Davut KOCA

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ
ANABİLİM DALI

SİYAH ALACA SÜTÇÜ DÜVELERDE VİTAMİN D3 UYGULAMALARININ KAN SERUMU ANTİ-MÜLLERİN HORMON SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DAVUT KOCA

DOKTORA TEZİ

BURSA-2022

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

SİYAH ALACA SÜTÇÜ DÜVELERDE VİTAMİN D3 UYGULAMALARININ KAN SERUMU ANTİ-MÜLLERİN HORMON SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DAVUT KOCA

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Yavuz NAK

TÜBİTAK 1001 – 118O864

BURSA-2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "**Siyah Alaca Sütçü Düvelerde Vitamin D3 Uygulamalarının Kan Serumu Anti-Müllerin Hormon Seviyesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Davut KOCA
../../….
İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Davut KOCA

Anabilim Dalı: Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Siyah Alaca Sütçü Düvelerde Vitamin D3 Uygulamalarının Kan Serumu Anti Müllerin Hormon Seviyesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Yavuz NAK

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYAN……II

KABUL ONAY……III

TEZ KONTROL BEYAN FORMU……...IV

İÇİNDEKİLER……..V

TÜRKÇE ÖZET……..VII

İNGİLİZCE ÖZET……...IX

1. GİRİŞ……...1

2. GENEL BİLGİLER……3

2.1.Düvelerde Fertilite ve Verimlilik……**3**

2.2. Pubertas……..**4**

2.3. Folikülogenezis……...……...**6**

2.3.1. Ovaryan Foliküllerin Embriyonik Gelişimi…….…**7**

2.3.1.1. Primordiyal Germ Hücrelerin Oluşumu ve Gonadlar…….…..**7**

2.3.1.2. Primordiyal Germ Hücrelerin Gonadlara Göçü…….…...**8**

2.3.1.3. Oogonyumların Primer Oositlere Dönüşümü ve Primordiyal Foliküllerin Oluşumu……..**9**

2.3.2. Primordiyal Foliküllerin Gelişim Aşamaları ve Antral Foliküllerin Oluşumu……**10**

2.3.3. Primordiyal Foliküllerin Aktivasyonu ve Primer Foliküllere Dönüşümü…..…**11**

2.3.4. Primer Foliküllerin Sekunder Foliküllere Dönüşümü Üzerinde Etkili olan Faktörler……**12**

2.3.5. Foliküllerin Sınıflandırılması……**12**

2.4. Ovaryum Rezervi……**13**

2.5. Antral Folikül Sayısı (AFS)…….…**14**

2.5.1. AFS'nin Tekrarlanabilirliği…….…..**15**

2.5.2. Progesteron Düzeyleri ve AFS……..…**15**

2.6. Anti-Müllerin Hormon (AMH)……..……..**16**

2.6.1. Senkronize ve Doğal Östrüslarda AMH Düzeylerinin Karşılaştırılması……..**18**

2.6.2. AMH'nın Tekrarlanabilirliği……**19**

2.6.3. Sığırlarda AMH Düzeyleri……**19**

2.6.4. AMH ve Pubertas……..**20**

2.6.5. Fetal Cinsiyetin Maternal AMH Üzerine Etkisi……...**21**

2.6.6. Sığırlarda Gebelikte Isı Stresine Maruz Kalmanın Buzağıların AMH Konsantrasyonları Üzerine Etkisi……...**22**

2.6.7. Düvelerde Sürü Verim Ömrü ve AMH Konsantrasyonu Arasındaki İlişki…..**24**

2.6.8. İneklerin Doğum Sayıları (Parite) ile Buzağıların Fertilitesi ve AMH Konsantrasyonu Arasındaki İlişki……..…**24**

2.6.9. İneklerde AMH ve Fertilite Arasındaki İlişki……..…**25**

2.6.10. Sığırlarda Süperovulasyon Yanıtı ve Embriyo Sayısı ile AMH Konsantrasyonu Arasındaki İlişki……**26**

2.6.11. Sığırlarda AMH'ın Kalıtım Derecesi…….….**30**

2.6.12. Yaş, Ovaryan Yaşlanma ve AMH……**31**

2.6.13. Irk ve AMH……**31**

2.6.14. Granüloza Hücreleri ve AMH……**32**

2.6.15. Hastalıklar ve AMH……...**33**

2.6.16. Beslenme ve AMH……..**33**

2.7. D Vitamini……....**34**

2.7.1. Vitamin D Düzeylerinin Belirlenmesi……...**36**

2.7.2. Sığırlarda Vitamin D Yetersizliği……..**37**

2.7.3. Vitamin D'nin Toksisitesi……**37**

2.7.4. Vitamin D Takviyeleri ve Düzeyleri……...…...**38**

2.7.5. Vitamin D3'ün Foliküler Gelişmeye Etkisi……..…**38**

2.7.6. İnsanlarda Vitamin D ile AMH arasındaki ilişki……...……..**40**

3. GEREÇ VE YÖNTEM……44

3.1. Hayvan Materyali, Barındırma ve Besleme Koşulları……**44**

3.2. Grupların Oluşturulması ve Yapılan Uygulamalar……..**44**

3.3. Kan Örneklerinin Toplanması……..**44**

3.4. Hormon Analizleri……....**45**

3.4.1. AMH Analizi……**45**
3.4.2. 25(OH)D Analizi…….....**45**
3.4.3. İstatistiki Değerlendirme……...**46**
4. BULGULAR…….....48
4.1. Yaş ile AMH Düzeyleri Arasındaki İlişki……....**48**
4.2. Canlı Ağırlık ile AMH Düzeyleri Arasındaki İlişki…….....**48**
4.3. Oral Vitamin D3 Uygulamasının Serum 25(OH)D Düzeylerine Etkisi……**49**
4.4. Kas İçi Vitamin D3 Uygulamasının Serum 25(OH)D Düzeylerine Etkisi……**50**
4.5. Oral Vitamin D3 Uygulamasının Serum AMH Düzeylerine Etkisi……..**54**
4.6. Kas İçi Vitamin D3 Uygulamasının Serum AMH Düzeylerine Etkisi……..**56**
5. TARTIŞMA ve SONUÇ…….....60
6. KAYNAKLAR……...71
7. SİMGELER VE KISALTMALAR……..92
8. EKLER…….....94
9. TEŞEKKÜR…….101
10. ÖZGEÇMİŞ……...…102

TÜRKÇE ÖZET

AMH düzeyini etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Vitamin D, AMH düzeyini etkileyen faktörlerden sadece biridir. Başta insanlar olmak üzere yapılan çok sayıda in vivo ve in vitro çalışmada, Vitamin D'nin AMH düzeyini doğrudan veya dolaylı olarak etkilediği bildirilmektedir. Ancak düvelerde Vitamin D'nin serum AMH düzeyleri üzerine etkilerinin incelendiği bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada tohumlanmamış 11-13 aylık sütçü düvelerde oral ve kas içi Vitamin D3 uygulamalarının AMH ve 25(OH)D düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan hayvan materyali, oral (Grup1, n=20), kas içi (Grup2, n=20) ve kontrol grubu (Grup3, n=20) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Oral gruba ve kas içi gruba tek seferde 5 milyon IU Vitamin D3 uygulaması yapılmış, kontrol grubuna ise Vitamin D3 uygulaması yapılmamıştır. Kan örnekleri uygulama öncesi (0. gün) ve uygulamayı izleyen 7, 14 ve 28. günlerde toplanmıştır. AMH konsantrasyonları kan serumunda elektrokemilüminesans yöntemiyle, 25(OH)D konsantrasyonları ise kemilüminesan immunolojik test yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda oral ve kas içi vitamin D3 uygulamasının 25(OH)D konsantrasyonunu 7, 14 ve 28. günlerde uygulama öncesine göre önemli düzeyde artırdığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Oral Vitamin D3 uygulaması sonrası 25(OH)D düzeyinin 7. günde pik seviyeye ulaştığı, 14 ve 28. günlerde ise azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Kas içi uygulamada ise 25(OH)D düzeyinin, uygulama öncesine göre sürekli artış gösterdiği ve 28. günde pik düzeye ulaştığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Oral ve kontrol grubunda uygulama öncesine göre 7, 14 ve 28. günlerdeki AMH düzeyi değişimlerinin istatistiki açıdan önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). Kas içi grupta ise AMH düzeyinin 7. ve 28. günlerde uygulama öncesine göre istatistiki açıdan daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubunda 0. güne kıyasla AMH düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgulara dayanarak, Vitamin D3'ün veriliş yolunun 25(OH)D düzeyini etkilediği, oral grupta 7. günde pik düzeye ulaşırken, kas içi grupta sürekli bir artış sağladığı belirlenmiştir. Vitamin D3 uygulanan gruplarda AMH konsantrasyonunda artışlar gözlenmiş ve kontrol grubunda gözlenen AMH konsantrasyonlardaki dalgalanmalardan farklı olarak düzenli bir seyir izlediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Düve, AMH, Vitamin D, 25(OH)D

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of Effects of Vitamin D3 Applications on Blood Serum Anti-Müllerian Hormone Level in Holstein Heifers

There are various factors affecting the level of AMH and vitamin D is just one of them. Through many studies carried out both as vivo and in vitro, particularly in humans, Vitamin D has been reported to affect the level of AMH either directly or indirectly. However, there hasn't been a single study examining the effects of Vitamin D on serum AMH levels in heifers yet. In this study, the effects of both oral and intramuscular Vitamin D3 administrations on AMH and 25(OH)D levels in 11-13 months-old dairy heifers were investigated. The animal material used in the study was divided into 3 groups as oral (Group1, n=20), intramuscular (Group2, n=20) and control group (Group3, n=20). 5 million IU Vitamin D3 was administered to the oral and intramuscular group at once while Vitamin D3 was not administered to the control group. Blood samples were collected both before administration (day 0) and on days 7, 14 and 28 following administration. The AMH concentrations were determined in blood serum by electrochemiluminescence method while 25(OH)D concentrations were determined via chemiluminescent immunological test method. As a result of the study, it was determined that the oral and intramuscular vitamin D3 administration significantly increased the 25(OH)D concentration on the 7th, 14th and 28th days compared to the pre-application ($p<0.05$). After the oral Vitamin D3 administration, especially the 25(OH)D level was found to have reached the peak on the 7th day, whereas decreased on the 14th and 28th days ($p<0.05$). On the other hand, in intramuscular administration, the 25(OH)D level was found to have increased continuously compared to the pre-application phase and have also reached the peak on the 28th day ($p<0.05$). It was determined that the changes in AMH levels on the 7th, 14th and 28th days in both oral and control groups compared to the pre-administration were statistically insignificant ($p>0.05$). In the intramuscular group, the AMH level was found to be statistically higher on the 7th and 28th days than it was before the application ($p<0.05$), whereas a decrease in AMH levels was observed in the control group compared to day 0.

Based on the findings, the route of administration of Vitamin D3 was determined to affect the 25(OH)D level, reaching the peak level on the 7th day in the oral group, while increasing continuously in the intramuscular group. Increases in AMH concentration were observed in the groups administered Vitamin D3 and it was determined that it followed a regular course unlike the fluctuations in AMH concentrations observed in the control group.

Key words: Heifer, AMH, Vitamin D, 25(OH)D

1.GİRİŞ

Sütçü işletmelerde üreme ile ilgili faaliyetlerin düzeyi, o işletmede hayvansal üretimin başarısını yani kısaca verimliliği belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle süt sığırı yetiştiriciliğinde süt ve buzağı üretimi açısından istenilen hedeflere ulaşabilmesi için fertilitenin yüksek olması istenmektedir (Şenünver, & Nak, 2019). Fertiliteyi etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Ovaryum rezervinin büyüklüğü, sığırlarda fertiliteyi etkileyen önemli bir faktördür. Düşük ovaryum rezervine sahip sığırlarda oosit kalitesinin düşük olduğu, embriyonik gelişimin yavaşladığı, progesteron konsantrasyonunun düştüğü, endometriyal gelişimin bozulduğu ve erken ovaryan yaşlanmanın meydana geldiği bildirilmektedir (Bagley, 1993; Buskirk, Faulkner, & Ireland, 1995; Lesmeister, Burfening, & Blackwell, 1973). Bunun sonucunda sığırlarda gebelik oranlarının düştüğü, gebelik başına düşen tohumlama sayısının arttığı, servis periyodunun uzadığı ve sürü verim ömrünün kısaldığı bildirilmektedir (Jimenez-Krassel ve ark.,2015). Anti-Müllerin Hormon (AMH), ovaryum rezervinin önemli bir indikatörü olarak kabul edilmektedir. Dolaşımdaki AMH konsantrasyonu östrüs siklusu boyunca minimum düzeyde değişim göstermektedir. Bu nedenle, östrüs siklusunun herhangi bir dönemindeki tek bir ölçümle AMH konsantrasyonu tespit edilebilmektedir. Sığırlarda dolaşımdaki AMH konsantrasyonu, ovaryum rezervi ile ilişkili önemli ve güvenilir bir endokrin markır olarak kabul edilmektedir (Hirayama ve ark., 2017).

AMH, sağlıklı olarak gelişen foliküllerin granüloza hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. AMH ekspresyonu preantral ve küçük antral foliküllerde pik düzeye ulaşmakta ve dominant foliküllerde azalmaktadır. Atreziye olmuş foliküller ise AMH ekspresyonu yapmamaktadır. AMH foliküler dalga boyunca folikül sayısını ve dominant foliküllerin seçilimini kontrol ederek folikül rezervinin erken tüketimini engellemektedir. Ayrıca, foliküllerin FSH'ya duyarlılığını azaltarak foliküler gelişimi düzenlemektedir (Visser, & Themmen, 2005)

Vitamin D'nin hücresel düzeyde; proliferasyon, farklılaşma, apoptozis ve yangı olaylarının düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmektedir. Bu nedenle, dişi reprodüksiyonda Vitamin D'nin önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (Verstuyf, Carmeliet, Bouillon, & Mathieu, 2010) . Vitamin D'nin kadınlarda gebelik oranını, foliküler gelişimi ve menstrual düzeni olumlu etkilediği bildirilmiştir. Bu nedenle foliküler gelişimin düzenlenmesinde Vitamin D önemli bir faktör olarak görülmektedir. Farklı türlerde yapılan çok sayıda in vivo ve in vitro çalışmada, Vitamin D uygulamasının foliküler gelişimin uyarılmasında ve düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Ozkan ve ark., 2010; Paffoni ve ark., 2014). Vitamin D aynı zamanda ovaryum rezervinin bir indikatörü olan AMH'ın ekspresyonunu da etkilemektedir. Vitamin D'nin AMH geni promotor bölgesinde yer alan Vitamin D yanıt elementi bölgesine bağlanarak doğrudan veya foliküler gelişimi uyararak dolaylı yoldan AMH ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Cihan ve ark., 2011; Malloy ve ark., 2009; Merhi ve ark., 2014).

Bu çalışma; siyah alaca sütçü düvelerde oral ve kas içi vitamin D3 uygulamasının kan serumu 25(OH)D ve AMH düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Düvelerde Fertilite ve Verimlilik

Çiftlik hayvanlarından elde edilen ürünlerin önemli bir bölümü sığırlardan sağlanmaktadır. İnsan beslenmesi açısından çok önem taşıyan iki besin maddesi süt ve etin toplam üretimi içerisinde sığır kökenli et ve süt üretimi büyük paya sahiptir. Bu nedenle ülkemizde ve dünyada inek yetiştiriciliği hayvancılığın en önemli kollarından biri olarak kabul edilmektedir (Şenünver, & Nak, 2019).

Reprodüksiyon, hayvansal üretim sürecinin ekonomik ve düzenli bir şekilde yürütülmesinde rol oynayan önemli faktörlerden biridir. Reprodüktif potansiyelin en üst düzeye ulaştırılabilmesi için iyi bir sürü yönetimi kadar, genetik, besleme, fizyoloji, theriogeneloji gibi hayvancılık ve veterinerlik bilimleri ile ilgili çeşitli disiplinlerin temel prensiplerinin çoğunu iyi anlamak ve uygulamak gerekmektedir (Noakes, 2001) .

Etçi ve sütçü sürülerde reprodüktif etkinliği artırmada, yeni düvelerin zamanında sürü içerisine katılması büyük önem taşımaktadır (Stevenson, 1997). Bunun için hem etçi hem de sütçü işletmelerin süt ve buzağı üretimi açısından beklentilerini karşılamak için bu iki parametre ile ilgili kapasitelerini tüm yaşamları boyunca sürüye yansıtabilecek düveler üretmeleri gerekmektedir. Süt ve buzağı üretimi ile ilgili hedeflere ulaşabilmek için düvelerin iyi bir fertiliteye ve uzun verimli yaşam ömrüne sahip olmaları büyük önem taşımaktadır. Düvelerin ilk laktasyonda iyi bir süt verimine ulaşabilmeleri ve güç doğum ile karşılaşmadan buzağılayabilmeleri için minimum buzağılama yaşlarının 24 ay olması gerekmektedir. Düvelerin yirmi dört aylık yaşta buzağılayabilmeleri için 15. aya kadar gebe bırakılmaları hedeflenmektedir (Le Cozler, Lollivier, Lacasse, & Disenhaus, 2008).

İlk buzağılama yaşının 24 ay olması, daha uzun verimli yaşam ömrü, daha yüksek ilk laktasyon süt verimi, doğum kolaylığı ve damızlık yetiştirme maliyetlerinin azalması gibi birçok konuda çok önemli katkılar sağlamaktadır. Bununla birlikte düvelerin doğum sonrası genetik olarak belirlenmiş olan potansiyel süt verimine

ulaşabilmesi için iyi bir sürü yönetiminin de olması gerekmektedir. İlk buzağılama yaşı, gelişim oranı ve ilk buzağılama vücut ağırlığı birbiriyle ilişkili olup bu faktörlerin elde edilecek verim performansı üzerindeki etkilerini birbirinden ayırmak güçtür. Bir düvenin doğumda istenen vücut ağırlığına sahip olması için gelişimini tamamlamış olması gerekmektedir. Bu nedenle düvelerin yaş ve vücut ağırlıkları dikkate alınarak tohumlanmaları büyük önem taşımaktadır. Her şeye rağmen istenilen zamanda gebelik elde edilmezse daha geç yaşta ilk buzağılamanın gerçekleşmesi kaçınılmaz hale gelmektedir (Le Cozler ve ark., 2008).

Son yıllarda elde edilen genetik ilerleme, daha yüksek süt verim kapasitesine sahip sütçü ineklerin (Tsuruta, Misztal, & Lawlor, 2005) ve daha verimli etçi hayvanların yetiştirilmelerine olanak sağlamaktadır (Randel & Jr, 2015). Ancak, verim açısından elde edilen bu gelişmeler fertilitenin azalmasına sebep olmaktadır. Fertilite oranlarında şekillenen bu düşüş ise uzun ömürlülüğü azaltarak sürüden çıkarmanın ana nedeni olmaktadır. Uzun sürü ömrü işletmelerin günlük ve toplam kar oranınını olumlu yönde etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu için her zaman arzu edilen bir özellik olarak kabul görmektedir. İlk buzağılama yaşı ve büyüme hızlarının olumlu ve olumsuz etkilerini ekonomik gelir açısından optimize etmek için tahmini sürü ömrü, doğum sayısı ve verim miktarını göz önünde bulundurmak gerekmektedir (Ducrocq, Quaas, Pollak, & Casella, 1988; Jagannatha, Keown, & Van Vleck, 1998).

2.2. Pubertas

Etçi ve sütçü işletmelerde verim açısından amaçlanan hedeflere ulaşabilmek için, düvelerin gelişimlerinin normal süreçler içinde sağlanması, zamanında pubertasa ulaşılması ve takibende en uygun süreçte ilk gebeliklerin oluşturulması gerekmektedir (Stevenson, 1997).

Pubertas, genel olarak düvelerde fertil bir ovulasyon ve takibende normal yaşam süreli bir korpus luteumun şekillenme potansiyeline sahip ilk östrüsun başlangıcı olarak ifade edilmektedir (Stevenson, 1997). Reprodüktif kanal ve ovaryumlar doğumdan sonra aşamalı olarak gelişirken, pubertas öncesi dönemde bu yapılarda önemli endokrin değişiklikler gözlemlenmektedir (Gasser,2012). Pubertasa ulaşmamış düvelerde hipotalamustaki Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) pulzasyon sisteminin östrojenlerin negatif fidbek etkisine çok duyarlı olduğu

belirtilmektedir. Östrojenin negatif fidbeki sonucu sekrotorik Lüteinleştirici Hormon (LH) pulzasyonları baskılanmaktadır. Muhtemelen aynı ölçüde GnRH pulzasyonları da inhibe edilmektedir (Stevenson, 1997). Pubertas öncesi dönemde östrojenin negatif fidbek etkisi azalmakta ve hipotalamusun östrojenlerin negatif fidbekine duyarlılığı düşmekte ve böylece GnRH sekresyonunda artış şekillenmektedir. Bu etkiyle beraber pubertas öncesi son 50 günde LH düzeyinde de artış oluşmaktadır. Böylece dominant folikül artan LH pulzasyonlarının etkisiyle büyüyerek östradiol salgısını artırmaktadır. Bu artış ise folikülün ovule olması için gerekli LH pikini uyarmaktadır (Gasser, 2012; Rawlings, Evans, Honaramooz,ve & Bartlewski, 2003).

Pubertas anındaki hayvanın büyüklüğü genetik olarak belirlendiğinden dolayı, düvenin ırk özellikleri pubertas yaşı üzerinde etkilidir. Çeşitli inek ırkları arasında pubertas yaş ve ağırlığı açısından farklar bulunmaktadır. Avrupa süt ve et ırkları (Bos taurus) zebu orjinli (Bos indicus) ırklara nazaran pubertasa daha erken ulaşmaktadır. Düvenin babası ve annesi de pubertasa ulaşma yaşını etkilemektedir. Melez ırkların düveleri pubertasa erken ulaşmaktadır. Seleksiyon pubertasa ulaşma yaşını etkilemektedir. Süt açısından seleksiyon yapılarak elde edilen ırkların düveleri ergin canlı ağırlık ve büyüme potansiyeli açısından aynı özelliklere sahip olan fakat süt verimi açısından seleksiyon uygulanmamış ırkların düvelerine göre daha erken pubertasa ulaşmaktadır. Akrabalık veya başka bir deyişle inbreeding canlı ağırlık kazancının azalmasına yol açarak pubertasa ulaşmayı geciktirmektedir. Pubertasa ulaşmada kalıtımın etkisi süt verimi üzerinde kalıtımın etkisinden 2 ila 3 kat daha fazladır. Skrotal çapları daha fazla olan boğaların kızları pubertasa daha erken ulaşmaktadır. Altı aylık yaşında canlı ağırlığı daha fazla olan dişiler pubertasa daha genç yaşta ulaşmakta ve aynı zamanda buzağılama sırasında daha fazla canlı ağırlığa sahip olmaktadırlar. Bununla birlikte daha genç yaşta pubertasa ulaşan ve daha ağır olan etçi düveler, yaşıt fakat canlı ağırlığı daha az olan etçi düvelere göre doğum sonrası daha uzun bir doğum-östrüs aralığına sahip olmaktadır (Stevenson, 1997).

Tüm evcil hayvanlarda pubertas yaşının açık bir şekilde canlı ağırlık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle pubertasa ulaşma yaşı üzerinde en etkili faktörlerden biri beslenmedir. Hayvanlar hızlı büyüyecek şekilde iyi beslendikleri zaman pubertasa erken yaşlarda ulaşırlar (Noakes, 2001).

Her ne kadar yaş ve canlı ağırlık bir şekilde seksüel olgunlaşmanın başlangıcı ile ilişkili ise de, canlı ağırlık pubertasa ulaşma yaşını etkileyen en önemli faktördür. Genellikle düveler olgun canlı ağırlıklarının % 40-50'sini elde ettikleri zaman pubertasa da ulaşırlar. Altı aylık dişi hayvanların erkek hayvanlar ile bir arada bulundurulduklarında gebe kalabildikleri görülmektedir. Her ne kadar düveler genellikle 1 yaşında pubertasa ulaşırlarsa da, bu sürenin 4 ay ile 2 yaş arasında değiştiği görülmektedir. Normalin altında bir beslenme planı uygulaması devam ettirildiği takdirde pubertasa ulaşması gecikmektedir. Düvelerde büyüme oranı veya başka bir deyişle canlı ağırlık kazancı artırıldığı zaman daha erken yaşta pubertasa ulaştıkları görülmektedir (Stevenson, 1997).

Yetersiz beslenme ve aşırı beslenme düvelerin gelişimleri üzerinde önemli etkilere neden olur. Büyümekte olan düvelere uygulanan yetersiz besleme pubertasın gecikmesi, gebe kalma oranında düşme, meme bezlerinin yetersiz gelişmesi ve buzağılama ile ilgili problemlerde artış gibi önemli aksaklıklara yol açmaktadır. Aşırı beslenme ise östrüs belirtilerinin zayıf olması, gebe kalma oranında düşme, yüksek embriyonik ölüm oranı, meme bezlerinin gelişiminde yavaşlama ve süt üretiminin azalması gibi önemli problemlerin şekillenmesine neden olabilmektedir. Düvelerin 3. aydan 24. aya kadar günde 700 gr canlı ağırlık kazanması sağlandığında, daha genç yaşta pubertasa ulaştıkları, daha erken yaşta buzağıladıkları, buzağılamadan sonra aşırı yağlı bir vücut yapısına sahip olmadıkları görülmektedir (Stevenson, 1997).

2.3. Folikülogenezis

Folikülogenezis, oositin ve çevresindeki granüloza hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını takiben bir primordiyal folikülün preovülatör boyuta kadar geliştiği süreçtir (Jaiswal, 2007). Hem somatik hücrelerin hem de germ hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması dahil, uzun ve karmaşık bir şekilde düzenlenmiş mekanizmaları ve olayları içermektedir. Foliküler gelişmeyi kontrol eden mekanizmaları iyi anlamak infertilitenin tanı ve tedavisi açısından büyük önem taşımaktadır (Webb, Buratini, Gutierrez, & Campbell, 2016).

Suni tohumlama, genetik olarak üstün özellikler taşıyan erkeklerden elde edilen spermanın yaygın bir şekilde kullanılmasına olanak sağlamıştır. Benzer şekilde östrüs senkronizasyonu, süperovulasyon gibi teknikler ve embriyo transferi gibi üreme ile

ilgili diğer teknolojiler, üstün genetik özelliklere sahip dişilerden elde edilebilecek yavru sayısını artırmayı mümkün kılmıştır. Folikül çapının ≥4 mm olduğu foliküler büyüme aşaması ile ilgili sürecin iyi bir şekilde anlaşılması ile birlikte ovaryum fonksiyonlarının çeşitli klinik ve biyoteknolojik amaçlar için manipülasyonunda önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bununla birlikte çapı <4 mm' den küçük follikülerin gelişim sürecinin uzun bir süre iyi anlaşılamaması östrüs senkronizasyon oranında belirsizlikler ve süperovulasyon tedavisine yanıtta değişkenlikler gibi birçok konuda yetersizliklere yol açarak reprodüktif teknolojilerin yaygın olarak kullanılmasını sınırlayan faktörler olmuştur (Adams, 1994).

Sığırlarda bir folikülün aktive olup ovulatör folikül büyüklüğüne ulaşmasına kadar geçen süreç yaklaşık olarak 80-100 gün sürmektedir (Britt, 1992). Son zamanlarda sığırlarda Folikül Stimülan Hormon (FSH) salınımı ile eş zamanlı olarak ortaya çıkan, çapları ≥1 mm olan foliküllerin, foliküler dalgalara benzer şekilde büyüme süreci geçirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca iki ovulasyon arasında 2 veya 3 foliküler dalga içeren bir gelişim sürecinin varlığı da net bir şekilde ortaya konmuştur. Çapı <1 mm olan antral foliküllerin gelişim süreci ve bu sürecin tekrarlanabilen dalgalar (iki veya üç dalga) şeklinde oluştuğu konusunda ise yeterli bilgi bulunmamaktadır (Jaiswal, 2007). Değişik klinik ve biyoteknolojik amaçlara yönelik olarak ovaryan faaliyetleri manipüle etmeye yönelik çeşitli uygulamalar yapabilmek için mevcut güncel bilgileri göz önüne alarak büyük (≥4mm) ve küçük (<4 mm) foliküllerin gelişimsel sürecini ovaryan foliküllerin embriyonik gelişim döneminden itibaren iyi anlamak gerekmektedir (Jaiswal, 2004).

