

Düvelerde Embriyo Transferi Öncesi Flunixin Meglumin Uygulamasının Gebelik Oranı Üzerine Etkisi ^[1]

Bülent BÜLBÜL *  Şükrü DURSUN * Mesut KIRBAŞ * Mehmet KÖSE * Seyit ÜMÜTLÜ *

[1] Bu çalışma, 4. Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 25-28 Ekim, 2007, Antalya'da sözlü bildiri olarak sunulmuştur

* Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Konya - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-502

Özet

Bu çalışma ile, östrüsün 7. gününde (östrüs 0) embriyo transferi öncesinde flunixin meglumin (non-steroid anti-inflamatuar) enjeksiyonunun gebelik oranı üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla 39 baş İsviçre Esmeri düve kullanıldı. Östrüs tespitini takiben 7. günde dondurulmuş-çözdürülmüş embriyolar taşıyıcı düvelere transfer edildi. Hayvanlar rastgele iki gruba ayrıldı ve çalışma grubuna (FM grubu, n = 20) transferden 5 dak önce IM yolla 500 mg flunixin meglumin enjeksiyonu yapılırken, diğer grup (Kontrol, n = 19) kontrol olarak bırakıldı ve 2 ml fizyolojik tuzlu su solüsyonu IM olarak enjekte edildi. Bütün hayvanlara dondurulmuş-çözdürülmüş blastosist aşamasında bulunan 1. kalite embriyolar transfer edildi. Transferler çözdürmeden sonraki 5 dak içinde, üst epidural anestezi yardımıyla, corpus luteumun bulunduğu taraftaki kornu uteriye gerçekleştirildi. Gebelik muayeneleri östrüsten sonraki 30. günde ultrason kullanılarak 7.5 MHz rektal prob ile yapıldı. FM ve kontrol gruplarında gebelik oranları %50.0 ve %52.6 olarak tespit edildi. Gruplar arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmadı. Düvelerde dondurulmuş-çözdürülmüş embriyo transferinden 5 dak önce IM yolla 500 mg flunixin meglumin uygulamasının gebelik oranlarına etkisinin olmadığı kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler: Embriyo transferi, Flunixin meglumin, Gebelik oranı

The Effect of Flunixin Meglumine Injected Before Embryo Transfer on Pregnancy Rates in Heifers

Summary

In this study, the effect of flunixin meglumine (non-steroid anti-inflamatuar) injection before embryo transfer on d 7 (oestrus 0) on pregnancy rate was examined. For this aim, 39 Brown Swiss heifers were used. Following the oestrus detection, cryopreserved cattle embryos were transferred on d 7. Treatment animals were chosen randomly and injected intramuscularly 500 mg flunixin meglumine (FM group, n = 20) 5 min before embryo transfer application while the others remained as controls (Control, n = 19) and intramuscularly injected 2 ml of saline solution. All animals were transferred first quality cryopreserved blastosist embryos. Transfers were performed to uterine horn ipsilateral to the corpus luteum in 5 min after thawing with the help of epidural anesthesia. Pregnancy diagnoses were performed on d 30 by ultrasound with 7.5 MHz rectal probe. Pregnancy rates were 50.0% in FM group and 52.6% in Control group. The difference between groups was not significant. It is concluded that 500 mg flunixin meglumine injection 5 min before cryopreserved embryo transfer had no effect on pregnancy rates in heifers.

Keywords: Embryo transfer, Flunixin meglumine, Pregnancy rate

GİRİŞ

Siğirlarda genetik ilerlemeyi ve değerli damızlıkların sayısını kısa sürede arttırmak amacıyla kullanılan embriyo transferi, özellikle hayvancılık alanında ileri düzeydeki ülkelerde rutin uygulamalar arasında yer almakta ^{1,2} ve günümüzde dünya çapında yılda 500.000'den fazla embriyo transferi yapılmaktadır ³. Bununla birlikte embriyo transferi sonucunda elde edilen gebelik oranlarının çok değişken ve maliyetinin de buna bağlı olarak yüksek olabilmesi bahsedilen tekniğin sahada rutin olarak uygulanabilmesini etkileyen en önemli faktörlerin başında gelmektedir ⁴.



