD, Gök K, Çamlıdağ A, Çoban S, Mutlu H, Seğmenoğlu MS. The effects of repeated superovulations on the quality of embryo of donor cows and heifers. *J Fac Vet Med Univ YY* 2012; 23 (1): 11-4.
39. Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod* 2007; 22: 1687-95.
40. Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23: 1-14.
41. Kara U. Östrus senkronizasyonu ve süperovulasyon öncesi gonadotropin uygulamasını takiben kısa süreli ekzojen progesteron verilen ve süperovulasyon uygulanan donörler ile klasik süperovulasyon metodu uygulanan donörlerin elde edilen embriyo sayısı ve kalitesi yönünden karşılaştırılması, Doktora Tezi, Erciyes Üniv Sağ Bil Enst, Kayseri 2018; s.1-124.
42. Kara U, Bekyürek T. The effect of double PGF<sub>2α</sub> administrations applied to donor before oestrus with synchronized CIDR on the number and quality of obtained embryos during embryo transfer in cattle. *Journal of Health Sciences* 2017; 26 (3): 204-10.
43. Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. *Manual of Bovine Embryo Transfer*. National Livestock Breeding Center MAFF, JICA-Japan. 1995.
44. Kaymaz M. Yardımcı Üreme Teknikleri. Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. eds. In: *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji*. Malatya: Medipres 2015; ss. 695-811.
45. Lane E, Austin E, Crowe M. Estrus synchronisation in cattle. Current options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals: a review. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 1-16.
46. Mapletoft R, Bó GA. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24: 278-83.
47. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42(6): 601-11.
48. Mapletoft, RJ. Embryo transfer in the cow: general procedures. *Rev Sci Tech off int Epiz* 1985; (4): 843-58.
49. Martinez MF, Adams GP, Bergfelt D. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci* 1999; 57: 23-33.
50. Mihm M, Evans AC. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: A comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod Dom Anim* 2008; 43 (Suppl 2): 48-56.
51. Mikel-Jenson A, Greve T, Madej A, Edqvist L. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF<sub>2α</sub>-treated cow. *Theriogenology* 1982;18: 33-4.
52. Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé JL. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fertil Dev* 2013; 25: 1-16.
53. Murphy B, Martinuk S. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Rev* 1991; 12: 27-44.
54. Nabenishi H, Kitahara G, Takagi S, Yamazaki A, Osawa T. Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 2017; 60: 19-24.
55. Nasser L, Sá Filho M, Reis E, Rezende C, Maple-



- toft R, Bó GA, Baruselli PS. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011; 76: 320-7.
56. Nasser L, Adams GP, Bó GA, Mapletoft RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 713-24.
57. Reano I, Carballo D, Tribulo A, Tribulo P, Balla E, Bó GA. Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Follitropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. In 'Proceedings VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal - IRAC 2009', 2009; 1: 54 (Abstract).
58. Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé JL, Pillet E, Ponsart C, Fabre S, Monniaux D. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24: 932-44.
59. Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 2004; 62: 227-43.
60. Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of progesterone pre-synchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 2009; 71: 698-706.
61. Stoebel DP, Moberg GP. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci* 1982; 65: 92-6.
62. Tríbulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletoft R J, Bó GA. Superstimulation in beef cattle with a single intramuscular injection of Follitropin-V. *Anim Reprod Sci* 2011; 129: 7-13.
63. Wiley C, Jahnke M, Redifer C., Gunn PJ, Dohman T. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows, *Theriogenology* 2019; 15; 129: 54-60. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.024.