2.3.1. Ovaryan Foliküllerin Embriyonik Gelişimi

2.3.1.1. Primordiyal Germ Hücrelerin Oluşumu ve Gonadlar

Oositler; embriyonun beslenmesinden sorumlu olan, embriyonun gelişimi için gerekli biyomoleküllerin üretiminde rol oynayan, allantoisin tabanına yakın olarak yer alan tek katlı bir zar olan embriyonik yolk kesesinin endoderminden köken alan primordiyal germ hücreleridir (Aerts & Bols, 2010; Byskov , & Hoyer, 1994; Senger, 1997). Gonadlar kökenlerini henüz gelişmemiş olan ilkel böbrek ve mezenefrozların ventro-medialinden alırlar. Gonadal çıkıntılar böbreklerin mediyal yüzündeki germinal (kelomik) epitelin kalınlaşmasıyla gelişen erkeklerde testisleri, dişilerde ovaryumları oluşturacak olan henüz daha farklılaşmamış yapılardır. Farklılaşma

aşamasını geçirmemiş olan gonadlar, kelomik epitel ile kaplı gevşek bir mezenşimal dokudan oluşur ve gelişmekte olan mezonefrik doku tarafından desteklenir. Mezonefrik dokuyu ve gonadları uygun şekilde bağlayan hücre hattı rete ovari olarak isimlendirilir. Mezonefrik böbrek, torako-lumbar bölgede oluşur ve ürogenital sistemin gelişimi sırasında şekillenen üç ardışık nefrik yapının (pro-, mezo- ve metanefros) ikincisidir (Byskov, & Hoyer, 1994; Dyce, 1996). Kelomik epitelden köken alan hücreler kübik veya küresel çekirdeklere sahiptir. Bunlar epitelyal veya somatik hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Mezonefrik böbreğin mediyal yüzündeki hücreler uzamış çekirdeklere ve fibroblast görünümüne sahiptir. Bu hücreler ise mezenşimal hücreler olarak sınıflandırılmaktadır (Hirshfield, & DeSanti, 1995). Gonadal çıkıntılar sığır embriyolarında gebeliğin 28-32. gününe kadar şekillenmektedir (Aerts & Bols, 2010; Erickson, 1966b).

2.3.1.2. Primordiyal Germ Hücrelerin Gonadlara Göçü

Primordiyal germ hücreleri, kör bağırsağın bağ dokusu aracılığıyla yolk kesesinin epitelinden ameboid hareketle göç ederler (Senger, 1997; Smitz, & Cortvrindt, 2002) ve gebeliğin 30 ila 64. günleri arasında gonadal çıkıntılara ulaşırlar (Aerts, & Bols, 2010; Erickson, 1966b). Primordiyal germ hücreleri gonadal çıkıntılara ulaştıklarında oogonyum olarak isimlendirilirler. Daha sonra hızlı bir şekilde mitozla bölünmeye başlarlar (Smitz, & Cortvrindt, 2002). Sığır fetüslerinde ovaryumlar gebeliğin 40. gününe kadar belirlenebilmektedir (Erickson, 1966b). Germ hücre kordonları ovaryumlarda birkaç germ hücre kümesinin bir araya gelmesiyle oluşur. Bu hücre kümelerini oluşturan germ hücreleri ruminantlarda farklı mitotik evrelerde bulunur (Russe, 1983). Germ hücre kordonları bir bazal lamina tarafından sınırlanan oogonyum ve epitelyal hücre topluluklarından oluşan yapılardır (Dyce, 1996; Hirshfield, & DeSanti, 1995; Russe, 1983). Bu yüzden erken dönemde ovaryumlarda üç farklı hücre tanımlanmaktadır. İlk hücreler epitelyal hücreleri içeren germ hücre kordonunda bulunan somatik hücrelerdir. Bu hücreler granüloza hücrelerinin prekürsörüdür. İkinci ise gelecekte oositleri oluşturacak germ hücreleridir. Son olarak teka interna ve eksterna hücrelerini oluşturacak olan mezenşimal, stromal ve intersitisyel hücrelerdir. Sığırlarda her bir ovaryumda gebeliğin 60. gününde yoğun bir mitotik aktivite başlamaktadır (Erickson, 1966b). Buna karşılık oogonyumun mitotik bölünme sayısı ise sınırlıdır (Russe, 1983).

Ovaryumların gelişme sürecinde olgunlaşan oogonyumlar, gelişen gonadların boyutlarındaki artış sebebiyle ovaryum dokusu içine derinlemesine gömülürler (Stein, & Anderson, 1979). Ovaryumlarda daha yüzeysel olarak bulunan primordiyal germ hücreleri yeni oogonyumları oluşturmak için bölünürler (Russe, 1983).

Oogonyumlar fare, sıçan gibi türlerde hemen mayoz bölünmeye başlarken, domuz, koyun, köpek ve inek gibi türlerde ise mayoz bölünme daha geç başlamaktadır. Dişi fetüslerde, oogoniyal mayoz bölünmenin başlangıcı erkek fetüslerde testiküler farklılaşmayla kıyaslandığında 45 gün kadar gecikebilmektedir. Örneğin; sığırlarda oogonyumun mayoz bölünmesi gebeliğin 75-80. günlerinde başlamaktadır. Germ hücre kordonlarının dağılmasıyla birlikte ovaryumlar korteks ve medulla olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Erickson, 1966b; Smitz, & Cortvrindt, 2002). Mayoz bölünmeye başlayan ilk oogonyum korteksin iç kısmında bulunmaktadır (Byskov, & Hoyer, 1994). Oogoniyal mitoz gebeliğin yaklaşık 150. gününde bitmekte (Erickson, 1966b) ve dişi buzağılarda germ hücre sayısı sabitlenmiş bir şekilde doğmaktadır (Erickson, 1966b; Smitz, & Cortvrindt, 2002). Sağ ovaryumdaki germ hücre sayısı sol ovaryumdaki germ hücre sayısından yaklaşık % 10 daha fazladır (Erickson, 1966a).

2.3.1.3. Oogonyumların Primer Oositlere Dönüşümü ve Primordiyal Foliküllerin Oluşumu

Oogoniyal germ hücreleri mayoz bölünme başladıktan sonra genişlerler. Birinci mayoz bölünmenin profaz devresinin diploten döneminde artık primer oosit olarak adlandırılırlar. Primer oositler oogonyumlardan daha iri yapılıdırlar. (Byskov, & Hoyer, 1994, Smitz, & Cortvrindt, 2002,; Zık, 2019). Mayoz bölünme sırasında germ hücreleri oldukça hassastır (Beaumont, & Mandl, 1962). Fötal insan ovaryumlarında germ hücrelerinin sadece yaklaşık %5'i birinci mayozun diploten aşamasına ulaşabilmektedir (Baker, 1963). Hayatta kalan oositlerin büyük çoğunluğu tek katlı yassı epitel hücreler ile çevrilmekte ve böylece primordiyal foliküller oluşmaktadır (Erickson, 1966b). Geriye kalan ve etrafı epitel hücreler ile çevrilmeyen oositler dejenere olmaktadır. Sığır ovaryumlarındaki primordiyal foliküller ovaryum rezervini oluşturur (Erickson, 1966b). Yeni doğan buzağılardaki primordial follikül rezervinin yaklaşık olarak 68000 (Erickson, 1966b) ila 150.000 (Jaiswal, Singh, & Adams, 2004) arasında değiştiği ifade edilmektedir. Primordiyal folikül rezervi yenilenemediğinden

dolayı bir ineğin yaşamı boyunca yavaş yavaş tüketilmektedir (Erickson, 1966a; Gosden, Laing, Felicio, Nelson, & Finch, 1983). İnek 15 -20 yaşına geldiğinde ise neredeyse sıfırlanmaktadır (Erickson, 1966a). Büyüme sürecine giren foliküllerin % 99'undan fazlası atrezi olmaktadır (Ireland,1987).

2.3.2. Primordiyal Foliküllerin Gelişim Aşamaları ve Antral Foliküllerin Oluşumu

Sığırlarda primer folikül sınıflandırılmasında ilk sırada (Tip I) yer alan primordiyal foliküller, mayozun profaz I safhasında bulunan olgunlaşmamış bir yumurta hücresi yani oosit ile onu çevreleyen sınırlı sayıdaki (<10) tek katlı yassı (pre-)granüloza hücresinden oluşmaktadır (Aerts, & Bols, 2010). Sığırlarda fötal ovaryumlarda primordiyal foliküller gebeliğin 90. gününden önce nadiren tespit edilmiştir. Gebeliğin 90. ve 140. günleri arasında primordiyal foliküllerin sayısı belirgin bir şekilde artmakta ve 141. günden itibaren ise sayıları sabit bir hale gelmektedir (Fortune, Yang, & Muruvi, 2010). Primordiyal foliküllerin bir kısmı büyümeye devam ederken (Russe, 1983), bir kısmı ise atreziye olmak için foliküler havuzda beklemektedir (Erickson, 1966b; Gougeon, 1996). Primordiyal foliküllerin büyüme süreci için seçilmesi ile birlikte ilk büyüme safhası başlar ve yassı granüloza hücreleri şekil değiştirirler ve kübik bir hal alırlar. Ayrıca granüloza hücrelerinin sayısında da artış olur. Böylece bir oosit, onu çevreleyen tamamen kübik granüloza hücrelerinden oluşan tek katlı bir hücre katmanı ve en dışta ise bir bazal laminadan oluşan primer foliküller (Tip II) şekillenir. İkinci büyüme fazının başlaması ile birlikte granüloza hücrelerinin sayısında ilave bir artış oluşur. Foliküller en az 40 granüloza hücresi içerdiği zaman oosit hızla büyümeye başlar ve çapı artar. Oositlerin büyümesi zona şekillenmesini uyarır. İlk olarak küçük preantral foliküllerde (Tip 3) zona pellusida materyalinin birikimi başlar ve oositin tam olarak zona ile sarılması ile birlikte büyük preantral foliküller (Tip 4) şekillenir. Tekal hücreler intersitisyel stromadan köken alırlar ve primer folikülün bazal laminası üzerinde bireysel hücreler şeklinde bulunurlar. İlk teka interna hücreleri küçük pre-antral foliküllerde (Tip 3) şekillenirler ancak büyük pre-antral folikül aşaması oluşmadan (Tip 4) net olarak ayırt edilen bir teka interna tabakası gelişmez. Dış teka tabakasının yoğun bir şekilde vaskülarizasyonu ile birlikte folikül endokrin faktörleri tedarik etme kabiliyetine sahip olur. Granüloza hücrelerinin sayısı 250 adedi geçtikten sonra antrum oluşmaya başlar.

Başlangıçta, granüloza hücrelerinin arasında birkaç adet içi sıvı dolu yama şeklinde yapılar oluşur, bunlar tek bir boşluk oluşturacak şekilde birleştiğinde folikül antral folikül olarak adlandırılır (Aerts, & Bols, 2010).

2.3.3. Primordiyal Foliküllerin Aktivasyonu ve Primer Foliküllere Dönüşümü

Hareketsiz halde duran folikülerden oluşan havuzun yani primordiyal folikül havuzun oluşumu ve primordiyal folikülerin büyüme sürecine girmelerinin kademeli bir şekilde aktivasyonu dişi fertilitesi açısından büyük önem taşımaktadır (Fortune ve ark., 2010).

Sığırların fötal ovaryumları tarafından üretilen steroidlerin primordiyal folikül oluşumunu ve yeni şekillenmiş olan foliküllerin aktive olma kapasitesi kazanmalarını düzenledikleri belirlenmiştir (Fortune ve ark., 2010). Koyunların ve sığırların fötal ovaryumlarında steroidogenik faktörün (SF-1) mRNA'sı ve proteini tespit edilmiştir. Ayrıca fötal ovaryumların steroidogenik enzimlere de sahip olduğu belirlenmiştir (Fortune ve ark., 2010). Fötal sığır ovaryumları, primordiyal foliküller şekillenmeye başlamadan önce, özellikle de gebeliğin ilk 1/3'de steroidleri üretmeye başlamaktadır. Bu bulgular steroid hormon üretiminin primordiyal foliküllerin oluşumu üzerinde etkileri olabileceğini düşündürmüştür. Daha sonraki aşamalarda fötal ovaryumlar tarafından üretilen östradiol ve progesteronun primordiyal foliküllerin şekillenmesini baskıladığı belirlenmiştir. Bu iki steroidin birinin veya her ikisinin fötal ovaryumlar tarafından üretiminin azalması ile birlikte intra-ovaryan bir sinyal meydana geldiği ve primordiyal folikül oluşumunun başladığı tespit edilmiştir (Fortune ve ark., 2010). Fötal ovaryumlar ve oositler tarafından ekspre edilen germ hücreleri için spesifik farklılaşma faktörünün (FIGα) primordial foliküllerin şekillenmesi ve oositin yaşamını sürdürmesinde rol oynadığı ifade edilmektedir (Bayne, Martins da silva, & Anderson, 2004; Fortune ve ark, 2010; Cheng ve ark. 2020).

Sığırlarda primordiyal foliküllerin aktivasyonu bu foliküllerin yakın çevresindeki inhibitör ve stimülatör faktörlerin aralarındaki dengeye bağlı olarak kontrol edilmektedir. Sığır ovaryumlarına ait korteks parçacıklarının in vitro kültürü yapıldığında insülin ve kit-ligan (Stem cell factor)'ın primordiyal folikülleri aktive ettiği ve böylece onların primer foliküllere geçişini uyardığı tespit edilmiştir. Östradiolün ise foliküler aktivasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir (Fortune ve ark,

2010). Oosit tarafından salgılanan büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF9) ve kemik morfogenetik protein 15 (BMP15) gibi dönüştürücü büyüme faktör β – ailesinden (TGF-β) bazı faktörlerin erken foliküler gelişme aşamasında rol oynadığı tespit edilmiştir. Oosit tarafından üretilen temel fibroblast büyüme faktörünün (bFGF), primordiyal folikül büyümesini uyardığı gözlemlenmiştir. Sekunder folikül içerisindeki oositin primordiyal foliküller içerisine verilmesi sonucu primordiyal folikülün granüloza hücrelerinin farklılaşma ve gelişme oranlarının ikiye katlandığı ve primordiyal folikülün sekunder folikül özellikleri kazanmaya başladığı belirlenmiştir. Aynı zamanda bu oositlerin olgunlaşma aşamasından sonra fertilize olabilecekleri ve normal embriyolar geliştirebilecekleri tespit edilmiştir. Böylece oositin foliküllerin aktive edilmesi sürecinde önemli rol oynadığı kanısına varılmıştır (Aerts, & Bols, 2010; Webb ve ark., 2016).

2.3.4. Primer Foliküllerin Sekunder Foliküllere Dönüşümü Üzerinde Etkili Olan Faktörler

Ovaryuma ait kortikal parçacıkların kullanıldığı in vitro çalışmalarda testosteronun primer foliküllerden sekunder foliküllere geçişi uyardığı belirlenmiştir. Anjiyogenezisin foliküllerin gelişim süreçlerinde çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenezisin önemli düzenleyicilerinden biridir. Ovaryan kortikal kültürlere katılan VEGF'in doza bağlı olarak primer foliküllerin sekunder foliküllere dönüşümünü altı kat artırdığı tespit edilmiştir. Sekunder foliküller iki veya daha fazla granüloza katına sahip preantral foliküllerdir. Sığırlarda AMH'ın primer foliküllerin büyümesini yavaşlattığı, ayrıca sekunder veya daha ileri büyüme aşamasındaki foliküllerin aktivasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. (Fortune ve ark., 2010).

2.3.5. Foliküllerin Sınıflandırılması

Folikülogenezis, oositin ve çevresindeki granüloza hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını takiben bir primordiyal folikülün preovulatör boyuta kadar geliştiği primer, sekunder ve sonunda ovulasyon için uygun büyüklüğe ulaşacak antral foliküllerin büyümesi ve gelişim aşamalarını içeren bir süreçtir (Jaiswal, 2007; Senger, 1997). Primordiyal foliküllerin fetüste gebeliğin 74. gününden itibaren oluşmaya

başladığı belirlenirken, gebeliğin 90, 120 ve 150. günlerinde sırasıyla primer, sekunder ve preantral foliküllerin oluştuğu tespit edilmiştir (Gasser, 2005).

Bir folikülün gelişim aşamalarının sınıflandırılması folikül çapına, oosit ve oositin etrafını çevreleyen granüloza hücrelerinin şekline ve epitel katman sayısına bağlıdır (Braw-Tal, & Yossefi, 1997; Lundy, Smith, O'Connell, Hudson, & McNatty, 1999). Tek katlı yassı granüloza hücrelerine sahip olan primordiyal folikülün hücreleri kübik granüloza hücrelerine dönüşerek primer folikül oluşmaktadır. Primer folikül antrum içermeyen tek katlı kübik granüloza hücrelerine sahiptir (Braw-Tal, & Yossefi, 1997). Daha sonra primer folikülün granüloza hücrelerindeki artış devam etmekte ve sekunder folikül oluşmaktadır. Sekunder foliküller antrum içermeyen 2-6 kat arasında değişen granüloza hücreleri katmanına sahip foliküllerdir. Primordiyal, primer ve sekunder foliküller antrum içermediklerinden dolayı preantral foliküller olarak sınıflandırılmaktadır. Tersiyer foliküller ise bir antrumu olan ve 6'dan fazla granüloza hücre katmanı bulunan foliküllerdir. Tersiyer foliküller aynı zamanda vesiküler ya da antral foliküller adları altında da sınıflandırılmaktadır. (Eppig, 2001). Ovulasyon öncesi gelişimini tamamlamış 14-16 mm çapındaki foliküller Graff Folikülü olarak kabul edilmektedir (Braw-Tal, &Yossefi, 1997).

2.4. Ovaryum Rezervi

Ovaryum rezervi sığırlarda primordiyal foliküllerin toplam sayısı olarak tanımlanmakta ve ovaryum rezervi ile fertilite arasında önemli düzeyde bir ilişki olduğu belirtilmektedir (Jimenez-Krassel, F. ve ark., 2015; Mossa, F. ve ark., 2012; Ribeiro, E.S. ve ark., 2014). Ovaryum rezervi kapasitesi az olan ineklerde oosit kalitesinin düştüğü (Ireland ve ark., 2009), embriyonik gelişim kapasitesinin azaldığı ifade edilmektedir (Tessaro ve ark., 2011). Aynı zamanda ovaryan foliküler rezervleri düşük olan ineklerde korpus luteumun şekillenmesi ve farklılaşması da olumsuz şekilde etkilemektedir. Bu durum suboptimal luteal fonksiyonlara yol açmakta, progesteron düzeyini azaltmakta ve yeterli endometriyal gelişim şekillenmemektedir (Jimenez-Krassel ve ark., 2009). Ovaryan rezervlerin az olması erken ovaryan yaşlanma başka bir deyişle foliküler rezervlerin erken yaşlarda hızla tükenmesine yol açabilmektedir. Ovaryum rezervi düşük olan ineklerde daha düşük gebelik oranı (Mossa ve ark., 2012; Ribeiro ve ark., 2014), gebelik başına daha fazla tohumlama

sayısı, buzağılamadan sonra daha uzun gebe kalma aralığı (Mossa ve ark., 2012) ve daha kısa verimli yaşam ömrü gibi üreme ve yetiştiricilik ile ilgili birçok olumsuzluk şekillenmektedir (Jimenez - Krassel ve ark., 2015). Ovaryum üzerindeki antral folikül sayısı (AFS) ile primordiyal foliküllerin toplam sayısı arasında istatistiki açıdan önemli olacak düzeyde pozitif bir ilişki bulunmaktadır (Modina ve ark., 2014).

2.5. Antral Folikül Sayısı (AFS)

Suni tohumlama ve embriyo üretimi gibi yardımcı üreme teknikleri, sığırlarda üstün genetik genetik özelliklerin aktarılmasında çok önemli rol oynamaktadır. (Bó, De la Mata, Baruselli, & Menchaca, 2016; Hansen, 2014). Antral folikül sayısı yüksek olan ineklerde üreme ile ilgili parametrelerin ve reprodüktif biyoteknolojik uygulamalara karşı yanıtın daha iyi olduğu belirtilmektedir (Ireland ve ark., 2011; Rico ve ark., 2012; Silva-Santos ve ark., 2014a).

İnekler arasında AFS açısından önemli farklılıkların olmasına rağmen, aynı hayvanda gözlemlenen antral folikül sayısının tekrarlanabilir olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Burns, Jimenez-Krassel, Ireland, Knight, & Ireland2005; Morotti ve ark., 2017).

Avrupa kökenli kültür ırkı (Bos Taurus) ineklerde, antral folikül sayısının ovaryum rezervi ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilmektedir (Ireland ve ark., 2011). AFS üzerinde genetik (Walsh ve ark., 2014), gebelik, beslenme ve sağlık durumu (Evans ve ark., 2012; Ireland ve ark., 2011) gibi birçok faktörün etkili olduğu ifade edilmektedir. Sığırlarda beslenme durumu ve enerji metabolizmasının foliküler büyümeyi, oosit kalitesini ve reprodüktif hormonlarının salgılanmasını önemli derecede etkileyen faktörler olduğu vurgulanmaktadır (Evans ve ark., 2012; Jimenez-Krassel ve ark., 2009; Mossa ve ark., 2010).

Bos taurus türü sığırlarda da, AFS'nin doğrudan üreme performansıyla bağlantılı olduğu ve yüksek AFS düzeyi ile morfolojik açıdan sağlıklı olan toplam folikül sayısı arasında pozitif ilişkili bulunduğu ifade edilmektedir (Ireland ve ark., 2008; 2011). Ayrıca antral folikül sayısı yüksek olan ineklerde progesteron konsantrasyonunun daha yüksek, oosit ve blastosist sayısının daha fazla olduğu belirtilmektedir (Jimenez-Krasel ve ark., 2009). Bos taurus (Ireland ve ark., 2008) Bos

indicus (Santos ve ark., 2016) türü dişi sığırlar ve bu türlerin melezlerinde (Silva-Santos ve ark., 2014a) antral folikül sayısı yüksek olan dişilerden düşük olanlara göre daha fazla sayıda embriyo elde edildiği ifade edilmektedir. AFS yüksek olanların düşük olanlara göre gebelik oranlarının daha yüksek olduğu vurgulanmaktadır (Evans ve ark., 2012; Mossa ve ark., 2012).

2.5.1. AFS'nin Tekrarlanabilirliği

Bos taurus (Burns ve ark., 2005; Ireland ve ark., 2008) x Bos indicus (Santos ve ark., 2012; Silva-Santos ve ark.., 2014b) ve Bos indicus x Bos taurus melezi inekler (Silva-Santos ve ark., 2014a) üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, inekler arasında karşılaştırmalar yapıldığında AFS'nin büyük değişiklikler gösterdiği buna karşılık bireysel açıdan değerlendirme yapıldığında ise çok tutarlı bir seyir izlediği belirtilmektedir. Bu özelliğe dayanarak inekler ultrasonografi ile görüntülenen antral folikül sayısına göre düşük, orta veya yüksek AFS'li olmak üzere üç grup altında sınıflandırılabilmektedir (Guerreiro ve ark., 2014; Ireland ve ark., 2008; Silva-Santos ve ark., 2014a).

2.5.2. Progesteron Düzeyleri ve AFS

Korpus luteum (CL) tarafından üretilen progesteron, evcil hayvanlarda embriyo için uygun uterus ortamının oluşumu, embriyonik gelişim ve gebeliğin devamı için gerekli olan çok önemli bir faktördür (Bazer ve ark.., 2010; Pohler ve ark.., 2012). Ayrıca düşük progesteron konsantrasyonu, endometriyumun daha yavaş gelişimi ve sığırlarda embriyonik mortalite gibi önemli reprodüktif problemlerin oluşumunda rol oynamaktadır (Diskin, & Morris, 2008; Inskeep, 2004).

Yapılan çalışmalarda ovaryumlardaki folikül sayısı ile kan progesteron düzeyi arasında ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Evans ve ark., 2012; Ireland ve ark., 2011; Martinez, Sanderson, Quirke, Lawrence, & Juengel, 2016). Diöstrüs ve gebelik sırasında düşük AFS'ye sahip ineklere kıyasla yüksek AFS'ye sahip ineklerin plazma progesteron konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Düşük AFS'li ineklerin plazmasındaki progesteron konsantrasyonunun azalması; progesteron üretmek için luteal hücrelerin kapasitesinin düşük olması ve CL'de LH reseptörü için gerekli olan ve aynı zamanda kolesterolü mitokondriye taşıyan steroidojenik akut

düzenleyici protein (STAR) ve mRNA düzeylerinin azalması ile ilişkilendirilmiştir (Jimenez-Krassel ve ark., 2009).

2.6. Anti-Müllerin Hormon (AMH)

AMH ilk kez Fransız endokrinolog Alfred Jost tarafından 1953 yılında keşfedilmiştir. O dönemde, bilim adamları testislerin sadece erkek dış genital organlarının gelişiminden sorumlu olan testosteronu sentezlemekle kalmayıp aynı zamanda tavşan fetüslerinde Müllerian kanallarını gerileten bir kimyasal ürettiklerini savunmaktaydılar (Jost, 1953). Daha sonra AMH bilim insanı Picon tarafından tanımlanmış (Picon, 1969) ve sığır fetal testis dokusundan laboratuvar ortamında saflaştırılmıştır (Picard, & Josso, 1984). AMH geni sığır, kısrak ve keçilerde 7. kromozomda, koyunlarda 5. kromozomda, mandalarda 9. kromozomda ve domuzlarda ise 2. kromozomda yer almaktadır. (Gao, & Womack., 1997; NCBI). Dönüştürücü büyüme faktörü-beta üst ailesinin (Transforming growth factor - beta superfamily; TGFβ) bir üyesi olan AMH, dimerik glikoprotein yapıda bir hormondur (Monniaux ve ark., 2013). Dokuların büyümesi ve farklılaşmasında rol oynayan AMH sadece gonadlardan salgılanır (Marca ve ark., 2010; Visser, & Themmen, 2005). Embriyonik dönemde erkek cinsiyetinin farklılaşması sürecinde AMH gereklidir (Vernunft, Schwerhoff, Viergutz, Dıederıch, & Kuwer, 2015). Erkeklerde testiküler farklılaşmanın başlangıcından ergenliğe kadar giden süreçte sertoli hücreleri tarafından üretilir. Embriyonik dönemde uterusun, oviduktların ve vajinanın üst kısmının taslağını şekillendirecek olan Müller kanalının regrese edilmesinden sorumlu olan AMH'in yokluğunda Müller kanalı, oviduktlar, uterus ve vajinanın üst kısmını oluşturacak şekilde dönüşüme uğramaktadır (Arouche ve ark., 2015; Marca ve ark., 2010; Visser, & Themmen, 2005).

Dişilerde AMH ovaryum üzerinde bulunan pre-antral ve küçük antral foliküllerin granüloza hücreleri tarafından üretilerek kan dolaşımına salınmaktadır (Rico ve ark., 2011). Dolaşımdaki AMH seviyesini belirlemek için serum ve plazma örnekleri kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda kan AMH konsantrasyonunun fertilite ile pozitif ilişkisi olduğu bilinen antral folikül sayısının değerlendirilmesinde güvenilir bir endokrin biyobelirteç olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur (Monniaux ve ark., 2013; Rico ve ark., 2011; Souza ve ark., 2015).

AMH aktivitesinin oluşturulması granüloza hücrelerinde bulunan iki reseptör aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Tip 1 (AMHR1) ve tip 2 (AMHR2) reseptörleri AMH'ya bağlanarak reseptör kompleksini oluşturmakta ve böylece AMH sinyalini başlatmaktadır. Küçük (çapı; 5-8 mm) foliküllerde, 13-24 mm çapındaki foliküllere göre daha fazla AMH reseptörü bulunmaktadır. Bu da küçük foliküllerden daha fazla AMH üretildiğini göstermektedir (Poole, Ocon-Grove, & Johnson., 2016). Subordinat foliküller ve dominant folikülleri kıyaslayan araştırmalarda dominantlık safhasına ulaşan foliküllerde AMHR2 ekpresyonunun AMHR1 ekspresyonuna göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu durum foliküllerin dominant hale gelmesinde AMHR2'nin kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Iiha ve ark., 2016).

Foliküller ovaryan foliküler havuzdan ön seçilim aşamasına girmeye başladıkları andan itibaren AMH ekspresyonu şekillenmeye başlamaktadır (McGee, & Hsueh, 2000). Preantral ve küçük antral folikül aşamasına gelindiğinde AMH düzeyi en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Dominant folikülün seçimi aşamasında ve foliküller ovulasyona doğru giderken kan AMH miktarı düşmektedir. Primordiyal ve atretik follikülerden AMH üretilmemektedir (Monniaux ve ark., 2008; Mossa, Jimenez-Krassel, Scheetz, Weber-Nielsen, & Ireland, 2017). AMH'ın bloke edildiği çalışmalarda foliküllerin ön seçilim aşamasının daha hızlı olduğu ve primordiyal foliküller havuzun, başka bir deyişle foliküler rezervin daha erken yaşta tükendiği ortaya konmuştur. AMH'ın foliküler gelişme sırasında iki ana role sahip olduğu belirtilmektedir. Bunlar foliküler rezervin erken bir dönemde tüketilmesini engellemek için primordiyal foliküler rezervlerdeki foliküllerin büyümesinin baskılanması, preantral ve küçük antral foliküllerin FSH'ya olan duyarlılığını azaltarak foliküler gelişmenin düzenlenmesidir (Mossa ve ark., 2017; Yang, Cushman, & Fortune, 2017).