İletişim (Correspondence)



+90 332 3551290



bulbulent@hotmail.com

Embriyo transferi tekniği, embriyonun corpus luteumun (CL) bulunduğu ovaryum tarafındaki uterus kornusuna yerleştirilmesini de içermekte ⁵ ve bu sırada genital kanala yapılan manipülasyon, uterus lümenine prostaglandin salgınımına neden olmaktadır ^{6,7}. Araşidonik asitten türeyen yağ asitleri siklo-oksijenaz yoluyla prostaglandin ve bileşiklerine dönüşmektedirler. Reprodüksiyon üzerinde etkili olan en önemli prostaglandinler, prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) ve prostaglandin E₂ olup hormonal, sinirsel, fiziksel veya travmatik uyarılara göre reproduktif kanal içinde değişik hücreler tarafından salgınlmaktadırlar ⁸.

Ruminantlarda CL'dan salgılanan progesteron gebeliğin devamı için zorunlu bir hormondur. PGF_{2α} ve analogları güçlü luteolitik etkili ajanlar olup, diöstrüs döneminin sonuna doğru (östrüs siklusunun 15-17. günlerinde) uterustan salgılanarak, ovaryumda bulunan fonksiyonel CL'un morfolojik ve fonksiyonel olarak regresyona ve onun sekretorik aktivitesinin durmasına neden olmaktadır ^{8,9}. Ayrıca prostaglandinler, genital kanalda spermatozoonların taşınmasında, luteotropik hormon (LH) salgınımında, ovulasyonda ve doğumda rol oynamakta, uterusta kontraksiyonlara sebep olmaktadır ¹⁰. Bunun yanında, PGF_{2α}'nın embriyonun kalite ve yaşamını olumsuz etkilediği çeşitli araştırmacılarca ortaya konmuştur ¹¹⁻¹³.

Güçlü bir non-steroidal anti-inflamatuar madde (NSAID) olan flunixin meglumin (FM), siklooksijenaz enzimini inhibe ederek inflamasyona aracılık eden siklooksijenaz ürünlerinin oluşumunu azaltmaktadır ¹⁴. NSAID'ler bu etkilerini arşidonik asidin prostaglandin G₂'ye dönüşümünü katalizleyen siklooksijenaz enzim sistemini inhibe ederek göstermektedirler. Yapılan bazı çalışmalarda NSAID'lerin bu özelliğinden faydalanılarak endometriumdan PGF_{2α} salgılanmasının baskılandığı belirlenmiştir ^{15,16}.

Bu çalışma ile, östrüsün 7. gününde embriyo transferi sırasında enjekte edilen flunixin meglumin'in gebelik oranı üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Çalışma, Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Konya, Türkiye'de yetiştirilen İsviçre Esmeri düveler üzerinde yürütüldü. Taşıyıcı olarak düzenli siklik aktivite gösteren, reproduktif açıdan sorunsuz ve 18 aylık yaşlarını doldurmuş düvelerin seçilmesine özen gösterildi. Hayvanlar serbest sistemli kapalı ahırlarda barındırıldı ve bütün hayvanlara enstitünün rutin bakım ve besleme şartları uygulandı. Su ise *ad libitum* olarak verildi.

Hayvanların östrüsleri günde üç kez 20'şer dakikalık gözlemlerle tespit edildi. Doğal östrüsleri belirlenen hayvanlar 6. gün (östrüs = 0. gün) linear-array transrektal prob (5-7.5 MHz) kullanılarak ultrason (Falko, Pie Medikal, Hollanda) ile muayene edildi. Muayenede ovaryumlarında en az 2 cm çapında, sert kıvamlı ve tercihen taçlı CL'a sahip olan ve uterus kornularında herhangi bir anormalite (sıvı birikimi, asimetri vb) saptanmayan hayvanlar taşıyıcı olarak seçildi.

Hayvanlar rastgele iki gruba ayrıldı ve çalışma grubundakilere (FM grubu, n = 20) embriyo transferinden 5 dak. önce IM yolla 500 mg flunixin meglumin (Fluvil, Vilsan Veteriner İlaç San. A.Ş., Ankara, Türkiye) enjeksiyonu yapılırken, diğerleri kontrol (Kontrol, n = 19) olarak bırakıldı ve 2 ml fizyolojik tuzlu su solüsyonu IM olarak enjekte edildi.

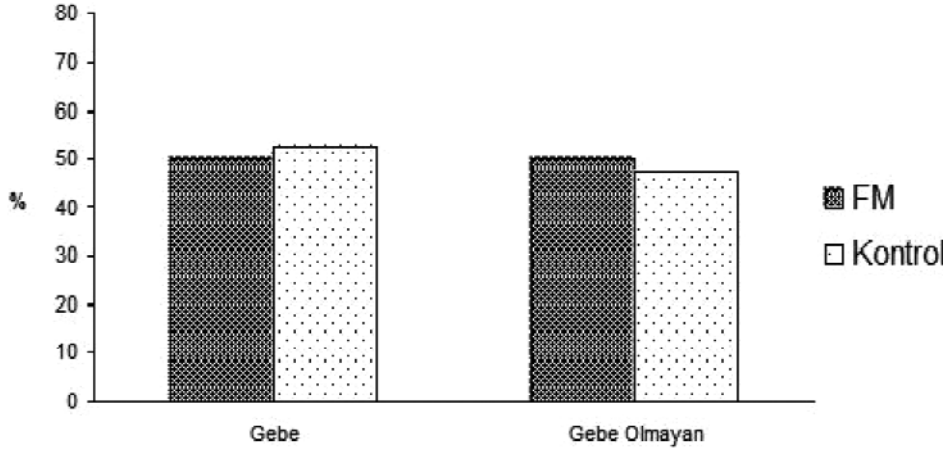
Etilen glikolle direkt transfer metoduna göre dondurulmuş embriyolar ticari bir şirketten (Sunshine Genetics Inc., Whitewater, Wisconsin, USA) sağlandı ve süperovulasyon, embriyo toplama ve dondurma işlemleri bu şirket tarafından gerçekleştirildi. Önceden bildirilen standart süperovulasyon ¹⁷ protokolüne tabi tutulan donör hayvanlara tohumlamadan 7 gün sonra uterus yıkaması gerçekleştirildi. Elde edilen blastosist aşamasındaki birinci kalitedeki embriyolar, uterus yıkamasını takiben 2 saat içerisinde direkt transfer metoduna uygun olarak etilen glikolle Hasler ve ark.'nın ¹⁸ bildirdiği şekilde dondurulmaya başlandı. Dondurma protokolünü kısaca özetlemek gerekirse; PBS+%0.4 BSA+1.5 M etilen glikol solüsyonu içinde payete çekilen embriyolar 20 dak. ekilibrasyona tabi tutulduktan sonra dondurma cihazına yerleştirilerek 15 dak. boyunca -6°C'de bekletilmesini takiben -6°C'de seeding uygulandı, 0.6°C/dak. düşüşle -6°C'den -32°C'ye soğutuldu ve sıvı nitrojene bırakıldı.

Embriyo transferi, embriyonun ve taşıyıcı hayvanın östrüs yaşları birbirine paralel olacak şekilde (± 12 saat), taşıyıcı hayvanın östrüs siklusunun 7. gününde iken yapıldı. Dondurulmuş embriyoların çözdürülmesi, azot tankından çıkarılan payetin 5 sn havada ve bunu takiben 25°C'deki su banyosunda 25 sn tutulmasıyla gerçekleştirildi. Çözdürülen embriyolar zaman kaybetmeden, yaklaşık 5 dak. içerisinde, taşıyıcılara transfer edildi. Embriyolar taşıyıcılara bağırsak peristaltliğini önlemek amacıyla üst epidural anestezi eşliğinde (lidokain HCl, 5-7 ml, Vilcain®, Vilsan, Ankara, Türkiye), CL'un bulunduğu ovaryum tarafındaki kornunun üst 1/3'üne bırakıldı. Gebelik muayenesi östrüsten sonraki 30. günde ultrason kullanılarak yapıldı.

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiki yönden karşılaştırılması ki-kare testiyle (MINITAB, Release 12.1, Minitab Inc.) yapıldı.

BULGULAR

Dondurulmuş-çözdürülmüş embriyoların taşıyıcılara transferinden 5 dak. önce flunixin meglumin enjekte edilen grupta gebelik oranı %50 olurken, kontrol grubunda bu oran %52.6 olarak tespit edildi (Şekil 1). Gruplarda elde edilen gebelik oranları arasındaki fark istatistikî açıdan önemli bulunmadı.