Ayrıca AMH konsantrasyonları üzerine östradiol ve FSH'ın negatif bir etkisi olduğu gösterilmiştir. In vitro ortamda sığır granüloza hücrelerine FSH uygulandığı zaman 3-5 mm çapındaki foliküllerde AMH salgılanması yaklaşık %50 oranında azalırken, 5-10 mm'lik foliküllerde ise AMH gen ekpresyonu yaklaşık %30 oranında baskılanmaktadır (Rico ve ark., 2011). İnsanlar, ratlar, fareler ve diğer bazı memelilerin dişilerinde de in vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda AMH ve FSH arasındaki antagonistik etkinin olduğu belirlenmiştir (Baarends ve ark., 1995; Pellatt ve ark., 2011).

Günümüzde Siyah alaca, Japanase Black, Jersey, Main-Anjou (Etçi ırk) gibi ırkların yanında diğer bazı melez ırklarda da AMH konsantrasyonlarının referans değerleri belirlenmiştir (Hirayama ve ark., 2017; Mossa ve ark., 2017). Siyah Alaca buzağılarda AMH konsantrasyonunun doğumu izleyen ilk 2 ay içinde arttığı, 5. ayda düştüğü, 8 ve 9. aylarda dolayısıyla yaklaşık ilk ovulasyonun şekillendiği dönemde erişkin bireylerdeki seviyelerine ulaştığı ve bunu izleyen süreçte ise sabit kaldığı tespit edilmiştir (Mossa ve ark., 2017). Japanase Black ırkı buzağılarda doğumu izleyen iki ayda AMH konsantrasyonunun aşamalı olarak arttığı, 2-7. aylar arasında konsantrasyonda önemli derecede dalgalanmalar gözlendiği, 8. ayda bu dalgalanmaların belirgin şekilde azaldığı, 11. ayda ise sabit hale geldiği belirlenmiştir (Hirayama ve ark., 2017).

2.6.1. Senkronize ve Doğal Östrüslarda AMH Düzeylerinin Karşılaştırılması

Ovaryum rezervi dişi gonadların hem nitelik hem de nicelik olarak reprodüktif kapasitesini yansıtmaktadır. Bu açıdan ovaryum rezervinin morfolojik olarak sağlıklı folikül sayısı ve fertilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ireland, 2009,2011; Jimenez-Krassel ve ark., 2009).

AMH gelişmekte olan sağlıklı foliküllerin granüloza hücrelerinden üretildiği için AMH ile ovaryum rezervi arasında pozitif bir ilişkili olduğu görülmektedir (Ireland ve ark., 2011; Jimenez-Krassel ve ark., 2009). Bu yüzden AMH gonadotropinlere duyarlı olan küçük antral foliküllerin durumu hakkında öngörüde bulunulmasını sağlayan endokrin bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Rico ve ark., 2009). AMH gelişmekte olan foliküllerin FSH'ya olan duyarlılığını azalmakta ve foliküller havuzdaki primordiyal folikül sayısını kontrol altında tutmaktadır (Clemente ve ark., 1994; Durlinger ve ark., 2001). Doğal östrüs gösteren ve senkronizasyon metotları kullanılarak östrüsları uyarılan düvelerin AMH konsantrasyonları arasında farklılık olup olmadığı ve ekzojen olarak kullanılan hormonların AMH düzeyleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Etçi (Şarole ve Angus) ve sütçü ırklara (Jersey ve Holstein) ait düvelerde östrüs senkronizasyon protokolü olarak Select Synch + CIDR uygulanmış ve serum AMH ölçümleri için kan örnekleri seksüel siklusun östrüs evresinde alınmıştır. Sonuç olarak ortalama serum AMH düzeyleri senkronize edilmiş düvelerde (0.0428 ± 0.01 ng/ml), doğal östrüs gösterenlerde ise (0.0543 ± 0.01 ng/ml)

olarak bulunmuş ve değerler arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı belirlenmiştir. Doğal ve senkronize östrüslar arasındaki yapılan AMH ölçümlerinin birbiriyle uyumlu ($r= 0.67$; $p<0.001$) olduğu görülmüştür. Ayrıca etçi düvelerin AMH düzeylerinin sütçü düvelere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (0.0638 ± 0.01 ng/ml ve 0.0402 ± 0.01 ng/ml). Buna karşılık etçi ırk ve sütçü ırk düveler kendi aralarında değerlendirildiğinde ırklar arasında AMH konsantrasyonlarında istatistiki açıdan fark olmadığı ortaya konmuştur. Buna ek olarak bu çalışmaya dahil edilen farklı yaş ve canlı ağırlık ağırlığındaki düvelerin de serum AMH konsantrasyonları arasında önemli farklılıkların olmadığı ($p>0.10$) gözlenmiştir (Pfeiffer, Jury, & Larson, 2014).

2.6.2. AMH'ın Tekrarlanabilirliği

Sığırlarda AMH konsantrasyonları östrüs siklusu içerisinde minimum değişim göstermektedir. Düvelerde siklusun herhangi bir döneminde tek bir kez yapılan AMH ölçümünün aynı veya farklı sikluslarda farklı günlerde yapılan AMH ölçümleri ile yüksek oranda korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir ($r = 0,97$) (Ireland ve ark., 2011). Süt ineklerinde AMH konsantrasyonları aynı östrüs siklusunda (Rico ve ark., 2009; Souza ve ark., 2015), iki ayrı siklusun farklı günlerinde (Rico ve ark., 2009) ve doğal ve senkronize östrüs sikluslarında (Pfeiffer ve ark., 2014) sabit olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular sığırlarda siklusun herhangi bir gününde tek bir kez alınan kan örneği ile AMH konsantrasyonlarının güvenilir bir şekilde belirlenebileceğini göstermektedir (Mossa, & Ireland, 2019).

2.6.3. Sığırlarda AMH Düzeyleri

İnekler bireysel olarak değerlendirildiğinde farklı zamanlarda ölçülen AMH konsantrasyonları önemli farklılıklar göstermemesine rağmen, buna karşılık farklı bireyler arasında ise önemli farklılıklar gözlemlendiği ifade edilmektedir. Holstein, Jersey ve melezlerinin dahil edildiği 1200 inekte yapılan bir çalışmada plazma AMH konsantrasyonlarınının genel olarak 10-3198 pg/ml arasında değiştiği; ortalama AMH konsantrasyonunun ise $320,3 \pm 251,1$ pg/ml düzeyinde olduğu belirlenmiştir. İnekler AMH konsantrasyonlarına göre sınıflandırıldığında konsantrasyonları düşük olan grupta AMH düzeylerinin 10-140 pg/ml sınırları içinde değiştiği, ortalamanın ise 85 pg/ml olduğu, bununla birlikte yüksek olan grupta ise AMH düzeyleri 451-3,198 pg/ml aralığında ölçülürken ortalamanın ise 631 pg/ml olduğu tespit edilmiştir (Riberio ve

ark., 2014). Buna karşılık diğer bazı çalışmalarda ise Holstein ineklerde ortalama sürü AMH konsantrasyonlarının 0,01-400 pg/ml arasında değiştiği ve AMH düzeyi 400 pg/ml üzerinde az sayıda inek olduğu belirlenmiştir (Rico ve ark., 2009; Souza ve ark., 2015). Bu nedenle sürüler arasında büyük değişimler görüldüğü dikkate alındığında henüz bir referans aralığı belirlenememiştir. Bunun yerine AMH düzeylerini değerlendirmek için çalışmaya katılan hayvanlar arasında hormonun kan seviyeleri temel alınarak düşük, orta ve yüksek AMH kan seviyelerine sahip hayvanlar şeklinde gruplandırmalar yapılmaktadır (Alward, & Bohlen, 2020).

2.6.4. AMH ve Pubertas

Düvelerde pubertas yaşı reprodüktif verimliliği belirleyen önemli etkenlerdendir (Perry, 2016). Düveler 10 aylık veya daha erken yaşta pubertasa eriştiklerinde geç pubertasa ulaşanlara göre işletmeler açısından yetiştirme maliyetlerinin daha düşük olduğu belirtilmektedir (Wehrman, Kojima, Sanchez, Mariscal, & Kinder, 1996). Çünkü erken yaşta pubertasa ulaşan düveler aşım veya suni tohumlama yapılabilme erginliğine ulaşıncaya kadar daha fazla östrüs siklusu geçirmekte, buna bağlı olarak ilk tohumlama gebelik oranı daha yüksek olmakta, daha erken gebe kalmakta ve sürü verim ömrü daha uzun olmaktadır (Bagley, 1993; Buskirk, Faulkner, & Ireland, 1995; Lesmeister, Burfening, & Blackwell, 1973).

Östrüs siklusu boyunca pubertasa ulaşmış düvelerde AMH belirli bir düzeyde sabit kalmaktadır. Östrüs siklusunun herhangi bir gününde tek AMH ölçümü AFS, ovaryum rezervi, süperovulasyon yanıtı ve fertiliteyi belirlemede kullanılan etkili bir biyobelirteç olduğu görülmektedir (Batista ve ark., 2016; McKinley, Oldfield, & Vivas, 1992; Tilbrook, Kretser, & Clarke, 1992). Bu faktörlere dayanarak AMH'ın pubertas yaşını belirlemede etkinliği araştırılmıştır. On bir adet Japanase Black dişi buzağının doğumdan itibaren başlanarak pubertas sonrası 6. haftaya kadar 2 haftada 1 kez olmak üzere kan örnekleri alınmıştır. Aynı zamanda erken ve geç pubertasa erişen düveler arasındaki AMH düzeyleri de karşılaştırılmıştır. Düvelerin ortalama pubertas yaşı 45,09 ± 2,45 hafta olarak bulunmuştur. Pubertasa 37,00 ± 2,38 haftada ulaşan dört düve için erken pubertasa ulaşanlar ve 49,71 ± 2,07 haftada pubertasa ulaşan yedi düve ise geç pubertasa ulaşanlar olmak üzere iki ayrı gruba ayrılmıştır. Plazma progesteron düzeyleri pubertas öncesi dönemde <1 ng/ml'in altında (0,25 ± 0.002 ile

0,44 ± 0.10 ng/ml) iken pubertas ve sonraki haftalarda plazma progesteron düzeylerinin >1 ng/ml'in üzerine çıktığı tespit edilmiştir. Doğumdan sonra plazma AMH konsantrasyonları 0,08 ± 0,02 ng/ml'den 10. haftaya kadar aşamalı olarak 0,33 ± 0,10 ng/ml yükselmekte olup pubertas öncesi 6. haftaya kadar kısmen azalmakta ve daha sonrasında sabit kalmaktadır. Minimum FSH düzeyi doğum haftasında 0,36 ± 0,11 ng/ml iken 4. haftaya kadar aşamalı olarak artarak 0,83 ± 0,13 ng/ml olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte pubertas öncesi 4. hafta FSH düzeyi 1,45 ± 0,20 ng/ml iken pubertas haftası ortalama 1,15 ± 0,26 olarak tespit edilmiştir. On altıncı haftadaki plazma AMH düzeyinin dördüncü ve altıncı haftalardaki AMH düzeyi ile önemli derecede pozitif ilişkili olduğu belirtilmiştir (r=0.69 ve r=0.71). Ayrıca pubertas öncesi 6. haftadan pubertas sonrası 6. haftaya kadar neredeyse tüm AMH düzeyleri birbiriyle ilişkili olduğu tespit edimiştir. Erken pubertasa ulaşan düvelerin ortalama AMH düzeyi geç pubertasa ulaşanlara göre (0,69 ±0,08 vs. 0,37 ± 0,22 ng/ml) önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak erken pubertasa ulaşanların FSH konsantrasyonları geç pubertasa ulaşanlara göre (0,82 ± 2,38 vs. 1,23 ± 2.07 ng/mL) daha düşük düzeyde olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak yapılan çalışmada 16 haftalık yaşta ölçülen plazma AMH düzeyinin pubertas sonrası AMH düzeyi ile pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte erken yaşta AMH ölçümünün pubertas yaşının belirlenmesinde bir biyobelirteç olarak kabul edilebileceği kanısına varılmıştır (Hossam El-Sheikh Ali ve ark., 2017).

2.6.5. Fetal Cinsiyetin Maternal AMH Üzerine Etkisi

Ovaryum rezervi ve fertilitenin belirlenmesinde markır olarak kullanılan AMH'ın son zamanlarda kadınlarda, fetüsün cinsiyetinin erkek olduğu gebeliklerde cinsiyet markırı olarakta kullanılmaya başlandığı görülmektedir (Empey ve ark., 2012). İnsanlarda ve sığırlarda gebeliğin 7- 8. haftalarından itibaren erkek fetüslerden AMH salgılanmaktadır (Lee ve ark., 1996; Vigier, Tran, Legeai, Bezard, & Josso, 1984a). Fetal gelişim ve fertilite üzerine AMH'ın etkileri bilinmesine rağmen insanlarda gebelik sırasında maternal AMH düzeyleri hakkında sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır (Nelson, Stewart, Fleming, & Freeman, 2010; Pankhurst, Clark, Zarek, Laskin, & McLennan, 2016). Yapılan bir çalışmada foliküler gelişmenin azalmasından dolayı gebelikte maternal AMH seviyelerinin önemli derecede düştüğü kanısına varılmıştır (Kuijper, Ket, Caanen, & Lambalk, 2013). Diğer bir araştırmada erkek

fetüs taşıyan ineklerde gebeliğin 35. ve 135. günlerinde AMH düzeyleri +255,4 pg/ml olarak tespit edilirken, dişi fetüse sahip olan ineklerde plazma AMH düzeyleri -181,3±146.1 pg/ml olduğu belirlenmiştir. Gebeliğin 135. ve 275. günlerinde ise erkek veya dişi fetüs taşıyan ineklerin kan plazma AMH düzeyleri arasında önemli farklılıklar tespit edilmemiştir. Aynı araştırmada gebeliğin 54-220. günleri arasında olan 20 erkek ve 19 dişi fetüsün ve bu fetüsları taşıyan ineklerin plazma AMH düzeyleri incelenmiştir. Erkek fetüslerin AMH düzeylerinin (193,561.6 ± 13,416.2 pg/ml) dişi fetüslere oranla (147.1 ± 24.1 pg/ml) önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde erkek fetüs taşıyan ineklerin ortalama plazma AMH düzeyi 976,0±131.8 pg/ml iken dişi fetüs taşıyan ineklerin ortalama AMH plazma düzeyi 742.8±115.0 pg/ml olarak tespit edilmiştir. Üçüncü grupta ise erkek ya da dişi fetüs taşıyan ineklerin uterus, kotiledon ve koryoallontoik membranlardaki AMHR2 RNA ekpresyonu incelenmiş ve ekspresyonlar açısından anlamlı fark elde edilememiştir. Sonuç olarak, gebeliğin ilk üçte birinde foliküler gelişimin baskılanmasından dolayı maternal AMH düzeylerinde hızlı bir düşüş gözlemlenmiştir. Gebelik ilerledikçe dişi fetüs taşıyan ineklerin AMH seviyeleri erkek fetüs taşıyanlara göre 10 kat daha düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak plasentanın AMH üretimine katkı sağlamadığı belirlenmiştir (Stojsin-Carter ve ark., 2017).

2.6.6. Sığırlarda Gebelikte Isı Stresine Maruz Kalmanın Buzağıların AMH Konsantrasyonları Üzerine Etkisi

Sığırlarda ovaryum rezervi fetal hayatta oluşmaktadır (Rüsse, 1983; Yang, & Fortune, 2008). Ovaryum rezervi genetik faktörlerden etkilenmesine rağmen (Walsh ve ark., 2014), diğer memelilerde olduğu gibi (Bernal, Vickers, Hampton, Poynton, & Sloboda, 2010; Barra, Cruz, Mayerhofer, Paredes, & Lara, 2014; Lea ve ark., 2006; Rae, 2001; 2002) sığırlarda da gebelik sırasındaki annenin maruz kaldığı çevresel faktörler de fetüsün ovaryum rezervinin oluşumu üzerinde etkili olmaktadır (Mossa ve ark., 2013).

Sığırlarda sıcaklık stresi fertiliteyi (Hansen, 2009; Wolfenson, Roth, & Meidan, 2000), oosit gelişimini ve erken embriyonik gelişimi olumsuz olarak etkilemektedir (Sakatani, Yamanaka, Kobayashi, & Takahashi, 2008; Zeron ve ark.., 2001). Ayrıca sıcaklık stresi fetal, plasental ağırlığı ve plasental hormon konsantrasyonunu

azaltmaktadır (Collier, Doelger, Head, Thatcher, & Wilcox, 1982; Sakatani ve ark., 2008; Tao, & Dahl, 2013).

İlk laktasyonlarında bulunan ve gebeliğin ikinci üçte birinde sıcaklık stresine maruz kalan ineklerden doğan buzağıların AMH düzeylerinin sıcaklık stresine maruz kalmayan ineklerden doğan buzağıların AMH düzeylerine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Farklı laktasyonlarda gebeliğin ikinci ve üçüncü üçte birinde sıcaklık stresine maruz kalan ineklerin buzağılarının AMH düzeylerinin sıcaklık stresine maruz kalmayan ineklerin buzağılarına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte gebeliğin ikinci üçte birinde sıcaklık stresine maruz kalan ineklerin buzağılarının ilk üçte birinde maruz kalanların buzağılarına göre AMH seviyelerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, doğum öncesi sıcaklık stresine maruz kalan ineklerden doğan buzağılarda AMH düzeylerinin düştüğü, fertilitenin azaldığı, sürüden çıkarma oranının arttığı, postpartum ilk tohumlamaya ve tekrar gebe kalmaya kadar geçen sürenin uzadığı belirlenmiştir. (Akbarinejad, Gharagozlou, & Vojgani, 2017). Sığır fetüslerinde primordiyal germ hücrelerinin göçü, bölünmesi ve oogonyumlara farklılaşması gebeliğin ilk üç ayında olmaktadır (Wrobel, & Süss, 1998). Primordiyal foliküllerin primer foliküllere dönüşümü gebeliğin ilk üç aylık dönemin sonundan başlayıp ikinci üç aylık dönemin başlarına kadar devam etmektedir (Nilsson, & Skinner, 2009; Rüsse, 1983; Yang, & Fortune, 2008). Bu yüzden prenatal sıcaklık stresinin AMH üzerine etkisi gebeliğin ikinci ve üçüncü üçte birinden itibaren gözüktüğünden dolayı gebeliğin ilk döneminde de şekillenen primordiyal germ hücreleri ve oogonyumlar annenin maruz kaldığı sıcaklık stresine daha dirençlidir. Oogonyumların mitotik kapasitesi sıcaklık stresine maruz kalmanın oluşturduğu zararı tolere edebilmektedir. Öte yandan gebeliğin ikinci ve üçüncü üç aylık döneminde sıcaklık stresine maruz kalanların AMH düzeylerinin düşük olması, prenatal sıcaklık stresinin buzağılarda primordiyal folikül havuzunda azalmaya neden olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Primordiyal folikül havuzunun azalmasını sağlayan herhangi bir faktör doğumda dişi buzağının ovaryum rezervinin düşük olmasına neden olmakta ve yaşam boyu bireyin fertilitesini olumsuz etkilemektedir (Jimenez-Krassel ve ark., 2015; Mossa, 2012, 2015; Ribeiro ve ark., 2014; Steckler, Wang, Bartol, Roy, & Padmanabhan, 2005).

2.6.7. Düvelerde Sürü Verim Ömrü ve AMH Konsantrasyonu Arasındaki İlişki

Sütçü düvelerde sürü verimli yaşam ömrünü belirlemek için kullanılan güvenli bir biyobelirteç keşfedilmemiştir. Ancak AMH'ın antral folikül sayısı, ovaryum rezervi ve dolayısıyla da fertilite ile pozitif ilişkili olduğu belirlenmiştir. Düve ve ineklerde aynı veya farklı seksüel siklus içerisinde seksüel siklusun dönemine bağlı olarak günden güne AMH konsantrasyonlarında minimum seviyede değişiklikler gözlenmektedir (Ireland, 2008, 2011; Rico, 2009, 2011). Yapılan bir çalışmada 11-15 aylık 281 Holstein düvede sürüden çıkarma oranı, uzun ömürlülük, ilk buzağılamadan sonra hayatta kalma oranı, süt verimi gibi parametrelerin AMH konsantrasyonu ile ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. Düvelere östrüsları senkronize etmek için 11 gün arayla prostaglandin uygulanmış ve AMH ölçümleri için kan örnekleri ikinci prostaglandin uygulamasından 96 saat sonra alınmıştır. AMH ölçümleri ticari insan ELISA kiti ile yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda 281 düvenin AMH seviyelerinin 6-440 pg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir. AMH konsantrasyonları Q1(6.2-30 pg/ml), Q2(30.1-56 pg/ml), Q3(56.1-85 pg/ml), Q4(85.7-432 pg/ml) olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. En düşük AMH konsantrasyonu olan Q1 ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, Q1 grubunun sürü verimli yaşam ömrünün daha kısa, ilk buzağılamadan sonra hayatta kalma oranının daha az, ilk laktasyondaki süt veriminin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm laktasyonlarda daha düşük gebelik oranına sahip oldukları ve sürüden çıkarılma oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler değerlendirildiğinde, AMH'ın sütçü ineklerin sürü verim ömrünü belirlemede yararlı bir fenotipik belirteç olabileceği kanısına varılmıştır (Jimenez-Krassel ve ark.,2015).

2.6.8. İneklerin Doğum Sayıları (Parite) ile Buzağıların Fertilitesi ve AMH Konsantrasyonu Arasındaki İlişki

Daha önce de belirtildiği gibi ruminantlarda ovaryumlar ve primordiyal foliküller fetal dönemde oluşmaktadır. Her dişi birey ovaryum rezervi olarak adlandırılan belirli sayıdaki primordiyal folikül ile doğmaktadır (Ireland ve ark., 2011; Findlay, Hutt, Hickey, & Anderson, 2015). Doğumdan sonra zamanla ovaryum rezervinin boyutu sürekli olarak azalmakta ve dişi bireyler yaşlandıkça ovaryum üzerinde sınırlı sayıda primordiyal folikül kalmaktadır. Bu durum ovaryum

aktivitesinin düzensiz hale gelmesine ve ovaryan yetmezliğe neden olmaktadır (Richardson, Guo, Fauser, & Macklon, 2014; Richardson ve ark., 2014; Findlay ve ark., 2015).

Genetik ve çevresel koşullar ovaryum rezervini etkileyen iki önemli faktördür (Mossa ve ark., 2013; Richardson ve ark., 2014; Walsh ve ark., 2014). Yavrunun gebelik sırasında intrauterin olarak beslenmesi ovaryumların ve primordiyal foliküllerin gelişmesini etkileyen önemli çevresel faktörlerden biridir (Richardson ve ark., 2014). Prenatal dönemde annenin rasyonunda yapılan kısıtlamayı takiben buzağıların ovaryum rezervinin azaldığı belirlenmiştir (Mossa ve ark., 2013). Ayrıca, gebelik sırasında oluşturulan maternal ısı stresinin dişi buzağıların ovaryum rezervi üzerine olumsuz etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. Bu durumun oluşması annenin iştah kaybı ya da plasental fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak intrauterin dönemde yavrunun ihtiyaç duyduğu besin maddelerinin yeterli düzeyde karşılanamaması ile ilişkilendirilmiştir (Akbarinejad et. al., 2017).

İneklerde doğum sayısının yavrunun fertilite ve ovaryum rezervinin bir biyolojik belirteci olan AMH konsantrasyonu üzerine etkilerini araştırmak amacı ile yapılan bir çalışmada multipar ineklerden doğan buzağıların, vücut ağırlıkları nullipar ve primipar ineklerin buzağılarına göre daha yüksek, doğumdan ilk tohumlanmaya kadar geçen sürenin ise daha kısa olduğu belirlenmiştir. Ayrıca multipar ineklerden doğan buzağıların ilk tohumlama gebelik oranı ve AMH konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu ve diğer yandan repeat breeder oranında nullipara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Primipar ineklerden doğan yavruların sürüden çıkarılma oranının ise diğer iki gruptan doğan yavrulara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, multipar ineklerden doğan yavruların reprodüktif performansları ve ovaryum rezerv kapasitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Akbarinejad, Gharagozlou, Vojgani, & Amirabadi, 2018).

2.6.9. İneklerde AMH ve Fertilite Arasındaki İlişki

İneklerde AMH ve fertilite arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada Holstein, Jersey ve Holstein-Jersey melezi olan inekler kullanılmış ve çalışma 100 günlük bir üreme sezonunda gerçekleştirilmiştir. İneklere senkronizasyon programları uygulanmış, suni tohumlama günü üreme sezonunun 0. günü olarak

değerlendirilmiştir. Suni tohumlamayı takiben 19-35. günler arasında kızgınlık gösterenler tekrar tohumlanmış ve gebe kalmayanlara 36-100. günler arasında doğal aşım yaptırılmıştır. Kan örnekleri ilk tohumlamadan 8 gün önce alınmıştır. Farklı ırklar açısından değerlendirildiğinde en yüksek AMH düzeyleri sırasıyla Jersey, Holstein X Jersey melezleri ve Holstein ineklerde tespit edilmiştir. İkinci ve üçüncü laktasyondaki ineklerin AMH düzeylerinin birinci ve dördüncü laktasyondaki ineklere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Çiftleşme sezonunun sonunda tohumlama öncesinde AMH konsantrasyonu yüksek olan grubun düşük olan gruba göre gebelik oranlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Gebeliğin 30. ve 65. günleri arasında AMH seviyesi düşük ineklerde gebelik kayıplarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, AMH konsantrasyonları ile doğum sonrası ilk senkronizasyon + zaman ayarlı veya doğal östrüs tespiti sonrası yapılan tohumlamalardan elde edilen gebeliklerin devamlılığı arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir (Riberio, Bisinotto, Lima, Greco, & W, 2014).

2.6.10. Sığırlarda Süperovulasyon Yanıtı ve Embriyo Sayısı ile AMH Konsantrasyonu Arasındaki İlişki

Embriyo transfer programlarında donörler arasında süperovulasyon yanıtı ve elde edilen kaliteli embriyo sayısı açısından bireysel farklılıklar görülmektedir. Bu farklılık büyük ölçüde süperovulasyon protokolü başlangıcındaki ovaryum folikül rezervinden kaynaklanmaktadır. Uterus yıkaması sonrası başlangıç folikül rezervi fazla olan ineklerden elde edilen transfer edilebilir embriyo sayısının daha yüksek olduğu görülmektedir (Abdel Aziz ve ark.., 2017). Ultrasonografi ile belirlenen antral folikül sayısının da süperovulasyon yanıtı (Ireland ve ark., 2007; Kawamata, 1994; Singh, Domınguez, Jaiswal, & Adams, 2004), fertilite (Erickson, 1976; Maurer, & Echternkamp, 1985; Mossa ve ark., 2012; Oliveira ve ark., 2002), uzun sürü ömrü (Burns ve ark., 2005) gibi parametreler ile pozitif ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ancak saha koşullarında ultrason cihazının görüntü kalitesine ve yapan kişinin tecrübesine bağlı olarak antral folikül sayısının belirlenmesinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir (Burns ve ark., 2005; Monniaux ve ark., 2010; Singh ve ark., 2004). İnsanlarda ve sığırlarda AMH, antral folikül sayısı belirlemede kullanılabilen güvenli bir endokrin belirteç olarak görülmektedir (Monniaux ve ark., 2012; Nelson, 2013; Rico ve ark., 2011).

Holstein ırkı ineklerde yapılan bir çalışmada inekler AMH konsantrasyonunun düzeyini temel alan belirli referans aralıklarına göre 4 grup oluşturacak şekilde (Q1-Q2-Q3-Q4) sınıflandırılmış, bu gruplardan elde edilen korpus luteum, toplam embriyo, toplam transfer edilebilir embriyo sayısı ve embriyo kaliteleri belirlenmiştir. Süperovulasyon yanıtı ve AMH konsantrasyonları arasında pozitif bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Özellikle AMH düzeyi yüksek olan gruptan elde edilen toplam transfer edilebilir embriyo sayısı ve toplam iyi kaliteli embriyo sayısı, AMH seviyesi düşük olan gruba göre iki kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, Holstein ırkı ineklerde süperovulasyon protokollerine başlamadan önce donörlerin AMH düzeylerini belirlemenin elde edilecek embriyo sayılarını artırmaya imkan tanıyacağı ve böylece embriyo üretim maliyetlerini azaltacağı ortaya konmuştur (Abdel Aziz ve ark., 2017).