Şekil 1. FM ve Kontrol gruplarında elde edilen gebelik oranları (%)

Fig 1. Pregnancy rates obtained in FM and Control groups (%)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sunulan çalışmada, etilen glikolle direkt transfer metoduna göre dondurulmuş-çözdürülmüş embriyo transferinden elde edilen gebelik oranları bazı araştırmacıların bildirdikleri oranlardan yüksek^{19,20}, bazılarının bildirdiklerinden düşük²¹ ve çoğu araştırmacının bildirdikleri oranlarla benzer bulundu²²⁻²⁴. Çalışmalarda elde edilen gebelik oranları arasındaki farkın, etilen glikolle direkt transfer metoduna göre dondurulmuş-çözdürülmüş embriyo transferinden elde edilen gebelik oranını etkilediği çeşitli araştırmacılarca^{20,25-30} bildirilen embriyo kalitesi, embriyo dondurmada kullanılan vasat, değişik dondurma ya da çözme metodları, embriyo toplama-dondurma ve çözme-transfer arası süre, embriyo-taşıyıcı arasındaki östrüs yaşının senkronizasyonu, transferi gerçekleştiren teknik eleman ve mevsim gibi faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Prostaglandinler, yüksek seviyede bulduklarında prematür luteolizis ve embriyo için toksik etkili olabilmekle birlikte¹¹, endometrium vaskularizasyonu, embriyo gelişimi sırasında hatching aşamasında ve embriyonun implantasyonunda önemli role sahip olduğundan^{31,32} ortamdaki tamamen uzaklaştırılmaması da önemlidir²⁴.

Her ne kadar sunulan çalışmada incelenmemişse de, uterusun manipülasyonunun travma oluşturarak inflamasyon sürecini başlattığı ve böylelikle kısırakta³³, domuzda³⁴ ve sığırdaki³⁵ PGF_{2α} salınımına neden olduğu

daha önce yapılan çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir. Wann ve Randel³⁶ ise yaptıkları çalışmada uterus manipülasyonunun birden fazla doğum yapmış ineklerde PGF_{2α} salınımına neden olmakla birlikte bir kez doğum yapmış ineklerde herhangi bir artışa sebep olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca morula aşamasındaki sığır embriyosunun PGF_{2α}'ya maruz bırakıldığı *in vitro* ortamda yapılan bir çalışmada embriyonun gelişiminin

baskılandığı¹³, tohumlamadan 5-8 gün sonra eksojen PGF_{2α} uygulanan *in vivo* bir çalışmada ise gebelik oranının düştüğü bildirilmektedir¹². Embriyo transferi sırasındaki manipülasyonun da PGF_{2α} salınımına neden olarak embriyonun gelişimini olumsuz etkileyebileceği ve gebelik oranını düşürebileceği kimi araştırmacılar tarafından belirtilmektedir^{8,35,37}. Ayrıca yapılan bir çalışmada, tohumlamadan sonra 7. gündeki düşük progesteron seviyesinin embriyonik ölüm oranını artırdığı³⁸, başka bir çalışmada ise embriyonik ölüm şekillenen ineklerdeki CL çapı ve progesteron seviyesinin gebe olan ineklerdekiden daha düşük olduğu tespit edilmiştir³⁹. FM'in ise siklo-oksijenaz enzim sistemini inhibe ederek endometriyumdaki PGF_{2α} salınımını baskıladığı belirlenmiştir^{8,14,16}.

Sunulan çalışmada, embriyo transferinden 5 dak önce IM yolla 500 mg FM uygulamasının gebelik oranını artırmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, embriyo transferinden hemen önce FM enjeksiyonunun düvelerde gebelik oranına etkisi olmadığını tespit eden McNaughtan'ın²⁴ çalışması ile paralel olmakla birlikte, bu uygulamanın gebelik oranını %12 artırdığını (FM %63.8 ve kontrol %51.1) tespit eden Schrick ve ark.³⁷ ve çalışmalarında düvelere embriyo transferinden 1 saat önce bir başka NSAID olan ibuprofen lysinate uygulayan ve gebelik oranının arttığını bildiren Elli ve ark.¹⁵ ile farklılık arz etmektedir.

Çalışmada uygulanan FM'in gebelik oranında değişikliğe neden olamaması, transfer edilen embriyonun iyi kalitede olması ve bundan dolayı uterus endometriyu-