Japanaese ırkı düvelerde yapılan bir çalışmada suni tohumlamadan 3 ay önce başlayarak gebelik boyunca ve postpartum 3 aya kadar olan dönemde her ay AMH ölçümleri yapılmıştır. Aynı hayvanlarda doğumdan sonra 3-4 ay aralar ile süperovulasyon protokolleri uygulanmış ve uterus yıkaması yapılmıştır. Yapılan çalışmada AMH düzeylerinin düveler arasında önemli farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık aynı bireyin farklı zaman dilimlerinde yapılan bireysel AMH ölçümleri dikkate alındığında bu ölçümler arasında istatistiki açıdan önemli farklılık olmadığı belirlenmiştir. Bu bulgular AMH konsantrasyonlarının zaman içinde stabil kaldığını ve bu durumun bireylere özgü olduğu gösterilmiştir. Holstein ırkı ineklerde olduğu gibi Japanaese ırkı düvelerde de AMH konsantrasyonları ile transfer edilebilir embriyo sayısı arasında pozitif ilişki olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Japanese ırkı düvelerde AMH konsantrasyonlarının belirlenmesi süperovulasyon yanıtı ve elde edilecek embriyo sayısını belirlemeye ve bunun yanı sıra donör ineklerin seçiliminin daha erken dönemde yapılabilmesine olanak tanıdığı ortaya konmuştur (Nabenishi, Kitahara, Takagi, Yamazaki, & Osawa, 2017).

Süperovulasyon yanıtı ve AMH konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelik olarak Holstein ırkı ineklerde yapılan diğer bir çalışmada da ineklerin AMH konsantrasyonlarını belirlemek ve tekrarlanabilirliği göstermek için kan örnekleri siklusun herhangi bir evresinde (40±3 DIM), proöstrüs (50±3 DIM) ve diöstrüs (57±3 DIM) olmak üzere üç ayrı aşamada alınmıştır. Bu üç farklı dönemde

ineklerin AMH düzeyleri arasında güçlü bir korelasyon belirlenmiştir. AMH düzeylerine göre inekler Q1 (0.01-82.6 pg/ml), Q2 (91.1-132.5 pg/ml), Q3 (135.3-183.8 pg/ml) ve Q4 (184.4-374.3 pg/ml) olacak şekilde dört gruba ayrılmıştır. AMH düzeyi yüksek olan grubun (Q4) düşük olan gruba (Q1) kıyasla süperovulasyon yanıtı ve embriyo sayısının (Korpus Luteum Sayısı: Q1= 12.0 ± 1.5; Q2 = 14.7 ± 2.0; Q3 = 17.2 ± 1.2; Q4= 25.6 ± 1.5) iki kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Souza ve ark., 2015).

Hirayama ve ark., (2017) yaptıkları bir çalışmada, Japanese Black ırkı 13 buzağıdan büyüme ile AMH konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi belirlemek ve daha ileri dönemlerde tek kez ölçülen AMH düzeyinin süperovulasyon cevabı ve elde edilen embriyo sayısı üzerindeki etkisini değerlendirmek için buzağılardan doğumlarını takip eden 1. aydan itibaren 13. aya kadar aylık olarak kan örnekleri alınmıştır. Buzağıların AMH düzeylerinde 2-7. aylar arasında önemli değişiklikler gözlenirken bu değişimin 8. aydan itibaren azaldığı ve yaklaşık 11. ayda sabitlendiği belirlenmiştir. Bununla birlikte 10-11. aylarda ölçülen AMH konsantrasyonu ile bu hayvanlara 13-18. aylarda süperovulasyon uygulandığında elde edilen toplam embriyo ve oosit sayısı arasında pozitif bir bağlantı bulunduğu yani konsantrasyonu yüksek olan düvelerde düşük olanlara göre daha fazla embriyo elde edildiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde 11. ayda yapılan AMH ölçümünün Japanese Black ırkı düvelerde erken yaşta donör hayvanların seçilimine olanak sağlayabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu çalışmada Japanese Black ırkı ineklerin AMH konsantrasyonu ve süperovulasyon yanıtı arasındaki ilişki de değerlendirilmiştir. Japannese Black ırkı 22 inekte AMH konsantrasyonları düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Süperovulasyon uygulamaları sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde AMH düzeyleri ile toplam oosit/embriyo sayısında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Japanese Black ırkı 10 ineğe yaklaşık iki ay arayla 6-10 kez süperovulasyon uygulandığında ise AMH konsantrasyonlarının üçüncü uygulamadan sonra önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Bütün bu bulgular değerlendirildiğinde Japanese Black ırkı inek ve düvelerde AMH konsantrasyonlarına bakılarak donörlerin hangisinden daha fazla sayıda embriyo elde edileceğinin önceden belirlenebileceği sonucuna varılmıştır.

Etçi ve sütçü sığırlardan in vitro olarak embriyo elde edilmesi giderek yaygınlaşmaktadır. Ovum pick-up (OPU) ve takiben in vitro ortamda embriyo üretimi üstün özelliklere sahip dişilerden çok sayıda transfer edilebilir embriyo üretimine olanak tanımaktadır (Faber, Molina, Ohlrichs, Vander-Zwaag, & Ferre, 2003). OPU uygulaması öncesi donörler AMH seviyelerine göre düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç grupa ayrıldığında, grupların AFS, oosit kalitesi, in vitro embriyo gelişimi ve embriyo sayıları göz önüne alındığında AMH seviyesi düşük olan gruba göre diğer iki grupta blastosit aşamasına ulaşan oosit oranının, AFS, kumulus oosit kompleksi ve embriyo sayısının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kore Hanwoo ırkı ineklerde AMH'un in vitro embriyo üretim kapasitesini ve transfer sonrası embriyo canlılığını belirlemede bir belirteç olarak kullanabileceği kanısına varılmıştır (Ghanem ve ark., 2016).

Bos taurus (Holstein) ve Bos indicus (Nelore) ırkı donörlerde in vitro embriyo üretimi ve AMH konsantrasyonları arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak elli dokuz Holstein (8-10 aylık yaşta pubertas öncesi 15 düve, 12-14 aylık yaşta 15 siklik düve, 14 laktasyondaki inek ve 15 kuruda inek) ve 34 Nelore (10-11 aylık yaşta pubertas öncesi 12 düve, 21-23 aylık yaşta pubertas öncesi 10 düve, 24-26 aylık yaşta 12 siklik düve) ırkı hayvan kullanılmıştır. Holstein ırkı donörlerin ortalama AMH düzeyleri 300 ± 20 pg/ml (8-10 aylık yaşta pubertas öncesi 15 düve=300 ± 40 pg/ml, 12-14 aylık yaşta 15 siklik düve=300 ± 30, 14 laktasyondaki inek=200 ± 30 pg/ml ve 15 kuruda inek=300 ± 20 pg/ml) iken Nelore ırkı donörlerin 1000 ± 20 pg/ml (10-11 aylık yaşta pubertas öncesi 12 düve=700 ± 10 pg/ml, 21-23 aylık yaşta pubertas öncesi 10 düve=1400 ± 30 pg/ml, 24-26 aylık yaşta 12 siklik düve=1400 ± 40 pg/ml) olarak tespit edilmiştir. Hayvanlar AMH konsantrasyonları düşük ve yüksek olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Yüksek AMH konsantrasyonuna sahip gruplardan aspire edilen folikül sayısı (Holstein: 20.9 ± 1.5 vs 13.6 ± 0.9, $P < 0.0001$; Nelore: 54.3 ± 6.1 vs 18.6 ± 2.1, $P < 0.0001$) ve kumulus-oosit kompleksi sayısı ise (Holstein: 17.3 ± 1.5 vs 9.0 ± 0.9, $P < 0.0001$; Nelore: 45.3 ± 6.4 vs 13.4 ± 1.7, $P < 0.0001$) olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte AMH konsantrasyonları yüksek olan gruplarda (Holstein: 3.0 ± 0.7; Nelore: 7.0 ± 1.7) düşük olan gruplara göre (Holstein: 1.2 ± 0.3, P=0.04; Nelore: 2.2 ± 0.5, P=0.007) her OPU uygulamasından sonra laboratuvarda in vitro fertilizasyon ile daha fazla sayıda embriyo elde edilmiştir.

Bos taurus (Holstein) ve Bos indicus (Nelore) donörlerden elde edilecek in vitro embriyo sayısını önceden tespitinde AMH'ın güvenle kullanılabilecek bir endokrin belirteç olduğu gösterilmiştir (Guerreiro ve ark., 2014).

2.6.11. Sığırlarda AMH' ın Kalıtım Derecesi

Etçi ve sütçü sığırlarda reprodüktif verim özelliklerinin kalıtım derecesi düşüktür (Berry, Wall, & Pryce, 2014). Bununla birlikte, biyobelirteçlerden yararlanılarak sütçü sığırlarda reprodüktif verim özelliklerinde daha hızlı bir genetik ilerleme sağlanabileceği belirtilmektedir (Nawaz ve ark., 2018). Genom boyu ilişki analizi (genoe-wide association study; GWAS) çalışmalarında AMH ile prostaglandin-endoperoksidaz sentaz (PTSGS1) arasında bağlantı olduğu ve PTSGS1'in AMH düzeyini artırarak süperovulasyon yanıtını etkilediği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise, yaşları 11-15 ay arasında değişen 2905 Holstein düvede AMH düzeyleri ölçülmüş ve bu hayvanlar SNP (tek nükleotit polimorfizmi) yönünden genotiplendirilmiştir. Daha sonra bu hayvanların son dört jenerasyona ait pedigri bilgileri toplanmıştır ve AMH'ın genomik kalıtım derecesi 0.36 ± 0.03 olarak bulunmuştur (Nawaz ve ark., 2018). Kanada'da Holstein ineklerinde yapılan bir çalışmada ise AMH'ın kalıtım derecesi 0.46 ± 0.31 olarak hesaplanmıştır (Gobikrushanth ve ark., 2018).

AMH'ın kalıtım derecesi dolaylı olarak antral folikül sayısının kalıtım derecesi üzerinden de tahmin edilebilmektedir. AMH ve AFS arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır ve kalıtım derecelerinin benzer olduğu kabul edilmektedir (Alvard ve ark., 2019). Yapılan bir çalışmada AFS'ın kalıtım derecesi Holstein ırkı sütçü sığır ve düvelerde sırasıyla 0.31 ± 0.14 ve 0.25 ± 0.13 olarak bulunmuştur (Walsh ve ark., 2014). AMH kalıtım derecesinin sütçü sığırlarda açık gün sayısı, buzağılama aralığı, hayatta kalma oranı, tohumlama sayısı, ilk buzağılama yaşı ve ilk laktasyondaki sağılan gün sayısı gibi reprodüktif parametrelerin kalıtım derecesinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. (Campos, Wilcox, Becerril, & Diz, 1994; Hermas, Young, & Rust, 1987; Jamrozik, Fetehi, Kistemaker, & Schaeffer, 2005). Bu durum AFS ve AMH yönünden yapılacak seleksiyonun diğer reprodüktif verim özelliklerine kıyasla daha güvenilir olacağını göstermektedir. Ancak bu iki özelliğin de çevresel faktörlerden de etkilendiği göz önünde bulundurulmalıdır. Tüm bu çalışmalardan elde

edilen veriler AMH ve fertilite arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu sayede yetiştiricilerin yüksek AMH düzeyine sahip hayvanları seçerek fertilite yönünden daha hızlı bir genetik ilerleme sağlayabileceği ifade edilmektedir (Alvard ve ark., 2020).

2.6.12. Yaş, Ovaryan Yaşlanma ve AMH

Kadınlarda ovaryan yaşlanmanın belirlenmesinde AMH önemli bir tanısal klinik parametre olarak kabul edilmektedir (Nelson et al. 2012). Antral folikül sayısı gibi AMH düzeylerinin de yaş ilerledikçe azaldığı gösterilmiştir (Hansen, Hodnett, Knowlton, & Craig, 2011). Farelerde ovaryan yaşlanma ile ilgili yapılan bir çalışmada serum AMH konsantrasyonlarındaki azalma ile primordiyal foliküllerin sayısındaki azalma arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Kevenaar ve ark., 2006). Ancak evcil hayvanlarda ovaryan yaşlanma ve AMH düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren araştırma bulunmamaktadır (Mossa ve ark., 2017). Primipar ve multipar Holstein ineklerde yapılan bir çalışmada AMH konsantrasyonları ile doğum sayısı arasında bir korelasyon tespit edilememiştir (Souza ve ark., 2015). Ancak başka bir çalışmada ise ikinci ve üçüncü laktasyondaki ineklerin AMH konsantrasyonlarının birinci ve dördüncü laktasyondakilere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Ribeiro ve ark., 2014). Bu bulgulara dayanılarak sığırlarda AMH konsantrasyonların ilk birkaç yıl içerisinde yaşa bağlı olarak azalmadığı tespit edilmiştir (Mossa ve ark., 2017).

2.6.13. Irk ve AMH

Farklı sığır ırklarında doğrudan AMH konsantrasyonu ve ovaryum rezerv kapasitesi arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma bulunmamaktadır. Ancak bazı çalışmalarda sütçü sığırların etçilere göre AMH konsantrasyonlarının daha düşük olduğu bildirilmektedir (Mossa ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada Şarole ve Angus ırkı etçi düvelerin AMH konsantrasyonlarının Holstein ve Jersey ırkı sütçü düvelere göre yüksek olduğu belirlenmiştir (Pfeiffer ve ark., 2014). Ayrıca Nelore ırkı etçi düvelerin (Bos indicus) plazma AMH konsantrasyonlarının Holstein düvelere (Bos taurus) göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Batista ve ark., 2014).

Sütçü ırklar arasında AMH düzeyleri arasında farklılık olup olmadığı tartışmalıdır (Pfeiffer ve ark., 2014). Holstein ve Jersey düvelerin AMH

konsantrasyonları karşılaştırdıklarında iki ırk arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Ancak daha fazla sayıda ineğin kullanıldığı bir çalışmada ise AMH düzeylerinin Jersey ırkı ineklerde en yüksek seviyede olduğu belirlenmiş ve Jerseyleri sırasıyla Holstein x Jersey ve Holstein ırkı inekler takip etmiştir (Riberio ve ark., 2014). Ayrıca Hindistan menşeili Gyr (Bos indicus) sütçü zebu düvelerin AMH konsantrasyonlarının Murrah manda ve Holstein düvelere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Baldrighi ve ark., 2014). Sonuç olarak AMH konsantrasyonlarının etçi ırklarda sütçülere göre daha yüksek bulunduğu belirtilmektedir (Mossa ve ark., 2017).

2.6.14. Granüloza Hücreleri ve AMH

Düşük AFS sayısına sahip olan sığırların süperovulasyon yanıtının da düşük olduğu bilinmektedir (Ireland ve ark., 2007). Bu yüzden yüksek AFS'li ineklere göre düşük AFS'ye sahip ineklerde FSH uygulamalarına granüloza hücrelerin yanıt verme kapasitesinin düşük olması beklenmektedir. Düşük AFS'li sığırlardan kronik olarak yüksek FSH salgılanmaktadır (Burns ve ark., 2005, Ireland ve ark., 2007, Jimenez-Krassel ve ark., 2009, Mossa ve ark., 2010b) ve bu durum granüloza hücrelerindeki FSH reseptörlerinin duyarsızlaşmasına neden olmaktadır (Amsterdam ve ark., 2002). In vitro olarak yapılan bir çalışmada yüksek AFS'li ile düşük AFS'ye sahip olan inekler arasında granüloza hücrelerinin FSH'ya olan yanıtın farklı olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. FSH uygulaması yapılmayan gruplarda granüloza hücrelerinden üretilen AMH düzeyleri yüksek AFS'li grupta düşük AFS'li olan gruba göre iki kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Doza bağımlı yapılan FSH uygulamalarında ise her iki grup değerlendirildiğinde yüksek AFS'li grupta AMH konsantrasyonu ve granüloza hücrelerinde AMH mRNA ekspresyonunun daha fazla olduğu belirtilmiştir (Scheetz, Folger, Smith, & Ireland, 2012). Bu bulgular düşük AFS'li gruptaki granüloza hücrelerinin FSH'ya olan yanıtın da düşük olduğunu göstermektedir. Düşük AFS'li sığırların granüloza hücrelerindeki FSH'ya olan yanıtın zayıf olması ve üretilen düşük AMH miktarı bu şekilde açıklanabilmektedir (Mossa ve ark., 2017).

2.6.15. Hastalıklar ve AMH

Evcil hayvanlarda ovaryum hastalıkları endokrin ve parakrin etkilerle ovaryum fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır (Umer ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda AMH'ın inekler (El-Sheikh Ali, 2013, 2019; Kitahara ve ark., 2012), kısraklar (Ball, Almeida, & Conley, 2013; Almeida ve ark., 2011), köpekler (Walter ve ark., 2018) ve kedilerde (Heaps ve ark., 2017) oluşan ovaryum tümörlerinin tanısında potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Ayrıca AMH sığır granüloza-teka hücre tümörlerin kendiliğinden iyilişme sürecinin takibinin yapılmasında da kullanılabileceği tespit edilmiştir (El-Sheikh, ve ark., 2015). Kadınlarda polikistik over sendromunda (PCOS) normale göre AMH düzeylerinin 3 kat yükseldiği (Bungum, Franssohn, Bungum, Humaidan, & Giwercman, 2013) tespit edilirken, sığırlarda ovaryum kistlerinde ve persistent foliküllerin oluşmasında AMH ekspresyon ve konsantrasyonlarında önemli derecede yükselme belirlenememiştir (Díaz ve ark., 2018). Bununla birlikte lüteal kistli köpeklerde AMH düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir (Walter ve ark., 2018). Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda AMH'ın birçok evcil hayvanda ovaryum tümörlerin tanısında kullanılabileceği ifade edilmektedir. Ovaryan kistlerin tanısındaki etkinliği tartışmalı olduğu için bununla ilgili daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir (Umer ve ark., 2019).

Gebelik sırasında kronik meme enfeksiyonu geçiren ineklerin dişi buzağılarında enfeksiyonun ovaryum rezervi üzerine etkisi değerlendirilmiştir (Mossa ve ark., 2019). Kronik meme bezi enfeksiyonunun bir göstergesi olan sütte yüksek sayıda somatik hücre sayısına (SHS) sahip ineklerden (Caraviello, Weigel, Shook, & Ruegg, 2005) AMH konsantrasyonları düşük buzağılar doğmuştur (Ireland ve ark., 2011). Bu bulgular değerlendiridiğinde, gebelik sırasında oluşan kronik meme enfeksiyonlarının, dişi buzağıların yumurtalık rezervini ve potansiyel olarak fertilitelerini etkileyebileceği düşünülmüştür (Mossa ve ark., 2019).

2.6.16. Beslenme ve AMH

Sığırlarda ovaryum rezervi fetal dönemde oluşmaktadır (Erickson, 1966a). Etçi sığırlarda yapılan bir çalışmada gebeliğin ilk üç ayında rasyonda kısıtlama yapılması dişi buzağıların ovaryum rezervini uzun süre etkilediği bildirilmektedir. Rasyonda

kısıtlama yapılan ineklerden doğan dişi buzağıların plazma AMH düzeylerinin (4 ay-1.8 yıl) ve AFS'nin (7 hafta-1.6 yıl) düştüğü ve FSH konsantrasyonlarının yükseldiği belirlenmiştir (Mossa ve ark., 2013). Farelerde yapılan bir çalışmada ise düşük protein içerikli diyetle beslenen annelerden doğan yavruların ovaryum rezervlerinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Winship, Gazzard, Cullen-McEwen, Bertram, & Hutt, 2018). Başka bir çalışmada gebe bırakılan fareler kontrol ve deney grubu olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Deney grubunda bulanan gebe farelere kontrol grubunda bulunan gebe farelere göre gebeliğin 10. gününden itibaren doğuma kadar rasyonlarında %50 oranında kalori kısıtlaması yapılmıştır. Deney grubunda kalori kısıtlaması yapılan annelerden doğan yavruların primordiyal ovaryum folikül rezervinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Böylece farelerde gebeliğin ikinci yarısından itibaren yapılan kalori kısıtlamasının yavruların reprodüktif yaşam ömrünü olumsuz bir şekilde etkileyeceği öngörülmüştür (Zanini ve ark., 2020).

2.7. D Vitamini

D3 vitamini veya diğer adıyla kolekalsiferol, güneşten gelen ultraviyole ışığın etkisi ile sığır dahil tüm memelilerin derisinde bulunan aynı zamanda provitamin D olarakta kabul edilen 7-dehidrokolesterolün dönüştürülmesiyle doğal olarak üretilen bir seko-steroiddir. Dalga boyu 295-300 nm arasında değişen güneş ışığına maruz kalan ineklerde, ultraviyolenin etkisi ile 7-dehidrokolesterolden endojen kolekalsiferol (Vitamin D3) sentezi şekillenmektedir (Holick 2008; Hymoller ve Jensen 2010; Jakobsen ve ark., 2015). Aynı zamanda D vitamini rasyonla D3 veya D2 vitamini şeklinde de alınabilmektedir (Horst ve ark., 1981; Sommerfeldt ve ark., 1983).

D2 ve D3 vitaminin aktif hale gelebilmesi için iki hidroksilasyon aşamasından geçmesi gerekmektedir. İlk aşamada, D vitamini karaciğerde 25- hidroksilaz enzimi ile 25-hidroksi vitamin D [25(OH)D/ kalsidiol] 'ye dönüştürülür. İkinci aşamada ise, 25(OH)D oluşumu gerçekleştikten sonra böbreklerin proksimal tubullerinde bulunan bir renal enzim olan 1α-hidroksilaz aracılığı ile Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihidroksi vitamin D [(1,25-$(OH)_2$D)/kalsitriol]'ye dönüştürülmektedir. Ayrıca 25(OH)D' nin hidroksilasyonu kemik, plasenta, prostat, keratinositler, makrofajlar, T lenfositleri, pankreas ve kolon epitel hücrelerinde de gerçekleşebilmektedir. Ancak ekstra-renal dokularda üretilen kalsitriol sadece lokal olarak etki etmektedir. Bununla

birlikte kandaki D vitamini metabolitleri D vitamini bağlayıcı proteinlere (VDBP) veya albüminlere bağlanarak dokulara taşınmaktadır. (Herrmann ve ark., 2017).

Sığırlarda D vitamini kalsiyum metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. D vitamini plazma kalsiyum homeostazının sürdürülebilmesi için kalsiyumun plazmaya girişini artırmaktadır. (Horst et al. 1994b). Biyolojik olarak aktif vitamin D metaboliti olan 1,25-$(OH)_2$D'in, bağırsaktaki vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanması ile hem kalsiyumun hem de fosforun bağırsaktan emilimi uyarılmaktadır. D vitamini eksikliği durumunda, diyetle alınan kalsiyumun bağırsaktan emilimi % 15 oranında azalmaktadır. Bu azalma kemik metabolizması ve nöromüsküler fonksiyonların sürdürülebilmesinde olumsuzluklara neden olmaktadır. Dolaşımdaki iyonize kalsiyum seviyesi düştükçe, paratiroid bezleri parathormon (PTH) üretimine başlamaktadır (Holick, 2006). PTH kemikten kalsiyum mobilizasyonunu ve böbreklerde 1,25-$(OH)_2$D üretiminin uyarılması ile kalsiyum düzeylerinin belirli bir aralıkta tutulması sağlanmaktadır (Holick, 2006; Dawson-Hughes, 2008). Ayrıca D vitamini dolaylı olarak osteoklast hücrelerinin olgunlaşmasını etkileyerek kemik metabolizmasında da rol oynamaktadır. Kalsiyumun bağırsaklardan emilimi düşük düzeylerde olduğunda, osteoblastlardaki VDR ile 1,25-$(OH)_2$D etkileşimi sonucu kemiklerden kalsiyum ve fosfor elde edilmektedir; 1,25-$(OH)_2$D, osteoblastın hücre yüzeyinde bulunan nükleer faktör-κB ligandının (RANKL) reseptör ekspresyonunu artırarak osteoklast maturasyonunu başlatmaktadır. Olgunlaşan osteoklastlar, kemik mineralizasyonu ve matriksini çözmek için hidroklorik asit ve kolajenazların salgısını uyarmaktadırlar (Holick, 2006; Shils, Shike, Ross, Caballero, & Cousins). Sonuç olarak, kalsiyum ve fosfor kemikten mobilize olarak ekstrasellüler boşlukta birikmektedir (Shils ve ark., 2005).

Vitamin D'in immun fonksiyonlar üzerinde de önemli etkileri bulunmaktadır. İmmun ve inflamatuar hücreler bölgesel olarak 25(OH)D' yi kalsitriole dönüştürmektedir (Colotta, Jansson, & Bonelli;2017). Kalsitriol immun hücrelerin farklışmasında, mitozisinde ve aktivasyonunda rol almaktadır (Nelson, Reinhardt, Lippolis, Sacco, & Nonnecke, 2012). Kalsitriol fagositozusu ve ayrıca makrofajların mikrobisidal ve tümörisidal fonksiyonlarının şekillenmesinde önemli rol oynayan H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) salgılanmasını artırmaktadır (Reinhardt, & Hustmyer, 1987). Ayrıca kalsitriolün, IL-12, IFN-γ, IL-6, IL-8, tümör nekroz faktörü-α, IL-17 gibi tip I

proinflamatuar sitokinlerin üretimini azalttığı ve IL-4, IL-5 ve IL-10 gibi tip II anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini artırdığı bildirilmektedir (Colotta ve ark., 2017).

Süt ineklerinde D2 ve D3 vitaminlerinin normal kan serumu konsantrasyonları 1 -2,5 ng/ml arasında değişmektedir (Goff, Horst, & Littledike, 1982; Horst ve ark., 1981; NRC 2001). Bu değer aralığı, serum 25(OH)D seviyelerine göre düşük bir düzeydir. Çünkü insanlarda ve hayvanlarda diyetle veya rasyonla alınan vitamin D3 normal koşullar altında hızlı bir şekilde 25(OH)D'ye dönüştürüldüğünden gerçek D vitamini düzeylerini yansıtmamaktadır. (Sommerfeldt ve ark., 1983). İnsanlarda haftalık 50,000 IU oral Vitamin D3 alındığı zaman serumdaki 25(OH)D konsantrasyonları haftada yaklaşık 5 ng / mL yükseldiği belirlenmiştir (Heaney, Recker, Grote, Horst, & Armas, 2010). Gebe ve laktasyonda olmayan ineklerde; $15x10^6$ IU vitamin D3'ün tek bir kez kas içi enjeksiyonu yapıldığında; serum vitamin D3 konsantrasyonlarının enjeksiyon sonrası 10. günde yaklaşık 35 ng/ml'ye çıkarak pik düzeylere ulaştığı görülmektedir. Aynı uygulamada enjeksiyondan 10 gün sonra serum vitamin D3 konsantrasyonlarının hızlı bir şekilde düştüğü ve 40. güne kadar normal kan serumu konsantrasyonlarına (1 -2,5 ng / mL) ulaştığı dikkat çekmektedir. Ancak 25(OH)D konsantrasyonlarının ise yaklaşık 40. günde 95 ng/ml'ye yükselerek pik düzeye ulaştığı ve uygulamadan sonraki 90 gün boyunca 75 ng/mL'nin üzerinde seyrettiği tespit edilmiştir (Littledike, & Horst, 1982). Bu durum iki önemli noktaya dikkat çekmektedir. Birincisi, 25(OH)D'nin vitamin D3'den çok daha uzun bir yarı ömre sahip olmasıdır. İkincisinin ise D vitamininin dokularda depolandığı ve Vitamin D seviyesini optimize etmek için yavaş bir şekilde salındığıdır (Clemens, Actams, Nolan, & Holick, 1982).

2.7.1. Vitamin D Düzeylerinin Belirlenmesi

Sığırlarda serum ve plazma Vitamin D düzeyleri hakkında bilgi sahibi olmanın en iyi yolu 25(OH)D konsantrasyonunun belirlenmesidir. Bunun nedeni olarak 25(OH)D' nin yarılanma ömrünün yaklaşık 21 gün gibi uzun bir süre alması ayrıca serum ve plazma düzeylerinde kısa süre içersinde çok az değişiklik şekillenmesi olarak gösterilmektedir. Bununla birlikte 25(OH)D düzeyleri, Vitamin D takviyelerinden ve güneş ışığına bağlı olarak mevsimsel değişimlerden etkilenebilmektedir. Serum ve plazma 25(OH)D düzeyleri immunoassay, radioimmunoassay ve LC-MS/MS gibi

farklı yöntemlerle belirlenebilmektedir (Herrmann ve ark., 2017; Nelson ve ark., 2016).

2.7.2. Sığırlarda Vitamin D Yetersizliği

Sığırlarda D vitamini eksikliği, osteomalazi, hipokalsemi ve hipofosfateminin yanı sıra ön ayaklarda bükülme, sert ve şiş eklemler, metakarpal ve metatarsal kemiklerin kalınlaşması nedeniyle hareket kısıtlamalarına yol açabilmektedir. D vitamini eksikliği olan ineklerin buzağılarında raşitizm belirtileri görüldüğü belirtilmektedir (Wallis 1938).

2.7.3. Vitamin D'nin Toksisitesi

Kalsinojenik bitkiler tüketildiğinde veya aşırı miktarda D vitamini takviyesi alındığında Vitamin D toksisitesi oluşabilmektedir. Ancak aşırı miktarda D vitamini takviyesinin alınmasına bağlı toksisite nadir olarak gözlenmektedir. Plazma 25(OH)D konsantrasyonun 400 ng/ml kadar yüksek bir düzeye ulaşması durumunda bile toksik etkinin gözlenmediği, bu sebeple güvenlik açısından geniş bir referans aralığına sahip olduğu belirtilmektedir (Celi, Williams, Engstrom, McGrath, & La Marta, 2018; Tomkins, Elliott, McGrath, & Schatz, 2020). NRC (National Research Council, 2001)' de ineklerin uzun süreli olarak günlük 2200 IU/kg canlı ağırlık, kısa süreli olarak ise 25000 IU D3/kg canlı ağırlık dozlarını tolere edebildiği belirtilmektedir. Jersey ırkı ileri gebe olan ineklerde beklenen doğum tarihinden 32 gün önce im olarak 15 milyon IU Vitamin D3 ve ilk enjeksiyondan 7 gün sonra tekrar 5 milyon IU Vitamin D3 uygulandığında toksikasyon gözlenmediği bildirilmiştir (Littledike, & Horst, 1982). Aynı makalede yukarıda belirttiğimiz çalışmalardan (Celi ve ark., 2018; Tomkins ve ark., 2020) farklı olarak serum 25(OH)D düzeylerinin 200 ng/ml üzerine çıkması durumunda toksik etki oluşabileceği bildirilmiştir. (Littledike, & Horst, 1982). En önemli kalsinojenik bitkiler *Solanum malacoxylon, Cestrum diurnum, Trisetum flavescens ve Nierembergia veitchii*'dir. Bu bitkiler kalsitriol glikozitleri hatta Vitamin D'nin aktif formunu içermektedir. Kalsitriol glikozitleri rumende mikrobiyal sindirimle aktif hale dönüşmektedir. Bu dönüşümle birlikte vücudun yumuşak dokularında kalsiyum ve kalsiyum tuzlarının yaygın olarak düğümcükler ve plaklar şeklinde birikmesi ile karakterize olan kalsinozisin semptomları, zayıflama, uzun süreli yatma, hareket bozuklukları, yüksek nabız ve solunum hızı gibi klinik

semptomlar ortaya çıkmaktadır. Postmortem muayenede ise endokardiyum, akciğerler, böbrekler, tendonlar ve ligamentlerde yoğun kalsifikasyonlar gözlenmektedir (Mello, 2003).

2.7.4. Vitamin D Takviyeleri ve Düzeyleri

Sağılan gün sayısı 0-300 gün arasında değişen ineklere günlük hayvan başına 20,000-50,000 IU Vitamin D3 rasyonla birlikte verildiğinde ineklerin kan serumu 25(OH)D düzeyleri 40-100 ng/ml arasında değiştiği, ortalamanın ise yaklaşık 68 ng/ml olduğu tespit edilmiştir. Erken laktasyondaki (0-30 DIM) ineklerin kan serumu 25(OH)D düzeyleri 57 ± 17 ng/ml iken orta ile geç (100-300 DIM) laktasyondaki ineklerin kan serumu 25(OH)D düzeyleri 71 ± 20 ng/ml olarak tespit edilmiştir. (Nelson ve ark., 2016). Bununla birlikte NRC (2001)' in tavsiyelerine göre hayvan başına 20,000 IU Vitamin D3 rasyonla birlikte verildiğinde ineklerin %22'sinin 25(OH)D kan serumu düzeylerinin 30 ng/ml'in altında olduğu, günlük 30,000 IU Vitamin D3 verildiğinde ise ineklerin % 95'nin serum 25(OH)D düzeylerinin 40 ng/ml üzerine çıktığı gözlenmiştir. Düvelere hayvan başına günlük 11,0000 - 12,000 IU Vitamin D3 verildiğinde serum 25(OH)D düzeyleri 69 ± 8 – 82 ±18 ng/ml olarak belirlenmiştir. Sütçü düvelere günlük kg canlı ağırlık başına 1200-1500 IU Vitamin D3 verilmesinin yeterli 25(OH)D düzeylerine ulaşmasını sağlayacağı bildirilmiştir. Yenidoğan buzağılarda ortalama serum 25(OH)D düzeyleri yaklaşık 15 ng/ml olarak belirlenmiştir. Buzağılara 6 hafta boyunca günlük 6,600 IU Vitamin D3 verildiğinde ortalama serum 25(OH)D düzeylerinin yaklaşık 60 ng/ml olduğu tespit edilmiştir (Nelson ve ark., 2016).

2.7.5. Vitamin D3'ün Foliküler Gelişmeye Etkisi

D vitamini hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptozis, yangı gibi birçok farklı hücresel süreçlerin üzerinde etkili olmaktadır (Verstuyf, Carmeliet, Bouillon, & Mathieu, 2010). Kadınlarda Vitamin D' nin fertilite açısından da önemli olduğu belirtilmektedir (Irani, & Merhi, 2014). Fertilitesi iyi olan kadınlarda Vitamin D düzeylerinin normal seviyelerde olduğu görülmektedir. Bunun yanında IVF uygulanan kadınlar değerlendirildiğinde kan serumu Vitamin D düzeyleri düşük olanlarda yüksek olanlara göre gebelik oranlarının da düşük olduğu belirtilmektedir (Ozkan ve ark., 2010; Paffoni ve ark., 2014). Gebe kalma problemi yaşayan polikistik overli

kadınlarda Vitamin D takviyelerinin kullanılması foliküler gelişmeyi, menstrual döngüyü düzenlediği ve polikistik overli kadınlarda gebelik oranlarını artırdığı belirtilmektedir (Firouzabadi, Aflatoonian, Modarresi, Sekhavat, & Mohammad, 2012; Pal ve ark., 2016; Thys-Jacobs, Donovan, Papadopoulos, Sarrel, & Bilezikian, 1999). Vitamin D3'ün maymunlarda folikül gelişimi üzerine etkilerini belirlemek amacına yönelik olarak planlanan ve in-vitro uygulamaların kullanıldığı bir çalışmada; kontrol, düşük doz Vitamin D3 ve yüksek doz Vitamin D3 olmak üzere üç grup oluşturulmuştur. Foliküllerin gelişimi, hayatta kalması ve oosit çapı değerlendirilmiştir. Bunun yanında kültür ortamında progesteron, östrojen, androstenedion ve AMH konsantrasyonları ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda kontrol grubuna göre düşük doz Vitamin D3 uygulanan grupta preantral foliküllerin hayatta kalma oranının %66 daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kontrol gruba kıyasla yüksek doz Vitamin D3 uygulanan grupta antral foliküllerin büyüme oranı ve folikül çapının arttığı belirlenmiştir. Vitamin D3 uygulanan gruplar arasında progesteron, östrojen, androstenedion konsantrasyonu açısından bir farklılık bulunamazken, kontrol grubu ile kıyaslandığında düşük doz Vitamin D3 uygulanan grupta AMH konsantrasyonunun %36 oranında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Vitamin D3 uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla oosit çapının daha büyük olduğu belirlenmiştir (Xu, Hennebold, & Seifer, 2016).

Maymunlarda yapılan in vitro başka bir çalışmada Vitamin D3' ün preantral ve antral folikül gelişimi üzerine etkileri, bunun yanı sıra ovaryumlarda vitamin D sentezi için gerekli olan enzimlerin ekspresyonu araştırılmıştır. Vitamin D3 uygulamasının 1α-hidroksilaz ve 25-hidroksilaz enzimlerinin ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca Vitamin D3 uygulaması preantral foliküllerin hayatta kalma oranını, antral foliküllerde ise hem büyüme hem de hayatta kalma oranını artırdığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında Vitamin D3 uygulaması oosit maturasyonunu, östrojen ve AMH üretimini de artırdığı tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2018).

Keçilerde farklı dozlarda uygulanan Vitamin D3'ün in vitro granüloza hücreleri üzerinde proliferatif bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Yapılan çalışmada granüloza hücrelerinin Vitamin D resöptörü bulundurduğu ve folikül çapı ile orantılı olarak Vitamin D reseptör ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Atretik foliküllerde sağlıklı foliküllere göre Vitamin D reseptörlerinin daha az oranda eksprese

edildiği tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre Vitamin D3 (10nM) uygulanan grupta granüloza hücrelerinde Vitamin D reseptör ekspresyonunun önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak Vitamin D3'ün keçi granüloza hücrelerinde proliferasyon ve apoptozisi düzenleyerek foliküler gelişmede etkili olabileceği ifade edilmiştir (Yao ve ark., 2020).

2.7.6. İnsanlarda Vitamin D ile AMH Arasındaki İlişki

Primer ovaryan yetersizliği, kırk yaşından küçük kadınlarda ovaryum faaliyetlerinde aksaklıklara yol açan bir sendrom olarak tanımlanmaktadır. Primer ovaryan yetersizliği olan kadınlarda adet düzensizlikleri görülmektedir. Bu sendrom kadınlarda infertilite sebebi olarak kabul edilmekte ve prevalansının yaklaşık % 1 civarında olduğu belirtilmektedir. Primer ovaryan yetersizliği sendromu olan kadınlarda kan serumu 25(OH)D ve AMH konsantrasyonları arasında pozitif, 25(OH)D ve FSH arasındaki ise negatif bir korelasyon olduğu ifade edilmektedir. Yapılan çalışmada primer ovaryan yetersizliği sendromu olan kadınlarda düşük kan serum 25(OH)D düzeyine sahip olanların AMH düzeylerinin düşük olduğu, kan serum 25(OH)D düzeyi yüksek olan kadınların AMH düzeylerinin de yüksek olduğu tespit edilmiştir. Primer ovaryan yetersizliği sendromu olan düşük 25(OH)D ve AMH düzeyleri olan kadınların FSH düzeylerinin ise yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak düşük 25(OH)D düzeylerinin ovaryum rezervinin azalmasına neden olabileceği vurgulanmaktadır (Xu ve ark., 2019).

Otuz ile kırk dokuz yaşlı menopoz öncesi kadınlarda 25(OH)D ve FSH arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, kan plazması 25(OH)D konsantrasyonları belirlenirken, FSH konsantrasyonları menstrual döngünün ilk 5 gününde toplanan idrar örneklerinin ölçümü sonucu elde edilmiştir. Kan plazması ortalama 25(OH)D düzeyleri 12 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya katılan kadınların %75' inin kan plazması 25(OH)D düzeylerinin 20 ng/ml' in altında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen ölçümler sonucunda FSH ile 25(OH)D konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Jukic, Steiner, & Baird, 2015). FSH konsantrasyonu ile AMH konsantrasyonu arasında da negatif bir korelasyon olduğu bilinmektedir (Steiner ve ark., 2011). Bundan dolayı düşük 25(OH)D

düzeylerinin AMH konsantrayonlarında azalmaya neden olacabileceği konusunda araştırmalar yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Jukic ve ark., 2014).

Honda ve ark., (2016) 21-39 yaşlı kadınlarda serum 25(OH)D ve AMH konsantrasyonu arasındaki ilişki araştırmışlar ve ortalama serum 25(OH)D konsantrasyonunu 25.2 ± 8.4 ng/ml, ortalama AMH konsantrasyonunu ise 4.9 ± 2.4 ng/ml olarak belirlemişlerdir. Serum AMH düzeylerinin, vitamin D düzeyleri 30 ng/ml olan kadınlarda önemli derecede düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda düşük AMH düzeylerinin vitamin D yetersizliğinden kaynaklanabileceği kanısına varılmıştır.

İnsanlarda 25(OH)D ve AMH arasındaki ilişkiyi değerlendirmeye yönelik olarak yapılan bir çalışmaya erkekler, kadınlar ve 5-6 yaşlı erkek çocuklar katılmıştır. Kadınlar günlük olarak plasebo veya ergokalsiferol ya da kolekalsiferol içeren prepatları altı ay süreyle kullanmışlardır. Kış ayında Vitamin D kullanmayan kadınların AMH düzeylerinin %18 oranında azaldığı belirlenmiştir. Çalışmaya katılan kadınlarda ve erkeklerde 25(OH)D ile AMH arasında pozitif ilişki tespit edilirken 5-6 yaşlı erkek çocuklarda pozitif ilişki bulunamamıştır. Sonuç olarak D vitaminin, yetişkinlerde AMH üretimi için düzenleyici bir etkiye sahip olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca D vitamini eksikliğinin AMH seviyelerinde düşüklüğe neden olabileceğinden; AMH düzeylerine bağlı yapılan değerlendirmelerde 25(OH)D düzeylerinin de göz önünde bulundurulması gerektiği vurgulanmıştır (Dennis ve ark.., 2012).

Vitamin D yetersizliğinin kadınlarda fertiliteyi etkileyen bir faktör olduğu ifade edilmektedir (Luk, Torrealday, Neal Perry, & Pal, 2012). Fertilite düşüklüğü üzerinde etkili olan birçok faktör bulunmaktadır. AMH düzeylerinin azalması da bu etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Irani, & Merhi, 2014). AMH dolaşıma salınmakla beraber gonadlar üzerinde de parakrin bir etkiye sahiptir (McLennan, & Pankhurst, 2015). AMH erkeklerde cinsiyet farklılaşmasından sorumludur. Bununla beraber AMH düzeyleri erkeklerde doğumdan itibaren hızla yükselirken ergenliğe doğru azalmakta, kadınlarda ise yeni doğanlarda en düşük düzeyde olup ergenlik öncesindöneme kadar artışlar göstermektedir (Lee ve ark., 1996; MacLaughlin, & Donahae2004). AMH foliküllerin FSH'ya olan duyarlılığını azaltmakta ve AMH

düzeylerinin düşük olması foliküllerin FSH' ya olan duyarlılığını artırarak ovaryum rezervin hızla tüketilmesine yol açmaktadır. Vitamin D in-vitro yapılan çalışmalarda AMH seviyelerini, doğrudan AMH'ı artırarak ya da dolaylı olarak ovaryum folikül kültürlerinde AMH sinyalini ve granüloza hücre sayısını düzenleyerek etkilediği belirtilmektedir (Merhi, Doswell, Krebs, & Cipolla, 2014; Malloy, Peng, Wang, & Feldman, 2014). Genler 5' ucuna yakın kısımda promotor bölge adı verilen ve genlerin ekspresyon düzeyleri ile ilşkili olan özel DNA dizilerine sahiptir. Promotor bölgeler genlerin bazal seviyede aktivasyonu için gereklidir. Ayrıca promotor bölgelerin içinde de bulunan bazı spesifik DNA bölgeleri genlerin ekspresyonun düzenlemesine katkı sağlamaktadır. Bu bağlamda AMH geni promotor bölgesinde AMH geninin ekspresyonunu etkileyen VDRE(Vitamin D Yanıt Elemanı) bölgesi bulunmaktadır. Bu bölge AMH'ın ekspresyonunun Vitamin D tarafından düzenlemesine olanak tanımaktadır. Yapılan bir çalışmada Vitamin D3'ün VDRE etkileyerek AMH ekspresyonunu direkt olarak artırdığı bildirilmiştir. Oral Vitamin D3 uygulamasının 25(OH)D ve AMH seviyeleri üzerine etkileri araştırılmak amacıyla in vivo olarak yapılan bir çalışmada 19-25 yaşlı genç kadınlardan oluşan bir gruba oral Vitamin D3 tablet diğer gruba ise plasebo tablet verilmiştir. Çalışmaya menstrual dönemin başlangıcında başlanmış olup kan örnekleri uygulama öncesi (0.gün) ve uygulamayı takiben 1., 3. ve 7. günlerde alınmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde bir kez oral yolla kullanılan Vitamin D3'ün plasebo grubuna göre AMH ve 25(OH)D düzeylerini istatistiki açıdan önemli olacak düzeyde artırdığı belirlenmiştir (Dennis, Houghton, Pankhurst, Harper, & McLennan, 2017).

Vitamin D eksikliği dünya çapında yaygın bir şekilde gözlenen önemli bir problemdir (Holick, & Chen, 2008; Pagliardini, Vigano, Molgora, & 2015). Vit D eksikliğinin ana sebebi insanların yeterince güneş ışığı alamamalarıdır (Holick, & Chen, 2008). İnsanlarda kan serumu Vitamin D düzeylerinin 30 ng/ml seviyesinde olması normal olarak kabul edilmektedir. Bunun için yeterli güneş ışığı almayanların günlük takviye olarak 800-1000 IU Vitamin D alması gerekmektedir (Dawson-Hughes, 2004; Holick, Siris, & Binkley, 2005; Holick, & Chen, 2008). Vitamin D' nin üreme üzerindeki etkisini göstermek amacıyla Vitamin D enjeksiyonu uygulan dişi ratlarda uygulamanın uterusun ağırlığını artırdığı ve erken gebelikte endometriyumun daha fazla kalınlaşmasına neden olduğu ortaya konulmuştur (Halhali, Acker, &

Garabedian, 1991). Kadınlarda ise Vitamin D düzeylerinin menstrüal döngüyü ve ovaryum fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir. Vitamin D düzeylerinin düşük olması menstrüal döngüde düzensizliklere ve uterusta miyom oluşma riskini artırdığı belirtilmiştir (Baird, Hill, & Schectman, 2013; Jukic, Steiner, & Baird, 2015; Jukic, Upson, & Harmon, 2016). Ayrıca infertil kadınların Vitamin D düzeylerinin düşük olduğu tespit edilmiştir (Pagliardini ve ark., 2015). 25(OH)D uygulamalarının AMH düzeyleri üzerine etkisini anlamak için Vitamin D ve AMH düzeyleri düşük olan 30 infertil kadına haftalık 50.000 IU olmak üzere 3 ay süre ile oral Vitamin D uygulanmıştır. Tedavi sonrası 25(OH)D ve AMH düzeylerinin tedavi öncesine göre önemli ölçüde yükseldiği belirlenmiştir (Naderi, Kashanian, Chenari, & Sheikhansari, 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali, Barındırma ve Besleme Koşulları

Bursa Uludağ Üniversitesi Etik Kurulunun 28.01.2020 tarihli toplantısı ve 2020-02/11 nolu kararı ile yapılması uygun görülen bu çalışma Bursa ili Yenişehir ilçesinde, hastalıklardan ari sertifikası bulunan bir sütçü işletmede 01.02.2020-28.02.2020 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışmada herhangi bir sağlık problemi olmayan en az bir kez kızgınlık göstermiş 11-13 aylık ve 288-341 kg arasında olan (Ortalama 319 kg) 60 adet Siyah Alaca sütçü düve kullanıldı. Düveler işletmenin normal bakım koşulları olan; üzeri kapalı, tabanı toprak, serbest dolaşım alanı içeren bölmelerde barındırıldı. İşletmede üstü açık gezinme alanları bulunmadığından dolayı, çalışma süresince hayvanların güneş ışığı ile direkt teması olmamıştır. İşletmedeki düvelerin rasyonu National Research Council (NRC) programı ile hazırlanmış olup, besleme günde iki kez (su, ad libitum) gerçekleştirilmekteydi. Düvelere günlük rasyonları haricinde içerisinde vitamin veya daha başka ek besin maddeleri içeren yem katkı maddeleri kullanılmamaktaydı.

3.2. Grupların Oluşturulması ve Yapılan Uygulamalar

Düveler (n:60) her grupta 20 baş hayvan bulunacak şekilde rastgele üç gruba ayrıldı. Birinci gruptaki (Grup 1; Oral Vitamin D3) düvelere toplam olarak 5 milyon IU Vitamin D3 içeren solüsyon (Vitsol D3, 1 L lik oral çözelti, Ankavet) oral yolla tek doz halinde verildi. İkinci gruptaki (Grup 2; IM Vitamin D3) düvelere tek doz 5 milyon IU D3 vitamini (Provet-D3 Vitamin Enjeksiyonluk Çözelti) kas içi yolla 5 ml uygulandı. Üçüncü gruptaki (Grup 3; Kontrol) düveler kontrol grubu olup, Vitamin D3 uygulaması yapılmadı.

3.3. Kan Örneklerinin Toplanması

Tüm düvelerin kuyruk venasından (vena coccygea) Vitamin D3 uygulamasına öncesinde (0. gün) ve uygulamaları takip eden 7., 14., ve 28. Günlerde 8 ml'lik iki ayrı serum tüpüne, yaklaşık 16 ml antikoagülansız kan alındı. Kanlar 3000 devirde 20

dakika santrifüj edildikten sonra, serumlar 1,5 ml'lik eppendorf tüplerinde -20°C'de muhafaza edildi. 25(OH)D ölçümü için ayrılan serum örnekleri güneş ışığından korumak amacıyla alüminyum folyoya sarılarak muhafaza edildi.

3.4. Hormon Analizleri

3.4.1. AMH Analizi

AMH Beckman Coulter II ELISA testine göre standardize edilen elektrokemilüminesans immünolojik test yöntemiyle Elecsys AMH kiti ile, tam otomatik immünolojik test analizöründe (Roche, cobas e 601, Almanya) (Resim 1) ölçüldü (Deeks ED., 2015; Jacobs et. al 2018; Ireland ve ark., 2008).



Resim1: AMH ölçümlerinde kullanılan cihaz (Roche, cobas e 601,Almanya).

3.4.2. 25(OH)D Analizi

Bu çalışmada 25(OH)D, LC-MS/MS (Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi) yöntemine göre standartize edilen, kemilüminesan immunolojik test yöntemiyle, Siemens ADVIA Centaur Xp Vitamin D kiti ile ölçüldü (Sempos CT ve ark., 2012; Thientpont LM ve ark., 2012; Holick, 2009) (Resim2).



Resim2: 25(OH)D ölçümlerinde kullanılan cihaz (Siemens, Advia Centaur XP,USA).

3.4.3. İstatistiki Değerlendirme

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılımı sağlaması durumunda parametrik testler, kullanıldı ve betimleyici istatistikler ortalama ± standart sapma olarak, verilerin normal dağılımı sağlanmaması durumunda ise non-parametrik testler kullanıldı ve betimleyici istatistikler medyan (min:max) olarak verildi. Parametrik testler uygulanması durumunda grafikler %95 güven sınırlarına göre error bar, non-parametrik testler uygulanması durumunda ise box-plot grafiği olarak oluşturulmuştur.

Gruplar içerisinde uygulama öncesi ile (0. gün) izleyen günlerin (7., 14. ve 28. günler) karşılaştırılmasında eşleştirilmiş t testi veya Wilcoxon testi kullanıldı.

Farklı günlerde yapılan ölçümlere göre gruplar arasında değişimlerin incelenmesinde, 0. güne göre 7., 14. ve 28. günlerdeki değişimler yüzde değişim [((ti-t0)/t0)*100] hesaplanarak, değerlendirmeler yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar için varyans analizi veya Kruskall Wallis testi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı farklılıkların bulunması durumunda ikili karşılaştırmalarda Bonferroni veya Dunn-Bonferroni testi tercih edildi.

İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak ($p<0,05$) alındı. İstatistiksel analizler için SPSS v22 paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Yaş ile Serum AMH Düzeyleri Arasındaki İlişki

Çalışmada kullanılan hayvanların yaşı ile serum AMH düzeyleri arasındaki istatistiki ilişki Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo-1: Uygulama öncesi (0.gün) serum AMH düzeyleri ile yaş arasındaki ilişki

Gruplar	(p) r
1,2,3 (n=60)	0,973 -0,004

Uygulama öncesi (0.gün) serum AMH düzeyleri ile yaş arasında istatistiki açıdan herhangi bir ilişki bulunamıştır. Yaşın AMH düzeyleri üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir.

4.2. Canlı Ağırlık ile Serum AMH Düzeyleri Arasındaki İlişki

Çalışmada kullanılan hayvanların canlı ağırlıkları ile serum AMH düzeyleri arasındaki ilişki Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo-2: Uygulama öncesi (0.gün) serumu AMH düzeyleri ile canlı ağırlık arasındaki ilişki

Gruplar	(p) r
1,2,3 (n=60)	(0,381) -0,115

Çalışmadaki düvelerin uygulama öncesi (0.gün) serum AMH düzeyleri ile canlı ağırlıkları arasında istatistiki olarak ilişki tespit edilememiştir. Canlı ağırlığın AMH düzeyleri üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir.

4.3. Oral Vitamin D3 Uygulamalarının Serum 25(OH)D Düzeylerine Etkisi

Çalışmada uygulama öncesi (0. Gün) ve oral vitamin D3 uygulamasının izleyen 7.,14., ve 28. günlerde Grup1 (Oral) ve Grup3 (Kontrol)'deki düvelerin serum 25(OH)D konsantrasyonları Tablo 3' de sunulmuştur.

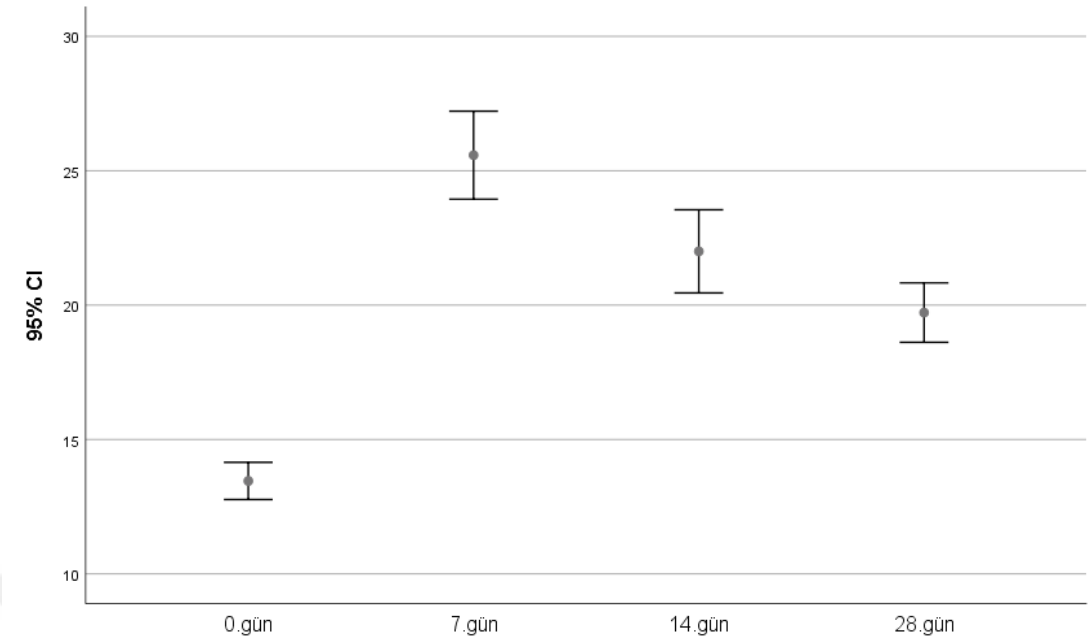
Tablo-3: Grup 1 (Oral) ve kontrol grubunda uygulamayı izleyen farklı günlerdeki serum 25(OH)D düzeylerinin grupların kendi içinde 0. güne göre karşılaştırılması

Grup	**0. gün**	**7.gün**	**14.gün**	**28.gün**	**P değeri**
Grup 1(Oral) (ng/ml)	13,45±1,47	25,57±3,49	22,00±3,30	19,72±2,35	**<0,001 (0-7. gün)** **<0,001 (0-14. gün)** **<0,001 (0-28. gün)**
Grup 3(Kontrol) (ng/ml)	15,02±2,15	13,76±2,48	14,69±1,75	14,45±1,87	**<0,016 (0-7. gün)** <0,498 (0-14. gün**)** <0,195 (0-28. gün)

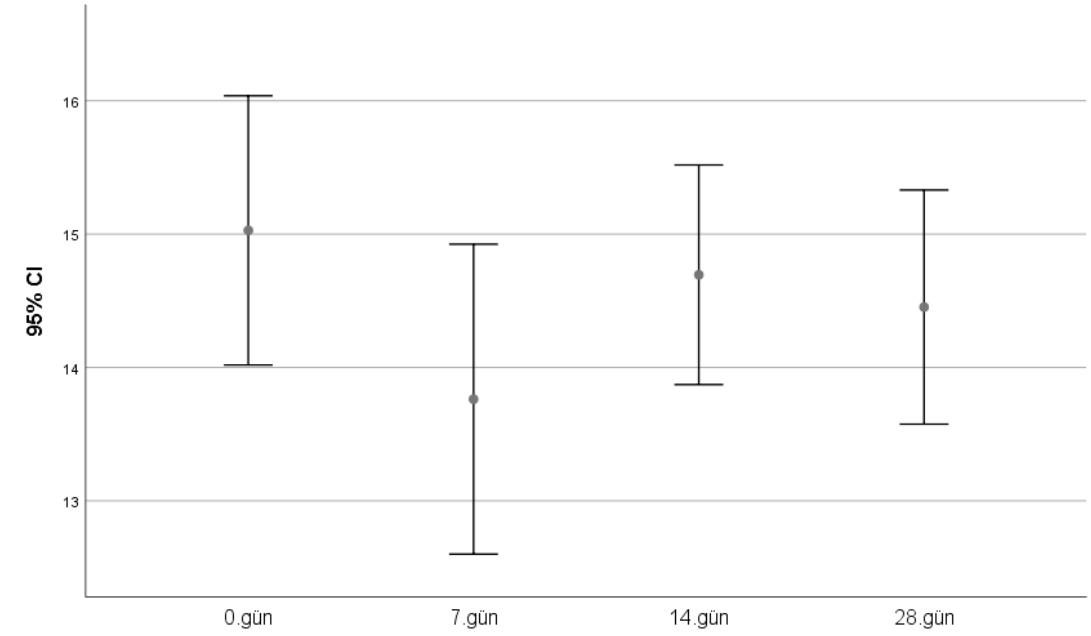
p anlamlılık değerleri uygulamayı izleyen gün sıralamasına göre verilmiştir.