mundan salınan PGF_{2α}'nın negatif etkisini tolere edebilmesi ve böylelikle bahsedilen negatif etkinin ortaya çıkamamasından kaynaklanmış olabilir. Bu konu ile ilgili olarak Schrick ve ark.³⁷ FM'nin etkisinin embriyonun kalitesine bağlı olduğunu, FM enjeksiyonunun embriyo kalitesi iyi olmadığında gebelik oranını artırmakla birlikte, embriyo kalitesi iyi olduğunda bu uygulamanın gebelik oranına etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Scenna ve ark.³⁵ ise çalışmalarında, 1. kalite embriyoların PGF_{2α}'nın negatif etkilerine 2. kalite embriyolardan daha dayanıklı olduğunu, embriyo transferinden hemen önce ya da hemen sonra uyguladıkları FM'in 1. kalite embriyolarda gebelik oranında artışa neden olmamakla birlikte 2. kalite embriyolarda gebelik oranını %53.5'ten %64.5'e yükselttiğini (P<0.01) bildirmişlerdir. Ayrıca embriyo transferi sonrasında elde edilecek gebelik oranı transferi yapan teknik elemanın deneyimine²² ve transfer sırasında yapılan manipülasyon sonucu oluşan travmanın derecesine²⁸ bağlı olarak değişebilmektedir. Sunulan çalışmada FM uygulamasının gebelik oranı üzerine etki etmemesi, transfer edilen embriyonun kalitesinin iyi olmasının yanında, transfer sırasında yapılan manipülasyon sonucu salınan PGF_{2α}'nın negatif etki gösterecek seviyeye ulaşmamış olabileceğini de düşündürmektedir. Nitekim, PGF_{2α}'nın gebelik üzerine negatif etkisinin embriyo transferi sırasında manipülasyon için geçen süre ve transferin zorluğu ile ilgili olduğu, manipülasyon sırasında çok fazla travmaya neden olunmadığında FM enjeksiyonunun etkisinin sınırlı olabileceği bildirilmektedir^{3,24}.

Bunlara ilave olarak çalışmada elde edilen sonuçlar ile diğer bazı araştırmacıların bildirdikleri gebelik sonuçları arasındaki fark, çalışmaların farklı bölgelerde yapılmasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim Purcell ve ark.³, embriyo transferinden 2-12 dak. önce taşıyıcılara FM uyguladıkları çalışmalarında, FM'in gebelik oranı üzerine etkisinin çalışmanın yapıldığı bölgeye göre değiştiğini, FM ve kontrol gruplarında sırasıyla; Bölge 1'de %89 ve %57 (P<0.01), Bölge 2'de %69 ve %64 ve Bölge 3'te ise %64 ve %67 gebelik oranı tespit ettiklerini bildirmektedirler.

Sonuç olarak sunulan çalışmada, dondurulmuş-çözdürülmüş embriyo transferinden 5 dak. önce IM yolla 500 mg flunixin meglumine uygulamasının gebelik oranlarına etkisinin olmadığı, bununla birlikte bu konuda daha kapsamlı araştırmaların yapılmasının gerektiği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Seidel GE, Seidel SM: Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal Production and Health, pp. 77, Rome, 1991.
2. Betteridge KJ: Farm animal embryo technologies:

Achievements and perspectives. *Theriogenology*, 65 (5): 905-913, 2006.

3. Purcell SH, Beal WE, Gray KR: Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. *Theriogenology*, 64, 867-878, 2005.

4. Gali C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G: Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59, 599-616, 2003.

5. Gordon IR: Reproductive technologies in farm animals. CAB International, Cambridge, 2005.

6. Velez JS, Randel RD, Neuendorff DA: Effect of uterine manipulation on postpartum fertility and plasma 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F₂ in Brahman cows and first-calf heifers. *Theriogenology*, 36, 987-97, 1991.

7. Schrick FN, Hockett ME, Towns TM, Edwards JL, Wehrman ME, Wert NE: Prostaglandin F₂ alpha appears to directly influence early embryonic survival in cattle: Would administration of Flunixin Meglumine be beneficial during embryo transfer? *Proceedings, American Embryo Transfer Association*, 9, 2000.

8. Weems CW, Weems YS, Randel RD: Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J*, 171, 206-228, 2006.

9. İzgür H: Reprodüktif Hormonların Klinik Kullanımları. In, Alaçam E (Ed): *Theriogenoloji*. s. 39-42, Nuru Matbaacılık, Konya, 1990.

10. Alaçam E: Üremenin Denetlenmesi. In, Alaçam E (Ed): *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'i Tohumlama Doğum ve İnfertilite*. 1st ed. 81-87, Dizgievi, Konya, 1994.

11. Seals RC, Lemaster JW, Hopkins FM, Schrick FN: Effects of elevated concentrations of prostaglandin F_{2α} on pregnancy rates in progesterone supplemented cattle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 56, 377-389, 1998.

12. Hockett ME, Rohrbach NR, Schrick FN: Alterations in embryo development in progesterone-supplemented cows administered prostaglandin F_{2α}. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 73, 227-236, 2004.