Grup 1'de 0. gün kan serumu 25(OH)D değerleri ile oral vitamin D3 uygulamasını takip eden 7., 14. ve 28. günlerde serum 25(OH)D değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Serum 25(OH)D konsantrasyonunun 0. güne göre 7., 14., ve 28. günlerde istatistiki açıdan önemli olacak düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Serum 25(OH)D düzeyinin oral vitamin D3 uygulaması sonrası 7. günde pik düzeye ulaştığı 14. ve 28. günlerde azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 3, Şekil 1) .

Grup 3'de (Kontrol) 0. gün serum 25(OH)D değerleri ile 7.gün, 14.gün ve 28.gün serum değerleri karşılaştırıldığında, 7. gündeki değerin diğer günlerdeki 25(OH)D değerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Uygulama öncesine göre 7. gün değeri daha düşük olup 14. gün ve 28. günlerde istatistiki bir farklılık bulunmadığı belirlenmiştir (Tablo 3, Şekil 2).



Şekil-1: Grup 1 (Oral) ‘de uygulama öncesi 0. güne göre 25(OH)D düzeylerinin istatiksel karşılaştırılması



Şekil-2: Grup 3 (Kontrol) ‘de uygulama öncesi 0. güne göre 25(OH)D düzeylerinin istatiksel karşılaştırılması

4.4. Kas İçi Vitamin D3 Uygulamalarının Serum 25(OH)D Düzeylerine Etkisi

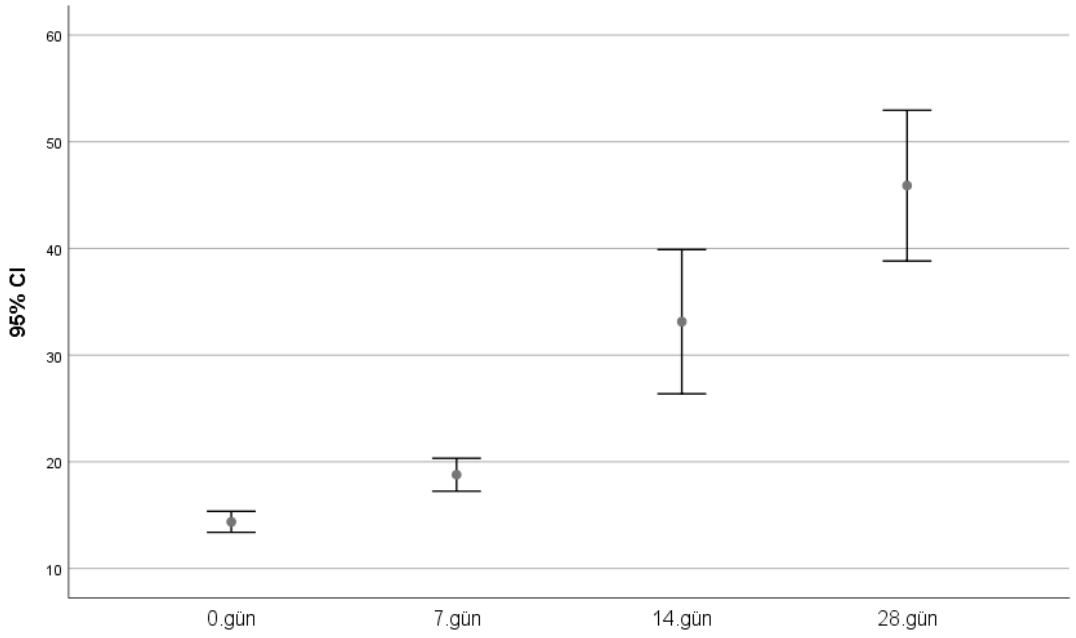
Sunulan bu çalışmada uygulama öncesi (0. gün) ve kas içi (im) vitamin D3 uygulamasını izleyen 7., 14., ve 28. günlerdeki Grup2 (IM) ve Grup3 (Kontrol)’deki düvelerin serum 25(OH)D konsantrasyonları Tablo 4’de sunulmuştur.

Tablo-4: Grup 2 ve 3'de uygulamayı izleyen farklı günlerdeki serum 25(OH)D düzeylerinin grupların kendi içinde 0. güne göre karşılaştırılması

Grup	**0. gün**	**7.gün**	**14.gün**	**28.gün**	**P değeri**
Grup 2 (IM) (ng/ml)	14,16 (11,25:20,21)	17,98 (14,70:29,03)	28,71 (19,53:88,06)	43,88 (32,19:103,13)	**<0,001 (0-7.gün)** **<0,001 (0-14. gün)** **<0,001 (0-28. gün)**
Grup 3 (Kontrol) (ng/ml)	15,02±2,15	13,76±2,48	14,69±1,75	14,45±1,87	**<0,016 (0-7. gün)** <0,498 (0-14. gün) <0,195 (0-28. gün)

p anlamlılık değerleri uygulamayı izleyen gün sıralamasına göre verilmiştir.

Grup 2'de 0. gündeki 25(OH)D değerleri ile 7.gün, 14.gün ve 28.günlerdeki serum 25(OH)D düzeyleri karşılaştırıldığında, istatistiki açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur. Sıfırıncı günde belirlenen 25(OH)D konsantrasyonlarına göre 7., 14., ve 28. günlerdeki konsantrasyonların istatistiki açıdan önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kas içi Vitamin D3 uygulaması sonrası serum 25(OH)D düzeylerinin uygulamayı izleyen 7. gün, 14. ve 28. günlerde sürekli olarak yükseldiği belirlenmiştir.(Tablo 4, Şekil 3)

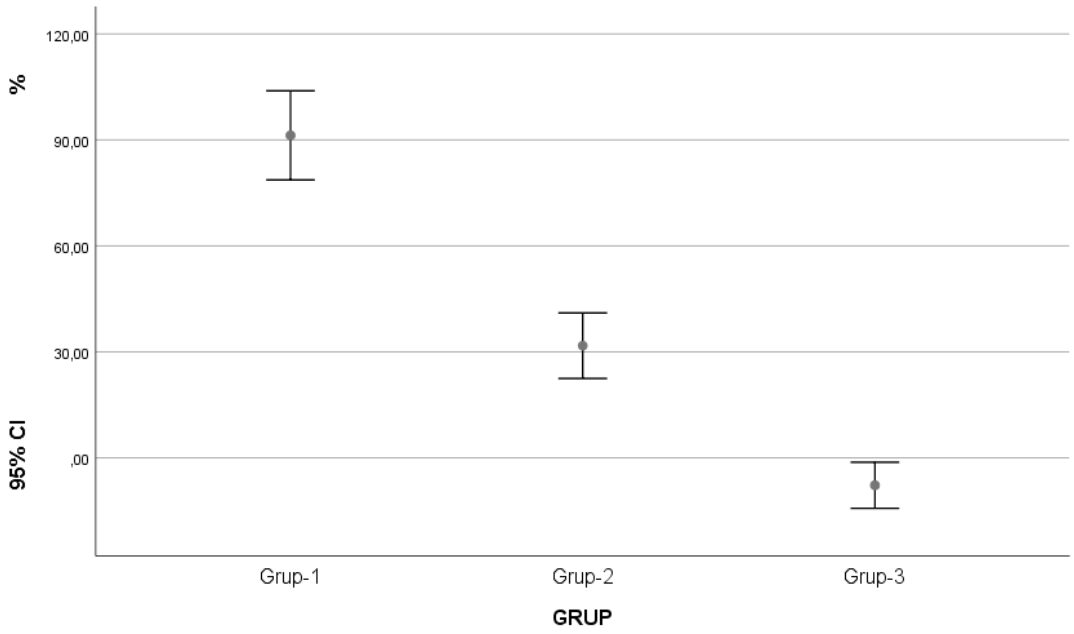


Şekil-3: Grup 2 (Kas içi)'deki 0. Güne göre 25(OH)D düzeylerinin istatiksel karşılaştırılması

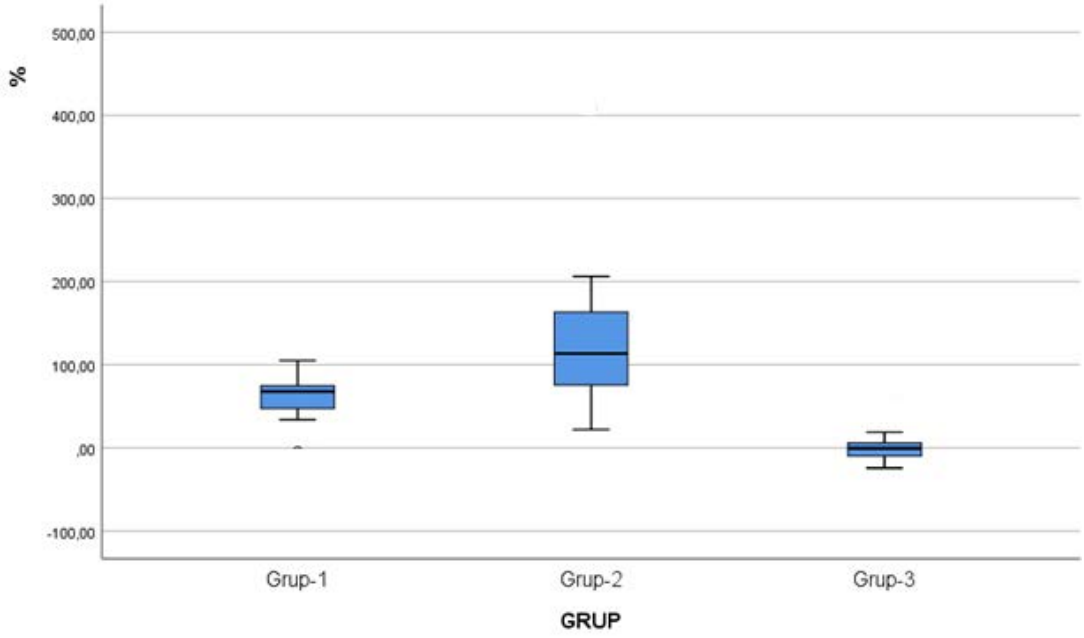
Tablo-5: Serum 25(OH)D değerlerinin 0. güne göre 7.gün, 14.gün ve 28. günlerdeki değişimlerinin gruplar arasında karşılaştırması

	Grup 1 (Oral)	**Grup 2 (IM)**	**Grup 3 (Kontrol)**	**P**	**İkili Karşılaştırma**
7. günde uygulama öncesine (0.gün) göre değişim (%)	91,27±26,95	31,74±19,82	-7,76±13,94	<0,001	G1-G2: <0,001 G1-G3:<0,001 G2-G3:<0,001
14. günde uygulama öncesine (0.gün) göre değişim (%)	67,81 (-4,10:130,98)	113,44 (22,06:408,14)	-0,64 (-24,31:37,79)	<0,001	G1-G2: 0,074 G1-G3:<0,001 G2-G3:<0,001
28. günde uygulama öncesine (0.gün) göre değişim (%)	44,05 (4,55:107,94)	199,86 (114,30:495,10)	-4,52 (-23,91:30,69)	<0,001	G1-G2: 0,001 G1-G3: 0,002 G2-G3:<0,001

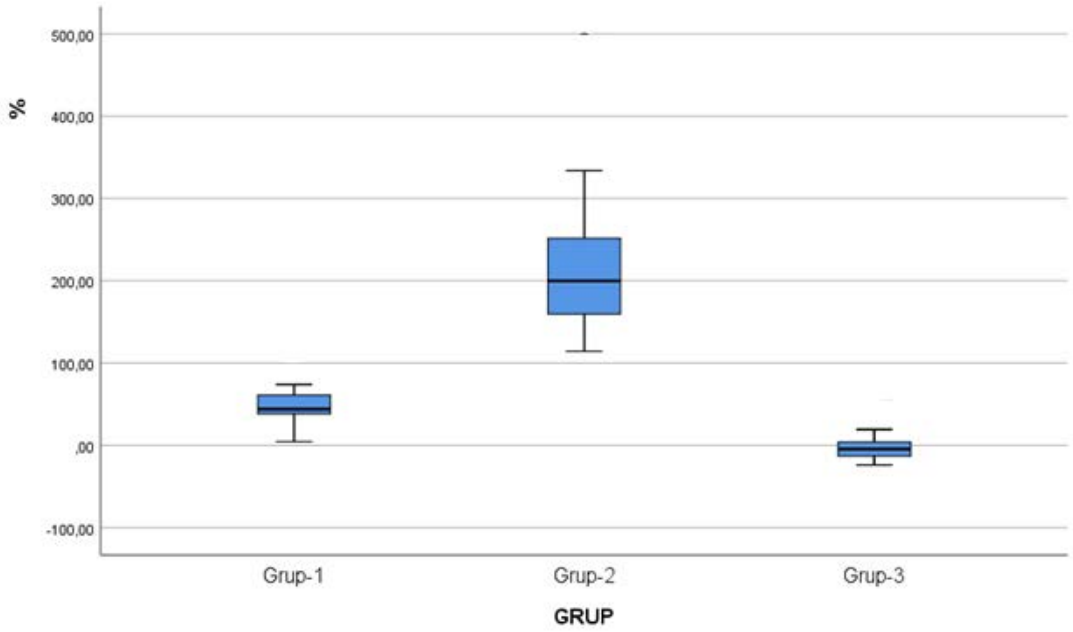
Tüm gruplardaki serum 25(OH)D değerlerinin, 0.,7., 14. ve 28. günlerdeki düzeyleri dikkate alındığında istatistiki açıdan anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Buna göre, uygulama öncesine göre (0.gün) 7. günde Grup 1' de %91,27 (±26,95)'lik, Grup 2' de, %31,74(±19,82)'lık bir artış belirlenirken, Grup 3'de ise %7,76(±13,94)'lik bir azalma gözlemlenmiştir. Sıfırıncı gündeki serum 25(OH)D değerine göre, 28. günde Grup 1'de %44,05(4,55:107,94)'lik, Grup 2'de ise %199,86(114,30:495,10)'lık bir artış tespit edilmiştir. Grup 3'de ise %4,52 (-23,91:30,69)'lik bir azalma belirlenmiştir. On dördüncü gündeki değerlerin uygulama öncesindeki değerlere göre değişimine bakıldığında ise Grup 1 ve Grup 2 arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı, buna karşılık Grup 3'te başlangıca göre 14. gündeki değişimin Grup 1 ve Grup 2'den istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır. Başlangıca göre 14'üncü günde Grup 1'de %67,81(-4,10:130,98)'lik, Grup 2'de ise %113,44(22,06:408,14)'lık bir artış şekillenirken, Grup 3'de ise % 0,64 (-24,31:37,79)'lik bir azalma belirlenmiştir. Sonuç olarak serum 25(OH)D değerlerinin, uygulama öncesine (0. gün) göre 7., 14. ve 28. günlerdeki değişimler dikkate alındığında Grup3'de diğer gruplara göre tüm günlerde istatistiki açıdan önemli olacak düzeyde daha düşük olduğu tespit edilmiştir.



Şekil-4: Gruplara göre 7. günde 25(OH)D düzeylerindeki (yüzde) değişim



Şekil-5: Gruplara göre 14. günde 25(OH)D düzeylerindeki (yüzde) değişim



Şekil-6: Gruplara göre 28. günde 25(OH)D düzeylerindeki (yüzde) değişim

4.5. Oral Vitamin D3 Uygulamalarının Serum AMH Düzeylerine Etkisi

Sunulan bu çalışmada oral Vitamin D3 uygulamasının uygulama öncesine (0.gün) göre, uygulamayı izleyen 7., 14., ve 28. günlerdeki AMH konsantrasyonları üzerine etkileri Tablo 6' da özetlenmiştir.

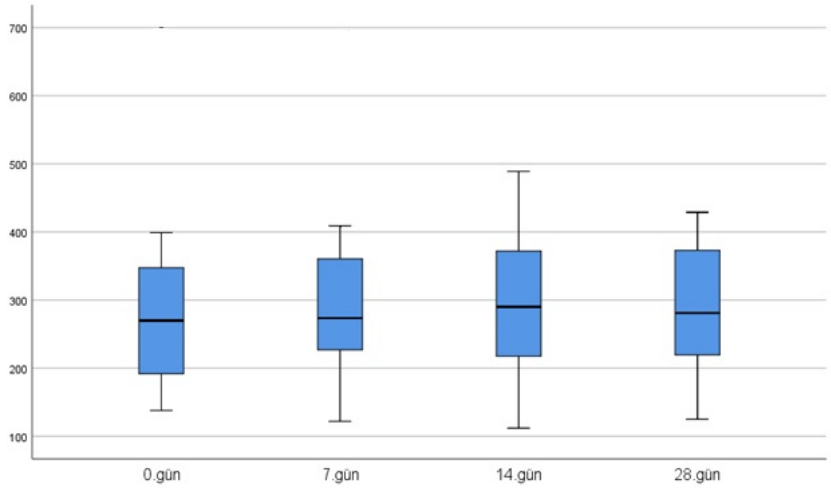
Tablo-6: Grup 1 ve 3'deki serum AMH düzeylerinin grupların kendi içinde 0. güne göre karşılaştırması

	0.gün	**7.gün**	**14.gün**	**28.gün**	**P değeri**
Grup 1 Oral (n=20)	270,0 (138,0:695,0)	273,0 (122,0:678,0)	290,0 (112,0:615,0)	281,0 (125,0:665,0)	0,076 (0-7. gün) 0,709 (0-14. gün) 0,351 (0-28. gün)
Grup 3 Kontrol (n=20)	283,5 (146,0:678,0)	289,5 (185,0:662,0)	275,5 (125,0:660,0)	309,5 (155,0:707,0)	0,341 (0-7. gün) 0,985 (0-14. gün) 0,117 (0-28. gün)

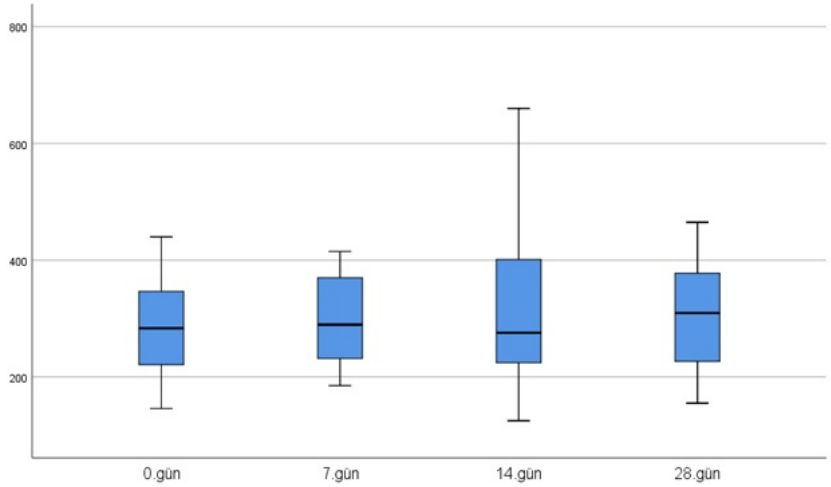
p anlamlılık değerleri uygulamayı izleyen gün sıralamasına göre verilmiştir.

Grup 1'de uygulama öncesi (0. gün) AMH değerleri ile 7., 14., ve 28. günlerdeki AMH değerleri karşılaştırıldığında istatistiki bir fark bulunamamıştır. Oral Vitamin D3 uygulamasının AMH düzeyleri üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 6, Şekil 7).

Grup 3’de (Kontrol) 0.gün AMH değerleri ile 7.gün, 14.gün ve 28.gün AMH değerleri karşılaştırıldığında, günler arasında istatistiki bir fark bulunamamıştır. Kontrol grubunda AMH düzeylerinde 0. güne göre bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo 6, Şekil 8).



Şekil-7: Grup 1 (Oral)‘de uygulama öncesi 0. güne göre AMH düzeylerinin istatiksel karşılaştırılması



Şekil-8: Grup 3 (Kontrol) ‘de uygulama öncesi 0. güne göre AMH düzeylerinin istatiksel karşılaştırılması

4.6. Kas İçi Vitamin D3 Uygulamalarının Serum AMH Düzeylerine Etkisi

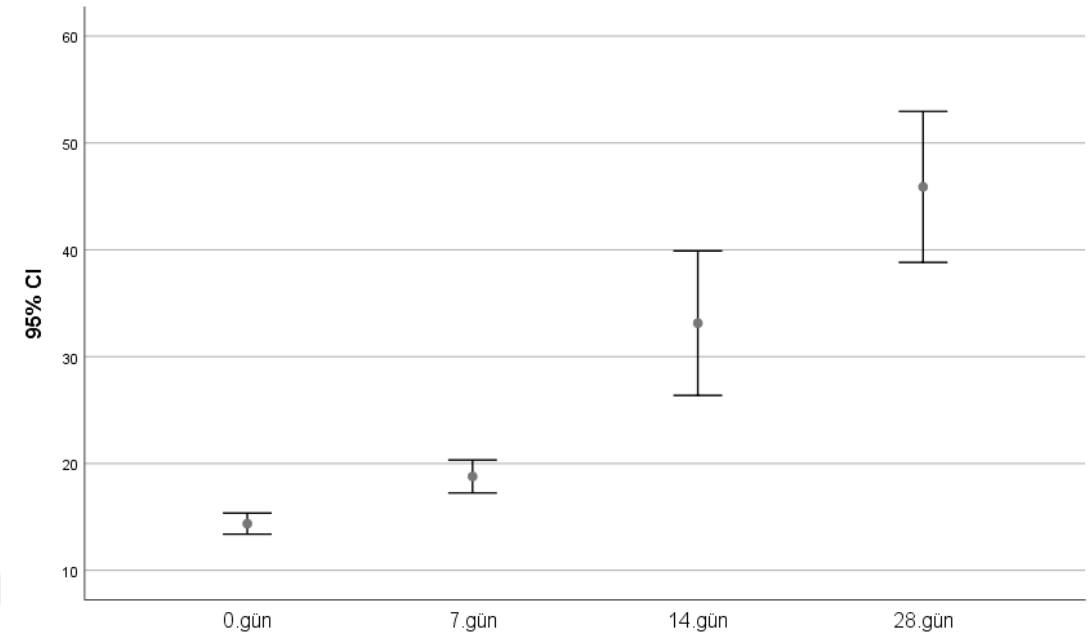
Sunulan bu çalışmada kas içi Vitamin D3 uygulamasının uygulama öncesine (0. gün) göre, uygulamayı izleyen 7., 14., ve 28. günlerdeki AMH konsantrasyonları üzerine etkileri Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo-7: Grup 2 ve 3'deki serum AMH düzeylerinin grupların kendi içinde 0.güne göre karşılaştırılması

	0.gün	**7.gün**	**14.gün**	**28.gün**	**P değeri**
Grup 2 IM (n=20)	289,15±115,00	308,55±116,35	301,40±124,21	320,25±131,93	**0,044 (0 -7. gün)** 0,392 (0-14. gün) **0,023 (0-28. gün)**
Grup 3 Kontrol (n=20)	283,5 (146,0:678,0)	289,5 (185,0:662,0)	275,5 (125,0:660,0)	309,5 (155,0:707,0)	0,341 (0-7. gün) 0,985 (0-14. gün) 0,117 (0-28. gün)

P anlamlılık değerleri uygulamayı izleyen gün sıralamasına göre verilmiştir.

Grup 2 (Kas içi)'de uygulama öncesi (0.gün) AMH değerleri ile 7, 14. ve 28. Günlerdeki AMH değerleri karşılaştırıldığında, uygulama öncesine (0.gün) göre 7. ve 28. gün AMH değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 7. ve 28. günlerdeki AMH değerlerin 0. gündeki değere göre istatistiksel olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Uygulama öncesi (0. gün) AMH değerleri ile 14. gün AMH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Ancak 0. güne göre 14. gün ortalama serum AMH düzeylerinde sayısal bir artış olduğu görülmüştür (Tablo 7, Şekil 9).

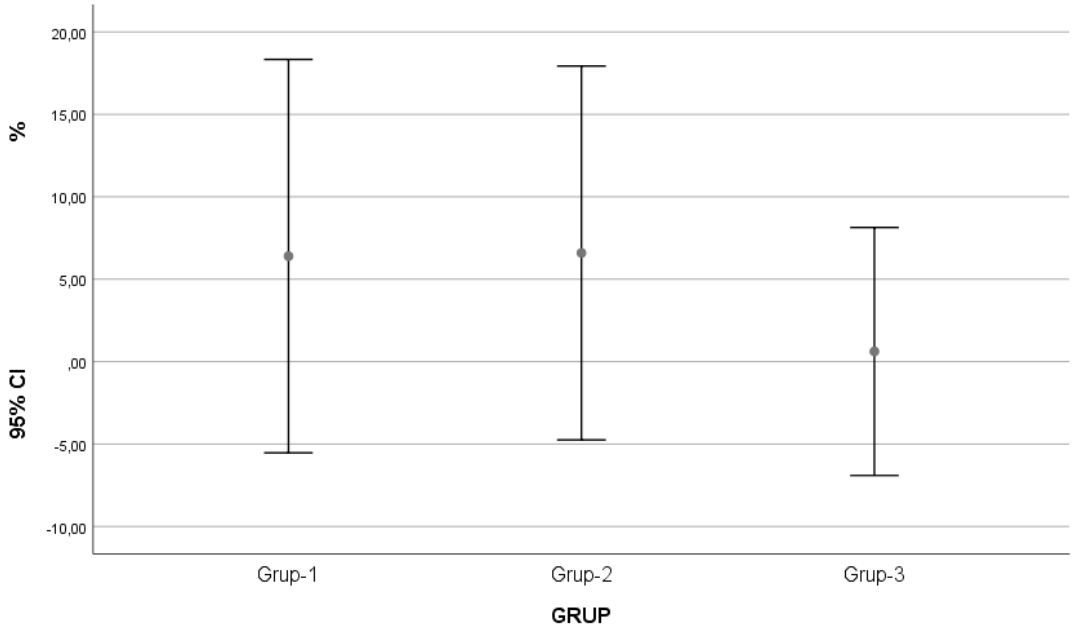


Şekil-9: Grup 2 (Kas içi) 'de uygulama öncesi 0. güne göre AMH düzeylerinin istatiksel karşılaştırılması

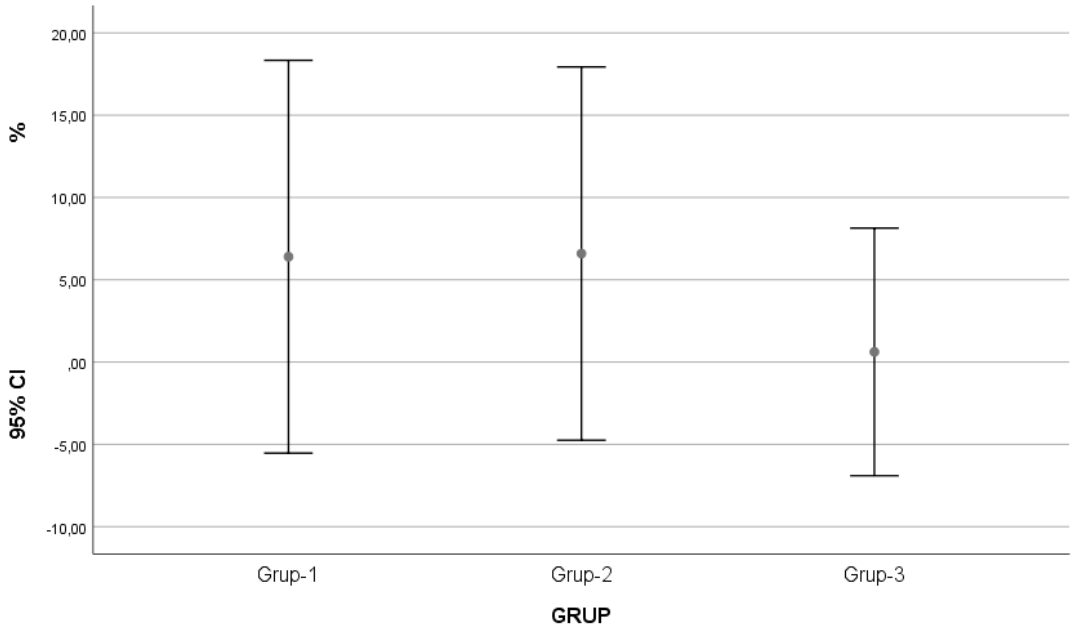
Tablo-8: AMH değerlerinin uygulama öncesine (0.gün) göre 7.gün, 14.gün ve 28. günlerdeki değişimlerinin gruplar arasında karşılaştırması

	Grup 1- Oral	**Grup 2- IM**	**Grup 3- Kontrol**	**P değeri**
7. günde uygulama öncesine göre değişim (%)	6,93±14,28	8,58±15,37	6,27±18,00	0,895
14. günde uygulama öncesine göre değişim (%)	6,40±25,49	6,59±24,23	0,61±16,07	0,632
28. günde uygulama öncesine göre değişim (%)	6,94±20,25	12,31±21,21	8,98±19,42	0,646

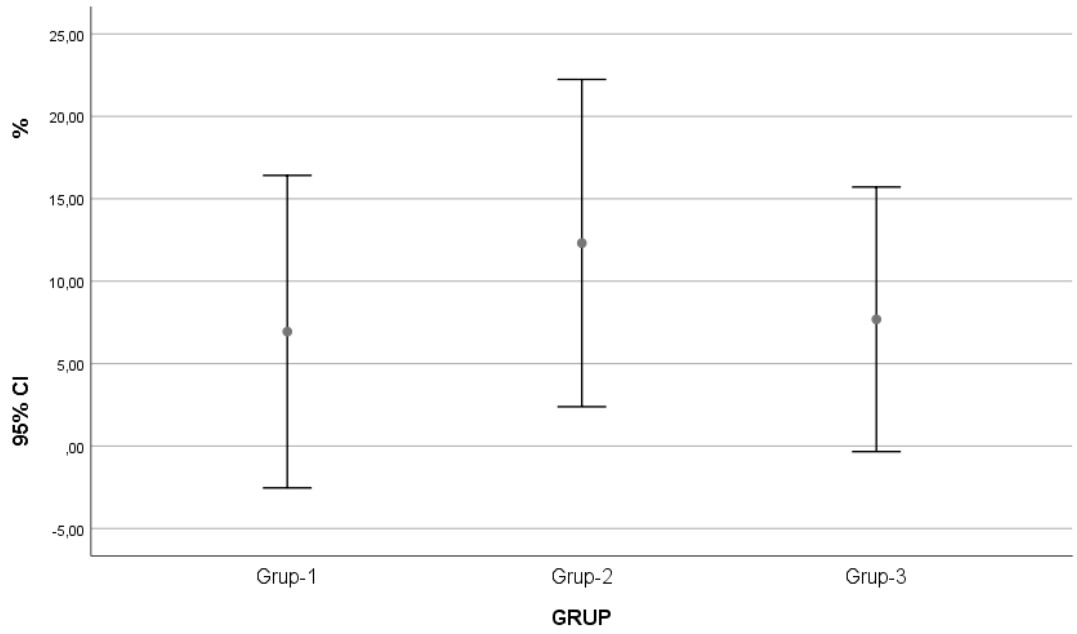
Uygulama öncesine (0.gün) göre 7., 14. ve 28. günlerdeki değerler gruplar arasında karşılaştırıldığında, ilgili günlerde uygulama öncesine istatistiki olarak bir fark bulunamamıştır. Ancak Grup 2'de AMH düzeylerinin artış oranları Grup 1 ve Grup 3'e göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil-10: Gruplara göre 7. Günde AMH düzeylerindeki (yüzde) değişim



Şekil-11: Gruplara göre 14. günde AMH düzeylerindeki (yüzde) değişim



Şekil-12: Gruplara göre 28. günde AMH düzeylerindeki (yüzde) değişim

Tablo 9- AMH başlangıç değeri ile 25 (OH) D arasındaki ilişki

	7. gündeki değişimler	**14. gündeki değişimler**	**28. gündeki değişimler**
Gruplar	r (p)	r (p)	r (p)
Grup1 Oral (n=20)	0,238 0,312	**0,479 0,033**	0,172 0,468
Grup 2 Kas (n=20)	0,340 0,143	0,331 0,154	0,326 0,160
Grup 3 Kontrol (n=20)	0,012 0,959	-0,092 0,701	0,076 0,751

AMH ve 25(OH)D'in 7, 14 ve 28. günlerdeki seviyelerinin uygulama öncesi (0.gün) değerlerine göre değişimleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde, Grup 1'de 14. gündeki AMH ve 25(OH)D değişimlerinin aynı yönde istatistiki olarak da anlamlı olduğu saptanmıştır. Diğer günlere göre değişimlerde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (Tablo 9).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan bu çalışmada, Vitamin D3 uygulamalarının serum 25(OH)D ve AMH düzeyleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca, Vitamin D3 kas içi ve oral yolla uygulanarak, Vitamin D'nin veriliş şeklinin uygulamayı takip eden 7., 14. ve 28. günlerdeki serum 25(OH)D ve AMH düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

İlk aşamada çalışmaya katılan düvelerin yaş ve canlı ağırlıkları ile AMH konsantrasyonları arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Pfeiffer ve ark., (2014) tarafından yapılan bir çalışmada etçi ve sütçü düvelerin materyal olarak kullanıldığı bir çalışmada yaş ve vücut ağırlığı ile serum AMH konsantrasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ortalama yaşları 385,1 ± 24,5 (330- 426) gün olan etçi düvelerden üç farklı yaş grubu (<12 ay, 12-13 ay, >13 ay) oluşturulmuştur. Çalışmaya katılan Angus düvelerin ortalama 330,4 ± 21,0 kg, Şarole düvelerin ise ortalama 374,5 ± 32,4 kg vücut ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, çalışmaya alınan sütçü düveler ortalama 423,9 ± 25,7 (378-463) günlük yaşta senkronize edilmiş ve yaş grupları (<13, 13-14.75, >14.75 ay) olacak şekilde üç gruba ayrılmıştır. Ortalama canlı ağırlık Jersey düvelerde 266,8 ± 29.1 kg, Holstein düvelerde ise 364.1 ± 38.4 kg olarak belirlenmiştir. Pfeiiffer ve ark., (2014) düvelerdeki yaptıkları bu çalışmada yaş ve vücut ağırlığı ile serum AMH konsantrasyonu arasında önemli farklılık olmadığını gözlemlemişlerdir ($p>0,05$). Japanese Black ırkı ineklerde yapılan bir çalışmada (Hirayama ve ark., 2017) AMH düzeyleri ile yaş arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir. Holstein ırkı ineklerde yapılan başka bir çalışmada ise doğum sayısı ve AMH arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı tespit edilmiştir (Souza ve ark., 2015). Sunulan çalışmamızda ise 11-13 aylık yaşındaki (ortalama 346,92 gün ± 1,38) Holstein ırkı düvelerde AMH düzeyleri ile yaş arasındaki ilişki değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamıştır (Yaş-AMH: $p=0,973$). Aynı şekilde çalışmanın başlangıç gününde canlı ağırlıkları 288-341 kg arasında (ortalama 318,98 kg ± 1,74) olduğu belirlenen düvelerin AMH düzeyleri ile canlı ağırlıkları arasında istatistiki açıdan bir farklılık

olmadığı belirlenmiştir (Canlı Ağırlık-AMH: p=0,381). Sunulan bu çalışmada daha önce yapılmış ve yukarıda sonuçları belirtilmiş olan çalışmalarla uyumlu olacak şekilde yaş ve canlı ağırlık ile AMH konsantrasyonu arasındaki ilişki değerlendirildiğinde istatistiki açıdan önemli farklılık gözlenmemiştir. Özet olarak, yaptığımız bu çalışmada yaş ve canlı ağırlığın AMH düzeylerini etkilemediği belirlenmiştir.

Sığırlarda serum 25(OH)D düzeyi mevsime bağlı olarak değişebilmektedir. Vitamin D üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biri güneş ışığına maruz kalınan süredir. Gün ışığı süresinin kısa olduğu kış ve ilkbahar aylarında 25(OH)D üretimi yaz aylarına göre daha düşük olmaktadır (Holick, 2007; Thacher, & Clake, 2011; Tsiaras & Weinstock, 2011). Serum 25(OH)D miktarı kış aylarından yaz aylarına doğru ilerleyen süreçte aşamalı bir şekilde artış göstermektedir. Konuyla ilgili olarak sığırlarda yapılan bir çalışmada hem inek hem de buzağılarda kan serumu 25 (OH)D düzeyinin kış aylarından yaz aylarına kadar olan süreçte artış gösterdiği bildirilmektedir. İneklerde ortalama serum 25(OH)D düzeyinin ilkbahar aylarında 60 ng/ml iken yaz aylarında ise 75 ng/ml düzeyine çıktığı; kış aylarında doğan buzağılarda ise doğum sonrası 10-15 ng/ml düzeyinde olan kan serumu 25(OH)D seviyesinin yaz aylarında 50 ng/ml düzeyine kadar yükseldiği ifade edilmektedir. Yine aynı çalışmada kan serumu 25(OH)D seviyesinin kış aylarında 15 ng/ml düzeyinde olduğu, yaz aylarına doğru ise bu miktarın 50-60 ng/ml düzeyine kadar çıktığı belirtilmektedir. (Casas ve ark., 2015). Sunulan bu çalışmada da yukarıda sözü edilen çalışmalarla benzer şekilde şubat ayında, "01.02.2020-28.02.2020" tarihleri arasında toplanan serum örneklerinde 25(OH)D düzeyinin 13-15 ng/ml arasında değiştiği belirlenmiştir. Bununla birlikte; sığırlarda sağlıklı bir büyüme ve gelişim için 25(OH)D düzeyinin 20 ng/ml üzerinde olması gerektiği vurgulanmaktadır (Nelson ve ark., 2016b). Sunulan bu çalışmada Vitamin D takviyesinin yapılmadığı kontrol grubunda şubat ayı boyunca ölçüm yapılan tüm günlerde düvelerin serum 25(OH)D düzeyinin sağlıklı bir büyüme ve gelişim için gerekli olduğu ifade edilen 20 ng/ml düzeyinin altında olduğu tespit edilmiştir.

Sunulan bu çalışmada grupların kendi içerisinde bir değerlendirme yapıldığında; oral Vitamin D takviyesi yapılan düvelerde serum 25(OH)D düzeyinin 7. günde pik yaptığı, 14. günde ve 28. günde tekrar azaldığı belirlenmiştir. Ancak

uygulama sonrası ölçüm yapılan günlerin tümünde kan serumu 25(OH)D düzeylerinin 0. güne göre istatistiki açıdan önemli olacak düzeyde yüksek olduğu ve 7. günde pik seviyesine ulaştığı belirlenmiştir. Sığırlarda yapılan bir çalışmada da oral Vitamin D uygulaması sonrası serum 25(OH)D düzeyinin 3-7. günler arasında pik düzeye ulaştığı bildirilmiştir (Thompson & Hidiroglou; 1983) . Benzer şekilde insanlarda da oral vitamin D uygulaması sonrası 25 (OH)D düzeyinin 5-7.günler arasında pik yaptığı belirlenmiştir (Dennis ve ark., 2017). Yukarıda sözü edilen literatürlerde çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olacak şekilde oral Vitamin D uygulamasını takibeden yaklaşık 7. günde kan serumu 25 (OH)D düzeyinin pik seviyesine ulaştığı görülmektedir

Daha önce de ifade edildiği gibi sığırlarda sağlıklı bir büyüme ve gelişim süreci için kan serumu 25(OH)D düzeyinin 20 ng/ml üzerinde olması gerektiği belirtilmektedir (Nelson ve ark., 2016b). Sunulan bu çalışmadan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde oral vitamin D uygulaması yapılan grupta uygulama başlanmadan önce kan serumu 25(OH)D düzeyi 13,45±1,47 ng/ml olarak belirlenmiştir. Tek doz oral Vitamin D3 uygulamasını takip eden 28 günlük bir süreç boyunca 25(OH)D düzeyininin yaklaşık olarak ≥20 ng/ml düzeyinde seyrettiği tespit edilmiştir. Kış aylarında oral vitamin D uygulamasının yaklaşık bir ay boyunca sağlıklı bir büyüme ve gelişim sürecini sağlayabilecek serum 25(OH)D düzeyine ulaşılabilmesinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Oral vitamin D uygulaması ile ilgili olarak yüksek süt verimli ineklerde tek doz vitamin D uygulamasının rumen içeriği düzeyleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada öncelikli olarak deneklere rumen kanülü yerleştirilmiş ve daha sonra hayvanlara Vitamin D uygulamaları yapılarak 0, 1, 2, 4, 6, 24 ve 30. saatlerde rumen içeriği Vitamin D seviyeleri ölçülmüştür. Yapılan çalışmanın sonucunda rumen içeriğindeki Vitamin D düzeylerinde önemli artışlar gözlenirken ilerleyen ölçüm saatlerinde giderek konsantrasyonların yem tüketimi, rumen içeriğinin dilüe olması, geviş, sindirim, ruminal parçalanma ve ruminal geçiş kaynaklı olarak azaldığı ifade edilmiştir (Hymøller, & Jensen, 2010). Çalışmamızda oral vitamin D uygulaması sonrası Hymøller, & Jensen, 2010'un belirttiği gibi rumende yem tüketimi, rumen içeriğinin dilüe olması, geviş, sindirim, ruminal parçalanma ve ruminal geçiş kaynaklı olarak oral uygulama sonucu kan serumu 25(OH)D seviyesinin çok fazla bir artış beklemememize rağmen, uygulama sonrası 7. günde kan serumu 25(OH)D düzeyi uygulama öncesi seviyesinin yaklaşık olarak iki katına çıkmış, 14 ve 28.

günlerde azalmasına rağmen sürekli olarak uygulama öncesi düzeyinin üzerinde seyretmiştir.

Kas içi vitamin D uygulanan grupta ise uygulama öncesi serum 25(OH)D düzeyinin IM uygulamayı izleyen günlerde sürekli artış göstererek 28. günde pik düzeye ulaştığı dikkati çekmektedir ($p<0,001$). Sığırlarda yapılan bir çalışmada da sunulan bu çalışmanın sonuçları ile uyumlu olacak şekilde kas içi vitamin D uygulamasının serum 25(OH)D düzeyini 3, 7, 14 ve 28. günlerde sürekli olarak artırdığı ve serum 25(OH)D düzeyinin 28 günde pik düzeye ulaştığı (53,33 ng/ml) belirlenmiştir (Kaya, 2020). Bu çalışmadan elde edilen bulguların yukarıda belirtilen çalışmanın bulguları ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Gruplar arasında bir karşılaştırma yapıldığında ise serum 25(OH)D düzeyinin 7. günde oral grupta, kas içi ve kontrol grubuna göre istatiksel açıdan önemli düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık 14. ve 28. günde ise 25(OH)D düzeyinin kas içi grupta oral ve kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli olacak düzeyde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında kas içi vitamin D uygulamasının serum 25(OH)D düzeyini oral gruba göre 7. gün hariç daha belirgin bir şekilde düzenli olarak artırdığı ve 28 günlük bir zaman süreci boyunca istatistiki olarak yüksek kalmasını sağladığı dikkati çekmektedir. Bu bulgular, kas içi Vitamin D uygulamasının 25(OH)D düzeylerini oral uygulamaya göre uzun sürede ancak daha yüksek düzeyde artırdığı belirlenmiştir.

Sığırlarda AMH düzeyi bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bu açıdan çalışmalara katılan inek ve düvelerin AMH düzeyleri incelendiğinde; donör hayvanların seçiminde AMH seviyelerinden ne derece yararlanılabileceğine yönelik olarak planlanan bir çalışmada materyal olarak kullanılan Japanese ırkı inekler kullanılmış plazma AMH düzeyinin 32-1992 pg/ml arasında değiştiği, ortalama konsantrasyonun ise 265 pg/ml olduğu tespit edilmiştir (Hirayama ve ark., 2017). Yaşları 11-15 ay arasında değişen Holstein ırkı düvelerde yapılan diğer bir çalışmada ise serum AMH düzeylerinin 6-440 pg/ml arasında değiştiği bildirilmiştir (Jimenez-Krassel ve ark., 2015). Holstein, Jersey ve melezi 1200 ineğin materyal olarak kullanıldığı başka bir çalışmada plazma AMH konsantrasyonlarınının 10-3198 pg/ml arasında değiştiği; ortalama AMH konsantrasyonunun ise 320,3 ± 251,1 pg/ml düzeyinde olduğu belirlenmiştir. İnekler AMH konsantrasyonlarına göre

sınıflandırıldığında konsantrasyonları düşük olan grupta AMH düzeylerinin 10-140 pg/ml sınırları içinde değiştiği, ortalamanın ise 85 pg/ml olduğu, orta seviyede olan grupta AMH düzeylerinin 141-450 pg/ml sınırları içinde değiştiği ortalamanın ise 263 pg/ml olarak tespit edildiği belirtilmektedir. Buna karşılık konsantrasyonun yüksek olan grupta bulunan ineklerde ise AMH düzeyleri 451-3,198 pg/ml aralığında ölçülürken, ortalamanın ise 631 pg/ml olduğu tespit edilmiştir (Ribeiro ve ark., 2014). Japanese ırkı düvelerde suni tohumlamadan 3 ay önce başlayıp doğum sonrası 3 ayı içeren bir zaman süreci boyunca aylık olarak AMH düzeyleri belirlenmiştir. Ölçümler sonrası düvelerin AMH düzeylerinin 500-900 pg/ml arasında değiştiği bildirilmiştir (Nabenishi ve ark., 2017). Holstein ve Nelore ırkı düvelerde yapılan diğer bir çalışmada ortalama AMH düzeylerinin sırasıyla 300 pg/ml ve 1400 pg/ml olduğu ifade edilmektedir (Guerreiro ve ark., 2014). Sunulan bu çalışmamızda Siyah alaca düvelerin AMH seviyelerinin 84-714 pg/ml arasında değiştiği ve ortalamanın 305 pg/ml olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen AMH düzeylerinin, Holstein ırkı düvelerde yapılan ve yukarıda sonuçları belirtilen çalışmalar ile benzer ölçüm aralığının içinde seyrettiği buna karşılık üst ve alt sınırlarda farklılıklar olduğu görülmektedir.

Bugüne kadar Siyah alaca, Japanase Black, Jersey, Main-Anjou (Etçi ırk) gibi ırklarda ve bazı melez ırklarda AMH konsantrasyonları ile ilgili çalışılmış ve referans değerler belirlenmiştir (Mossa ve ark., 2017; Hirayama ve ark., 2017). Japanase Black ırkı buzağılarda doğumu izleyen ilk iki ayda AMH konsantrasyonunun aşamalı olarak arttığı, 2-7. aylar arasında önemli derecede bireysel farklılıklar belirlendiği, 8. ayda bireysel farklılıkların belirgin şekilde azaldığı, 11. ayda ise stabil hale geldiği ifade edilmektedir. Siyah Alaca buzağılarda AMH konsantrasyonun doğumlarını izleyen ilk 2 ay süresince arttığı, 5. ayda düştüğü, 8-9. aylarda yani yaklaşık ilk ovulasyonun şekillendiği dönemde stabil hale geldiği ve daha sonra değişmediği belirtilmektedir (Mossa ve ark., 2017). Özetle, sığırlarda kan serumu AMH seviyeleri pubertadan sonraki dönemde belirli bir düzeyde sabitlenmektedir. Seksüel siklusun farklı evrelerinde AMH düzeyi minimum değişiklik göstermektedir. Bunun için siklusun herhangi bir döneminde bir kez ölçülen AMH düzeyi çeşitli amaçlara yönelik olarak güvenli bir şekilde kullanılabilmektedir. Östrüsun değişik evrelerinde kan serumu AMH düzeylerinin nasıl etkilendiğini belirlemeye yönelik olarak etçi düvelerde

yapılan bir çalışmada ilk kan örneği prostaglandin enjeksiyonundan önce alınarak ovulasyon öncesi ve sonrasında 8 farklı günde AMH ölçümleri yapılmıştır. Etçi düvelerde prostaglandin enjeksiyonları öncesinde ve sonrasında farklı günlerde kan serumu örnekleri alındığında, örneklerin alındığı günlerde AMH düzeyleri bireysel olarak değerlendirildiğinde, farklı zamanlarda ölçülen değerlerin birbirleriyle büyük oranda tutarlı bir ilişki oluşturduğu yani ölçüm günlerindeki AMH seviyelerinin istatistiksel açıdan önemli bir değişim göstermediği tespit edilmiştir. Sütçü düvelerde yapılan yine aynı çalışmada, östrüs siklusunun hangi gününde olduğu dikkate alınmaksızın rastgele olarak 0. gün kan örnekleri toplanmış ve ilk kan örneğinin alınmasından 11 ve 15 gün sonra kan örnekleri tekrar toplanarak kan serumu AMH ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca, 0. gün ve 11. günlerde kan örnekleri alındıktan sonra prostaglandin enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Sütçü düvelerde yapılan aynı çalışmada AMH ölçümleri sonrasında kan örnekleme günlerinde bireylerin AMH düzeylerinin önemli bir değişim göstermediği ve büyük oranda birbirleriyle ilişki oluşturduğu ortaya konmuştur (r^2=0,95) (Ireland ve ark., 2011). Sütçü ineklerde yapılan çalışmalarda ise aynı bireyler dikkate alındığında, AMH düzeylerin aynı siklus içerisinde (Rico ve ark., 2009; Souza ve ark., 2015), iki ayrı siklusun farklı günlerinde (Rico ve ark., 2009), doğal ve senkronize östrüs sikluslarında bireysel açıdan değişmediği ve sabit kaldığı (Pfeiffer ve ark., 2014) belirlenmiştir. Süperovulasyon yanıtı ve AMH konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelik olarak Holstein ırkı ineklerde yapılan diğer bir çalışmada da ineklerin AMH konsantrasyonlarının tekrarlanabilirliğini göstermek için kan örnekleri siklusun herhangi bir evresinde (40±3 DIM), proöstrüs (50±3 DIM) ve diöstrüs (57±3 DIM) olmak üzere üç ayrı aşamada alınmıştır. Bu üç farklı dönemde ineklerin AMH düzeyleri arasındaki farkın önemsiz olduğu (p=0,57) yani tekrarlanabilir olduğu belirlenmiştir. Sunulan bu çalışmada ise, kontrol grubundaki düvelerin seksüel siklusunun gününe bakılmasızın rastgele olarak bir günde kan serumu örnekleri toplanmaya başlanmıştır. Kontrol grubunda 0., 7., 14. ve 28. günlerde olacak şekilde AMH ölçümleri yapılmıştır. Yapılan bu ölçümler sonucunda uygulama öncesine göre (0. gün) diğer ölçüm günlerindeki AMH düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiki açıdan anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05). Sunulan bu çalışmanın kontrol grubunun bulguları göz önüne alındığında, sığırlarda yapılan ve yukarıda sonuçları verilen diğer

çalışmalarla uyumlu olacak şekilde farklı günlerde yapılan AMH ölçümleri dikkate alındığında AMH'ın tekrarlanabilirliği ortaya konmuştur.

Vitamin D, AMH ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilmektedir. D vitamini yanıt elemanı (VDRE), D vitamini tarafından düzenlenen genlerin promotör bölgesinde bulunan bir DNA dizisi türüdür. Bu DNA dizisi, D vitamininin aktif formu olan kalsitriol (1,25(OH)2D) ile kompleks oluşturulduğunda D vitamini reseptörünü (VDR) bağlar ve böylece birçok genin ifadesini düzenler. VDR proteinleri granüloza hücrelerinde, oositlerin çekirdeğinde ve sitoplazmasında tespit edilmiştir. Vitamin D kendi reseptörü ile (VDR) etkileşime geçerek AMH geni promotör bölgesinde yer alan VDRE bölgesine bağlanarak AMH ekspresyonunu uyarabilmektedir. VDRE bölgesinde oluşan bir delesyon sonucunda, yani bu DNA dizisinin oluşturduğu kromozomlarda bir anomali oluştuğunda, Vitamin D'nin AMH ekspresyonunu uyaramadığı tespit edilmiştir. Yukarıdaki anlatılan mekanizmalar dikkate alındığında Vitamin D'nin VDRE aracılığı ile AMH ekspresyonunu doğrudan uyarabildiği görülmektedir (Cihan ve ark., 2011; Malloy ve ark., 2009).

Vitamin D yukarıda sözü edilen mekanizmaların dışında dolaylı olarak da AMH ekspresyonunu uyarabilmektedir. Foliküler gelişim sürecinde AMH, folikül rezervlerinin yavaş ve kontrollü bir şekilde kullanılmasını sağlamakta ve foliküler rezervin erken tüketilmesini engellemektedir. Vitamin D takviyesinin foliküler gelişim ile ilgili sinyal yolaklarını uyardığı belirtilmektedir. Bu uyarımların başlamasında özellikle AMH ekspresyonunun Vitamin D tarafından regülasyonu rol oynamaktadır. Vitamin D'nin preantral foliküler hücrelerde AMH ve AMHR-II mRNA düzeyini azalttığı bildirilmektedir (Merhi ve ark., 2014). AMH ve AMHR-II ekspresyonunun azalmasıyla birlikte foliküler gelişim hızlanmaktadır (Durlinger ve ark., 2002; Jeppesen ve ark., 2013). Primatlarda VD3'ün antral foliküllerinin gelişimini uyararak AMH üretimini artırdığı ve ayrıca oosit maturasyonuna katkı sağladığı tespit edilmiştir. Düşük vitamin D düzeyinin ise VDR ekspresyonunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. VDR proteinleri granüloza hücrelerinin, oositlerin çekirdeğinde ve sitoplazmasında tespit edilmiştir. Primatlardan elde edilen bulgular, Vitamin D'nin AMH üretimi üzerine doğrudan ve dolaylı etkisini ortaya koymaktadır (Xu ve ark., 2018). Diğer bir çalışmada makak maymunlarında vitamin D'nin folikül ve oosit

gelişimini desteklediği belirlenmiş ve AMH üretimini artırdığı tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2016). Bununla birlikte keçilerde vitamin D'nin VDR aracılığıyla lüteinize olmuş granüloza hücrelerinin proliferasyonunu desteklediği ifade edilmiştir (Yao ve ark., 2020). Sağlıklı olarak gelişen preantral ve küçük antral foliküller AMH'ın asıl kaynağıdır. Bu nedenle, preantral foliküllerde Vitamin D etkisi ile azalan AMH ekspresyonuna karşın, gelişmekte olan diğer foliküllerde artan AMH üretiminin dolaşımda AMH konsantrasyonunu artıracağı düşünülmüştür. Konu ile ilgili insanlarda yapılan bir çalışmada, oral vitamin D takviyesi yapılan kadınlarda dolaşımdaki AMH konsantrasyonunun aşama aşama artış gösterdiği tespit edilmiş ve bu etkinin Vitamin D'nin foliküler gelişimi desteklemesi ve gelişen foliküllerdeki artan granüloza hücre sayısından kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Dennis ve ark., 2017). Sunulan bu çalışmada ise oral vitamin D uygulamasının serum AMH düzeyini etkilemediği, kas içi vitamin D uygulamasının ise AMH düzeyini 7. ve 28. günlerde artırdığı belirlenmiştir. Gruplar(1,2,3) arasında bir karşılaştırma yapıldığında ise 0, 7, 14 ve 28. günlerde AMH düzeyleri arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Ancak insanlarda serum AMH düzeyi ile Vitamin D arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda farklı bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmaların bazılarında AMH ile Vitamin D arasında pozitif korelasyon tespit edilirken, bazı çalışmalarda ise Vitamin D ile AMH arasında negatif korelasyon olduğu bildirilmiştir. Örneğin bir çalışmada vitamin D takviyesi yapılmayan farklı yaşlardan sağlıklı kadınlarda serum AMH düzeyi ile Vitamin D plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışmada 40 yaş üzerindeki kadınlarda AMH düzeyi ile Vitamin D arasında pozitif korelasyon belirlenirken, 35 yaş altındaki kadınlarda ise Vitamin D ve AMH arasında negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Merhi, 2012). İnsanlarda yapılan bir başka çalışmada obez olmayan sağlıklı kadınlarda vitamin D takviyesi yapılmaksızın serum AMH ve Vitamin D düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Ancak Vitamin D düzeyi ile AMH arasında bir ilişki tespit edilememiştir (Chang ve ark., 2014). Benzer şekilde sunulan bu çalışmada da yukarıda ifade edilen literatür sonuçları ile uyumlu olacak şekilde Vitamin D takviyesi yapılmayan kontrol grubunda serum 25 OHD ile serum AMH düzeyi arasında ilişki tespit edilmemiştir.