13. Scenna FN, Edwards JL, Rohrbach NR, Hockett ME, Saxton AM, Schrick FN: Detrimental effects of prostaglandin F_{2α} on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 73, 215-226, 2004.

14. Anderson KL, Neff-Davis CA, Davis LE, Bass VD: Pharmacokinetics of flunixin meglumine in lactating cattle after single and multiple intramuscular and intravenous administration. *Am J Vet Res*, 51, 1464-1467, 1990.

15. Elli M, Gaffuri B, Frigerio A, Zanderdelli M, Covini D, Candiani M, Vignali M: Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction*, 121, 151-154, 2001.

16. Lees P, Landoni FM, Giraudel J, Toutain PL: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J Vet Pharmacol Therap*, 27, 479-490, 2004.

17. Herman HA, Mitchell JR, Doak GA: The artificial insemination and embryo transfer of dairy cattle. Interstate Publishers, Illinois, 1994.

18. Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Stokes JE: Survival of ivf-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology*, 48, 563-579, 1997.

19. Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S: Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 49, 1051-1058, 1998.
20. Chebel RC, Deme'trio DGB, Metzger J: Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*, 69, 98-106, 2008.
21. Silva JC, da Costa LL, Silva JR: Plasma progesterone profiles and factors effecting embryo-fetal mortality after embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58, 51-59, 2002.
22. Nibart M, Humblot P: Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology*, 47 (1): 371, 1997.
23. Martínez AG, Brogliatti GM, Valcarcel A, de las Heras MA: Pregnancy rates after transfer of bovine embryos: A field trial. *Theriogenology*, 58, 963-972, 2002.
24. McNaughtan JW: The effect of prostaglandin inhibitor on pregnancy rates of heifer embryo transfer recipients. *Master of Science Thesis*. Department of Plant and Animal Sciences, Brigham Young University, 2004.
25. Weaver LD, Galland J, Sosnik U, Cowen P: Factors affecting embryo transfer success in recipient heifers under field conditions. *J Dairy Sci*, 69, 2711-2717, 1986.
26. Hasler JF: Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56, 1401-1415, 2001.
27. Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC: Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 56, 287-297, 2001.
28. Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW: Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*, 65, 201-209, 2006.
29. Dursun Ş, Köse M, Kırbas M, Bülbül B, Ümütlü S: Etilen glikolle dondurulmuş sığır embriyosu transferinde çözündürme-transfer aralığının gebelik oranı üzerine etkisi. 4. *Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi*, 25-28 Ekim, Antalya, 2007.
30. Çolak M, Köse M, Dursun Ş, Kırbas M, Bülbül B, Mutlu H: Sığır embriyo transferinde embriyonun bırakıldığı derinlik ve yerin gebelik oranına etkisi. 4. *Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi*, 25-28 Ekim, Antalya, 2007.
31. Van der Wieden RM, Verdijk RM, Poelmann RE, Helmerhorst FM, Keirse MJ: The influence of indomethacin on the hatching of mouse blastocysts. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 49, 683-686, 1993.
32. Psychoyos A, Nikas G, Gravanis A: The role of prostaglandins in blastocyst implantation. *Human Reprod*, 10, 30-42, 1995.
33. Kask K, Odensvik K: Prostaglandin F2 alpha metabolite levels following an embryo transfer procedure in the mare. *Acta Vet Scand*, 36, 145-147, 1995.
34. Kunavongkrit A, Kindahl H, Andersson AM: Laparoscopy in postpartum sows with special emphasis on the effects of uterine manipulation on the release of prostaglandin F2 alpha. *Res Vet Sci*, 36, 66-70, 1984.
35. Scenna FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Rohrbach NR, Wehrman ME, Schrick FN: Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 78, 38-45, 2005.
36. Wann RA, Randel RD: Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F2 in multiparous and primiparous brahman cows. *J Anim Sci*, 68, 1389-1394, 1990.
37. Schrick FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Wert NE, Wehrman ME: Administration of a prostaglandin inhibitor immediately prior to embryo transfer improves pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 55 (Suppl.), 370, 2001.
38. Demetrio DGB, Santos RM, Demetrio CGB, Vasconcelos JLM: Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*, 90, 5073-5082, 2007.
39. Aslan S, Wesenauer G: İneklerde gebelik, embriyonik-fötal ölümler, ovaryum fonksiyonları ve uterus çapının ultrasonografi ile saptanması. *Tr J Vet Anim Sci*, 23 (Ek Sayı 3): 623-631, 1999.