Vitamin D'nin AMH düzeyine etkisi mevsimsel olarak farklılık göstermektedir. Kadınlarda Vitamin D takviyesinin serum AMH düzeyinde kış aylarında fizyolojik olarak meydana gelen azalmaları engellediği bildirilmiştir (Dennis ve ark., 2012). Ayrıca kadınlarda AMH düzeylerinin düşük olması ovaryan rezervin erken tüketilmesine sebep olarak menapozla sonuçlandığı belirtilmektedir. AMH düzeylerinin belirgin şekilde yüksek olması ise polikistik over sendromuna yol açmaktadır. Polikistik over sendromu oligo/anovulasyon, androjen fazlalığı, ultrasonografik muayenede ovaryum üzerinde çok sayıda kistin varlığı, hirsutizm, menstrual bozukluklar, düzensiz sikluslar, insülin direnci, obezite, gebe kalmada yaşanan zorluklar gibi birçok olumsuz duruma yol açarak infertiliteye neden olduğu vurgulanmaktadır (Akdemir, 2020). Çalışmamızda Vitamin D uygulamalarının AMH düzeyi değişimleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde Vitamin D uygulaması yapılan gruplarda AMH düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel bir fark göstermeksizin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma süreci bir bütün olarak değerlendirildiğinde ise insanlarla benzer şekilde düvelerde de kış mevsiminde Vitamin D uygulamasının AMH düzeyindeki düşüşü engellediği bununla birlikte AMH düzeyini kontrol grubuna göre daha sabit düzeyde tuttuğu görülmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde yukarıdaki (Akdemir, 2020; Dennis ve ark., 2012) literatürlerde belirtildiği gibi insanlardakine benzer bir şekilde düvelerde uygulanan Vitamin D3'ün AMH düzeylerinin belirli bir düzeyde sabit tutulmasını sağladığı düşünülmektedir. Sığırlarda düşük AMH seviyesinin fertilite üzerindeki olumsuz etkileri bilinmektedir (Jimenez-Krassel ve ark., 2009, 2015; Mossa ve ark., 2012; Ribeiro ve ark., 2014). Buna karşılık kan serumu AMH düzeyinin çok yüksek olmasının ise fertilite üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Belki de çalışmamızda olduğu gibi Vitamin D3 uygulamaları sonucu AMH'nın çok yüksek düzeylere ulaşmasının engellenmesi ve düzenli bir şekilde sabit kalmasının sağlanması, sığırlarda bugüne kadar çalışılmamakla beraber insanlardaki gibi bir polikistik ovaryum sendromu benzeri klinik tabloları engelleyebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak sunulan bu çalışmada güneş ışığı ile direk temasın olmadığı üstü kapalı bir alanda bakılan Siyah alaca sütçü düvelerde şubat ayında vitamin D uygulamalarından önce belirlenen kan serumu 25(OH)D düzeylerinin sığırlarda sağlıklı bir büyüme ve gelişim süreci için gerekli olduğu belirtilen (>20 ng/ml) (Nelson

ve ark., 2016b) seviyeden belirgin şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. Oral Vitamin D3 uygulaması yapılan grupta, uygulamayı izleyen süreç göz önüne alındığında kan serumu 25(OH)D düzeylerinin 7. günde pik seviyeye ulaştığı, 14 ve 28. günlerde tekrar azalmaya başladığı ancak bütün deneysel süreç boyunca uygulama öncesine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Oral Vitamin D3 uygulamaları sonrası kan serum 25(OH)D düzeylerinin 7. günden sonra giderek azaldığı dikkate alındığında hayvanların gün ışığı ile temasının olmadığı üstü kapalı alanlarda barındırıldığı sistemlerde kış aylarında oral Vitamin D3 takviyelerinin yapılması ve uygulamaların tekrarlanması gerektiği kanaatine varılmıştır. Kas içi Vitamin D3 uygulamasını takiben çalışma süresince kan serumu 25(OH)D düzeylerinin 7, 14 ve 28. günlerde aşamalı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kas içi Vitamin D3 uygulamasının kan serum 25(OH)D düzeylerini düzenli bir şekilde artırdığı ve uygulama öncesi düzeylere göre sürekli olarak yüksek seviyede tuttuğu göz önünde bulundurulduğunda kış aylarında hayvanların güneş ışığı ile temasını sağlayan gezinme alanları olmayan üstü kapalı barınma sistemlerinde tek doz Vitamin D3 uygulanmasının faydalı olabileceği kanısına varılmıştır. Bununla birlikte kas içi Vitamin D3 uygulanan grupta uygulamayı takip eden 28. günden yani dördüncü haftadan sonra serum 25(OH)D düzeylerinin ne zaman düşüşe geçeceği tespit edilip uygulama aralığının bu sonuca göre belirlenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

Vitamin D3 uygulaması yapılmayan kontrol grubunda AMH düzeyleri incelendiğinde çalışma süresi boyunca 7,14 ve 28. günlerde AMH düzeylerinin dalgalı bir seyir izlediği tespit edilmiştir. Oral olarak Vitamin D3 uygulanan grupta AMH düzeylerinin artış eğiliminde olduğu ve çalışma boyunca AMH seviyelerinin uygulama öncesindeki düzeyin altına inmediği belirlenmiştir. Vitamin D3'ün kas içi olarak uygulandığı grupta ise kan serumu AMH düzeylerinde artışlar görüldüğü ve tüm deneysel süreç boyunca AMH düzeylerin uygulama öncesi seviyelerin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kas içi uygulama yapılan grupta kan serumu AMH düzeyinin bütün çalışma süreci boyunca 300 pg/ml'nin biraz üzerinde çok büyük değişimler göstermeden istikrarlı bir seyir izlediği dikkati çekmektedir. Kas içi uygulama sonucu AMH seviyelerinde oluşan istikrarlı seyrin fertilite üzerinde olumlu etkilerinin olup olmadığının değerlendirilmesi açısından fertilite ile ilgili parametrelerin özellikle de gebelikle ilgili sonuçların karşılaştırılmasını içeren

çalışmalarının yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır. Ayrıca benzer çalışmaların ineklerde de yapılmasının uygun olacağı değerlendirilmiştir.

Bütün bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde;

- Siyah alaca sütçü düvelerde, eksojen Vitamin D3 takviyesinin serum 25(OH)D ve AMH üzerine olan etkilerinin, uygulama tercihine göre ciddi değişim gösterebileceği,
- Oral ve kas içi uygulamalardaki farklılığın, Vitamin D3'ün sindirim sistemindeki farmakolojik kinetiğinden kaynaklanabileceği, ancak bu konuda ileriki çalışmalara ihtiyaç duyulabileceği,
- Özellikle 5 milyon IU Vitamin D3'ün oral uygulamaları ile reprodüktif performansa olumlu etkisi olabileceği düşünülen, serum AMH düzeyinde önemli bir avantaj sağlanamayacağı,
- Kas içi Vitamin D3 uygulamalarının genel anlamda sütçü düvelerde AMH düzeyleri üzerine olumlu etkileri olabileceği, ancak bu durumun fertiliteyi nasıl etkileyebileceği konusunda gelecekteki araştırmalara ihtiyaç duyulacağı,
- Diğer taraftan, çalışmamızda kullanılan hayvanların 20 ng/ml'in altındaki serum 25(OH)D değerleri dikkate alındığında, kış aylarında ve üstü kapalı barındırma sistemlerinde işletme menejmenti kapsamında hayvanların ultraviyole ışınlara maruz kalmasının AMH ve fertilite üzerine nasıl etkilerinin olabileceği konusunda çalışmaların yapılmasının gerektiği kanısına varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Abdel Aziz, R.L., Khalil, A.A.Y, Abdel-Wahab, A., Hassan, N.Y., Abdel-Hamied, E., & Kasimanickam, R.K. (2017). Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows. Theriogenology, 100, 72-79. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.007.

Adams, G.P. (1994). Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implication for synchronization and superstimulation. Theriogenology, 41, 25-30. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80044-5.

Aerts, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010). Review Article Ovarian Follicular Dynamics : A Review with Emphasis on the Bovine Species . Part I : Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development, 179, 171–179. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x

Akbarinejad, V., Gharagozlou, F., & Vojgani, M. (2017). Temporal effect of maternal heat stress during gestation on the fertility and anti-Müllerian hormone concentration of offspring in bovine. Theriogenology, 99, 69-78. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.018.

Akbarinejad, V., Gharagozlou, M., Vojgani, M.M., & Amirabadi, B. (2018). Nulliparous and primiparous cows produce less fertile female offspring with lesser concentration of anti-Müllerian hormone (AMH) as compared with multiparous cows. Animal Reproduction Science, 197, 222–230. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.032.

Akdemir, C. (2020). Polikistik over sendromlu olgularda amh, afc ve fsh normogramları ve bunların ovulasyon indüksiyonu, intrauterin inseminasyon ve in vitro fertilizasyon uygulaması sonrası gebelik sonuçlarına etkisi.

Almeida, J., Ball, B.A., Conley, A.J., Place, N.J., Liu, I.K.M., Scholtz, E.L., … Moeller, B.C. (2011). Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. Theriogenology, 6, 1393–1403. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.008.

Alward, K.J., & Bohlen, J.F. (2020). Overview of Anti-Müllerian hormone (AMH) and association with fertility in female cattle. Reproduction in Domestic Animals, 55, 3–10. http://doi.org/10.1111/rda.13583.

Amsterdam, A., Hanoch,T., Dantes, A., Tajima, K., Strauss, J.F., & Seger, R. (2002). Mechanisms of gonadotropin desensitization. Molecular and Cellular Endocrinology, 187, 69–74. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00701-8.

Arouche, N., Picard, J.Y., Monniaux, D., Jamin, S., Vigier, B., Josso, N., … Taieb, J. (2015). The BOC ELISA, a ruminant-specific AMH immunoassay, improves the determination of plasma AMH concentration and its correlation with embryo

production in cattle. Theriogenelogy. 84, 1397–1404. https://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.026.

Atashi, H., Abdolmohammadi, A., Dadpasand, M., & Asaadi, A. (2012). Prevalenc , risk factors and consequent effect of dystocia in Holstein dairy cows in Iran. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 25, 447–451. https://dx.doi.org/10.5713%2Fajas.2011.11303.

Baarends, W.M., Uilenbrowk, J,T,, Kramer, Van Leeuwen, E.C., Themmen, A.P., & , Grootegoed J.A. (1995). Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. Endocrinology, 136(11), 4951–4962. https://doi.org/10.1210/endo.136.11.7588229.

Bagley, C.P. (1993). Nutritional management of replacement beef heifers: a review. Journal of Animal Science, 71, 3155–3163. https://doi.org/10.2527/1993.71113155x.

Baird, D.D., Hill, M.C., Schectman, J.M., & Hollis, B.W. (2013). Vitamin d and the risk of uterine fibroids. Epidemiology, 24, 447–53. https://doi.org/10.1097/ede.0b013e31828acca0.

Baker, T.G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in the human ovaries. Proceedings Reproductive Society of London (Biology), 158, 417-433. https://doi.org/10.1098/rspb.1963.0055.

Baldrighi, J., Sá Filho, M.F., Batista, E.O., Lopes, R.N., Visintin, J.A., Baruselli, P.S. & Assumpção, M.E. (2014). Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. Reproduction in Domestic Animals, 49, 1015–1020. https://doi.org/10.1111/rda.12430.

Ball, B.A., Almeida, J., & Conley, A.J. (2013). Determination of serum anti-Müllerian hormone concentrations for the diagnosis of granüloza-cell tumours in mares. Equine Vet. J., 45, 199–203. https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00594.x.

Barra, R., Cruz, G., Mayerhofer, A., Paredes, A., & Lara, H.E. (2014). Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring. Reproduction, 148, 137-45. https://doi.org/10.1530/rep-14-0150.

Batista, E.O.S., Guerreiro, B.M., Freitas, B.G., Silva, J.C.B., Vieira, L.M., Ferreira RM, … Baruselli, P.S. (2016). Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select Bos taurus (Holstein) and Bos indicus (Nelore) calves for in vitro embryo production. Domestic Animal Endocrinology, 54:1–9. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.08.001.

Batista, E.O.S., Macedo, G.G., Sala, R.V., Ortolan, M.D.D.V., Sá Filho, M.F., Del Valle, T.A., … Baruselli, P.S. (2014). Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) heifers. Reproduction in Domestic Animals, 49, 448-452. https://doi.org/10.1111/rda.12304.

Bayne, R.A.L, Martins da silva, S.J., & Anderson, R.A. (2004). Increased expression of the FIGLA transcription factor is associated with primordial follicle formation in

the human fetal ovary. Molecular Human Reproduction. 10 (6), 373- 381. https://doi.org/10.1093/molehr/gah056.

Bazer, F.W., Wu, G., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., & Bayless, K. (2010). Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. Mol Hum Reprod, 16:135-152. https://doi.org/10.1093/molehr/gap095.

Beaumont, H.M., & Mandl, A.H. (1962). A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. Proceedings Reproducive Society of London (Biology), 155, 557-579. https://doi.org/10.1098/rspb.1962.0019.

Bernal, A.B., Vickers, M.H., Hampton, M.B., Poynton, R.A., & Sloboda, D.M. (2010). Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. PLoS One, 5, 155-58. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015558.

Berry, D.P., Wall, E., & Pryce, J.E. (2014). Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. Animal, 8, 105–121. https://doi.org/10.1017/s1751731114000743.

Bó, G.A., De la Mata, J.J., Baruselli, P.S., & Menchaca,A. (2016). Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. Theriogenology,86, 388-396. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.053.

Braw-Tal, R., & Yossefi, S. (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. Journal of Reproduction and Fertility; 109: 165-171. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090165.

Britt, J. H. (1992). Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. Dairy Session, 1, 39-43. https://doi.org/10.21423/aabppro19916706.

Bungum, L., Franssohn, F., Bungum, M., Humaidan, P., & Giwercman, A. (2013). The circadian variation in anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome diers significantly from normally ovulating women. PLoS ONE, 8, e68223. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068223.

Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H, Knight, P.G, & Ireland, J.J. (2005). Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. Biology of Reproduction, 73,53-62. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277.

Buskirk, D.D., Faulkner, D.B., & Ireland, F.A. (1995). Increased postweaning gain of beef heifers enhances fertility and milk production. Journal of Animal Science, 73,937–946. https://doi.org/10.2527/1995.734937x.

Byskov, A.G & Hoyer P.E (1994). Embryology of mammalian gonads and ducts: In The Physiology of Reproduction. E. Knobil and J.D Neill (Eds) 2th edt. New York: Raven Press Ltd. (pp: 487-540).

Campos, M. S., Wilcox, C. J., Becerril, C. M., & Diz, A. (1994). Genetic parameters for yield and reproductive traits of Holstein and Jersey cattle in Florida. Journal of Dairy Science, 77(3), 867–873. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77021-1.

Caraviello, D.Z., Weigel, K.A., Shook, G.E., & Ruegg, P.L. (2005). Assessment of the impact of somatic cell count on functional longevity in Holstein and Jersey cattle using survival analysis methodology. Journal of Dairy Science, 88, 804–811. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72745-4.

Casas, E., Lippolis, J. D., Kuehn, L. A., & Reinhardt, T. A. (2015). Seasonal variation in vitamin D status of beef cattle reared in the central United States. Domestic animal endocrinology, 52, 71–74. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.03.003.

Celi, P., Williams, S., Engstrom, M., McGrath, J., & La Marta, J. (2018). Safety evaluation of dietary levels of 25-hydroxyvitamin D3 in growing calves. Food and Chemical Toxicology, 111, 641–649. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.053.

Chang, E.M.; Kim, Y.S.; Won, H.J.; Yoon, T.K.; Lee, W.S. Association between sex steroids, ovarian reserve, and vitamin D levels in healthy nonobese women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2014, 99, 2526–2532.

Cheng J, Qin VJ, Nyamsuren B at all (2020) Transcriptional activity of FIGLA, NEUROG2, and EGR1 transcription factors associated with polymorphisms in the proximal regulatory region of GPR54 gene in cattle. Animal Reproduction Science. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106506.

Clemens, T. L., J. S. Actams, J. M. Nolan & Holick M. F. (1982). Measurement of circulating vitamin D in man. Clinica Chimica Acta, 121, 301-308. https://doi.org/10.1016/0009-8981(82)90239-x.

Clemente, N.di., Goxe, B., Remy, J.J., Cate, R.L., Josso, N., Vigier, B., & Salesse, R. Inhibitory effect of amh upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured cytochrome p450 aromatase activity in human granüloza lutein cell culture. Fertil Steril., 1994,89, 1364–70.

Collier, R.J., Doelger, S.G., Head, H.H., Thatcher, W.W., & Wilcox, C.J. (1982). Effects of heat stress during pregnancy on maternal hormone concentrations, calf birth weight and postpartum milk yield of Holstein cows. J Anim Sci., 54, 309-19. https://doi.org/10.2527/jas1982.542309x.

Colotta, F., Jansson, B., & Bonelli, F. (2017). Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. Journal of Autoimmunity, 85, 78–97. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.07.007.

Cushman, R.A., DeSouza, J.C., Hedgpeth, V.S., & Britt JH. (1999). Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. Biol Reprod., 60-349-54. https://doi.org/10.1095/biolreprod60.2.349.

Dawson-Hughes B. (2008). Serum 25-hydroxyvitamin D and functional outcomes in the elderly. Am. J. Clin. Nutr., 88(2), 537–540. https://doi.org/10.1093/ajcn/88.2.537s.

Dawson-Hughes, B. (2004). Racial/ethnic considerations in making recommendations for vitamin D for adult and elderly men and women. Am J Clin Nutr., 80, 1763–6. https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1763s.

Deeks, E.D. (2015). Elecsys(®) AMH Assay: A Review in Anti-Müllerian Hormone Quantification and Assessment of Ovarian Reserve. Mol Diagn Ther., 19(4), 245-9. https://doi.org/10.1007/s40291-015-0156-1.

Dennis, N.A., Houghton, L.A., Jones, G.T., van Rij, A.M., Morgan, K., McLennan, I.S. (2012). The level of serum anti-Müllerian hormone correlates with vitamin D status in men and women but not in boys. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(7), 2450-5. https://doi.org/10.1210/jc.2012-1213.

Dennis, N.A., Houghton, L.A., Pankhurst, M.W., Harper, M.J., McLennan, I.S. (2017). Acute Supplementation with High Dose Vitamin D3 Increases Serum Anti-Müllerian Hormone in Young Women. Nutrients. 8, 9(7), 719. https://doi.org/10.3390/nu9070719.

Díaz, P.U., Rey, F., Gareis, N.C., Notaro, U.S., Matiller, V., Belotti, E.M., … Ortega, H.H. (2018). Altered expression of anti-Müllerian hormone during the early stage of bovine persistent ovarian follicles. J. Comp. Pathol., 158, 22–31. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.10.175.

Diskin, M.G., Morris, D.G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. Reproduction in Domestic Animals, 43:260-267. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x.

Ducrocq, V., Quaas, R. L., Pollak, E. J., & Casella, G. (1988). Length of Productive Life of Dairy Cows. 2. Variance Component Estimation and Sire Evaluation. Journal of Dairy Science, 71(11), 3071–3079. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79907-5.

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP 2002 Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology 143:1076 – 1084.

Durlinger, A.L., Gruijters, M.J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T.R., Matzuk, M.M., … Themmen, A.P. (2001). Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. Endocrinology, 142, 4891–9. https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8486.

Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. (1996). The Urogenital apparatus. Chapter 5: Veterinary Anatomy, W.B. Saunders company, 2 th edt. (pp:169-208).

Eliot, M. M. & E. A. Park. (1938). Rickets. WF Prior.

El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G. Nibe, K., Yamaguchi, R., Horii, Y., Zaabel, S., & Osawa, T. (2013). Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granüloza-theca cell tumors: Comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations, Theriogenology, 80, 940–949. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.022.

El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Torisu, S., Nibe, K., Kaneko, Y., Hidaka, Y., & Osawa, T. (2015). Evidence of spontaneous recovery of granüloza-theca cell tumour in a Heifer: A retrospective report. Reprod. Domest. Anim., 50, 696–704. https://doi.org/10.1111/rda.12555.

El-Sheikh Ali, H.; Kitahara, G.; Nibe, K.; Osawa, T. Endocrinological characterization of an ovarian sex cord–stromal tumor with a Sertoli cell pattern in a Japanese Black cow. Reprod. Domest. Anim. 2019, 54, 1501–1504. https://doi.org/10.1111/rda.13556.

Empey, R., Santillan, D., Santiillan, M., Tyler, E., Hunter, S., Smith, E., & Stegman, B., (2012). The influence of fetal sex on patterns of change in anti-Mullerian hormone during pregnancy. Proceedings in. Obstetrics and Gynecology, 2, 1–2.

Eppig, J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction, 122, 829-838. https://doi.org/10.1530/rep.0.1220829.

Erickson, B., Reynolds, R., & Murphree, R. (1976). Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. Biol Reprod., 15, 555-60. https://doi.org/10.1095/biolreprod15.4.555.

Erickson, B.H. (1966a). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. Journal of Animal Science, 25, 800-805. https://doi.org/10.2527/jas1966.253800x.

Erickson, B.H. (1966b). Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. Journal of Reproduction and Fertility, 10: 97-105. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0110097.

Evans, A.C.O, Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., & Ireland, J.J. (2012). Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. Reproduction in Domestic Animals, 47, 31-37. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x.

Faber, D.C., Molina, J.A., Ohlrichs, C.L., Vander-Zwaag, D.F., & Ferre, L.B. (2003). Commercialization of animal biotechnology, Theriogenology, 59, 125–138. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01264-5.

Findlay, J.K., Hutt, K.J., Hickey, M., & Anderson, R.A. (2015). How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? Biol. Reprod., 93, 111. https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133652.

Firouzabadi, R.D., Aflatoonian, A., Modarresi, S., Sekhavat, L., & Mohammad Taheri, S. (2012). Therapeutic effects of calcium and vitamin D supplementation in women with PCOS. Complement Ther Clin Pract., 18, 85–8. https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2012.01.005.

Fortune, J.E., Yang, M.Y., & Muruvi, W. (2010). The earliest stages of follicular development: Follicle formation and activation. Soc Reprod Fertil Suppl. 67, 203–216.

Gao, Q. & Womack, J.E. (1997). A genetic map of bovine chromosome 7 with an interspecific hybrid backcross panel. Mammalian Genome, 8, 258–261.

Gasser, C. L. (2012). JOINT ALPHARMA-BEEF SPECIES SYMPOSIUM : Considerations on puberty in replacement beef heifers 1, 1336–1340. https://doi.org/10.2527/jas2012-6008.

Ghanem, N., Jin, J.I., Kim, S.S., Choi, B.H., Lee, K.L., Ha A.N., … Kong, I.K. (2016). The Anti-Müllerian Hormone Profile is Linked with the In Vitro Embryo Production Capacity and Embryo Viability after Transfer but Cannot Predict Pregnancy Outcome. Reproduction in Domestic Animals, 51, 301–310. http://doi.org/10.1111/rda.12681.

Gobikrushanth, M., Purfield, D.C., Colazo, M.G., Butler, S.T., Wang, Z., & Ambrose, D.J. (2018). The relationship between serum anti-Müllerian hormone concentrations and fertility, and genome-wide associations for anti-Müllerian hormone in Holstein cows. Journal of Dairy Science, 101, 7563–7574. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13940.

Goff, J. P., R. L. Horst & Littledike, E. T. (1982). Effect of the maternal vitamin D status at parturition on the vitamin D status of the neonatal calf. J Nutr., 112(7), 1387-93. https://doi.org/10.1093/jn/112.7.1387.

Gosden, R.G., Laing, S.C., Felicio, L.S., Nelson, J.F., & Finch, C.E. (1983). Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice. Biology of Reproduction, 28, 255-260. https://doi.org/10.1095/biolreprod28.2.255.

Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. Endocrine reviews, 17, 121-156. https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-121.

Guerreiro, B.M., Batista, E.O, Vieira, L.M., Sá Filho, M.F., Rodrigues, C.A., Castro Netto, A., … Baruselli, P.S. (2014). Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors. Domest Anim Endocrinol., 49,96-104. http://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.002.

Guerreiro, B.M., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., Sá Filho, M.F., Rodrigues, C.A., Castro Netto, A., … Baruselli, P.S. (2014). Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors. Domestic Animal Endocrinology, 49:96-104. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.002.

Halhali, A., Acker, G.M., & Garabedian, M. (1991). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces in vivo the decidualization of rat endometrial cells. J Reprod Fertil., 91, 59–64. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910059.

Hansen, K.R., Hodnett, G.M., Knowlton, N. & Craig, L.B. (2011). Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. Fertility and Sterility 95 170–175. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.006.

Hansen, P. (2014). Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. Adv Exp Med Biol, 752, 1-22. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8887-3_1.

Hansen, P.J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. Philos Trans R Soc B Biol Sci., 364, 3341-50. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131.

Heaney, R. P., R. R. Recker, J. Grote, R. L. Horst & Armas L. A. (2010). Vitamin D3 is more potent than vitamin D2 in humans. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 96, E447-E452. https://doi.org/10.1210/jc.2010-2230.

Heaps, L.A., Scudder, C.J., Lipscomb, V.J., Steinbach, S.M., Priestnall, S.L., Martineau, H., … Garden, O.A. (2017). Serum anti-Müllerian hormone concentrations before and after treatment of an ovarian granüloza cell tumour in a cat. J. Feline Med. Surg. Open Rep., 2017, 3, 1–6. https://doi.org/10.1177/2055116917722701.

Herrmann, M., Farrell, C.J.L., Pusceddu, I., Fabregat-Cabello, N., & Cavalier, E. (2017). Assessment of vitamin D status – a changing landscape. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 55, 3–26. https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0264.

Hırayama, H., Naıto, A., Fukuda, S., Fujii, T., Asada, M., Inaba, Y., … Kageyama S. (2017). Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. Journal of Reproduction and Development, 63, 95, 95-100. http://doi.org/10.1262/jrd.2016-019.

Hirayama, H., Naito, A., Fukuda, S., Fujıı, T., Asada, M., Inaba, Y., … Kageyama, S. (2017). Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. J Reprod Dev. Feb., 63(1): 95–100. https://dx.doi.org/10.1262%2Fjrd.2016-019.

Hirshfield, A.N.,& DeSanti, A.M. (1995). Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum. Biology of Reproduction; 53: 1208-1221. https://doi.org/10.1095/biolreprod53.5.1208.

Holick MF. Vitamin D deficiency. N. Engl. J. Med. 2007 Jul 19;357(3):266–81.

Holick, M. F. (2008). Sunlight, UV-radiation, vitamin D and skin cancer: how much sunlight do we need? Advanced Experimental Medicine and Biology, 624, 1-15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77574-6_1.

Holick, M.F. (2006). High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. Mayo Clin. Proc., 81(3), 353–73. https://doi.org/10.4065/81.3.353.

Holick, M.F. (2009). Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. Annals of Epidemiology, 19, 73-78. https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2007.12.001.

Holick, M.F., & Chen, T.C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. Am J Clin Nutr., 87, 1080–6. https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.1080s.

Holick, M.F., Siris, E.S., Binkley, N., Beard, M.K., Khan, A., Katzer, J.T., … Papp A. E.D. (2005). Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. J Clin Endocrinol Metab., 90, 3215–24. https://doi.org/10.1210/jc.2004-2364.

Honda, Y., Suzuki, M., Sato, Y., Kuroda, K., Shoji, H., & Shımızu,T. (2016). Decreased Serum Anti-Müllerian Hormone Level Is Associated with Vitamin D

Deficiency in Healthy Japanese Women. Juntendo Medical Journal, 62, 2, 153-159. https://doi.org/10.14789/jmj.62.153.

Horst, R. L., E. T. Littledike, J. L. Riley & Napoli, J.L. (1981). Quantitation of vitamin D and its metabolites and their plasma concentrations in five species of animals. Analytical Biochemistry, 116, 189-203. https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90344-4.

Horst, R. L., J. P. Goff & Reinhardt, T.A. (1994b). Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. Journal Dairy Science, 77, 1936-51. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(94)77140-x.

Hossam El-Sheikh, A., Go, K.,Toru, T., Shogo, M., Mohammed, S., Ikuo, K., … Takeshi, O. (2017). Plasma anti-Mu¨ llerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset, Biology of Reproduction, 97(1), 153–161. https://doi.org/10.1093/biolre/iox069.

Hymøller, L., & Jensen, S. K. (2010). Stability in the rumen and effect on plasma status of single oral doses of vitamin D and vitamin E in high-yielding dairy cows. Journal of dairy science, 93(12), 5748–5757. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3338.

Hymoller, L., & Jensen, S.K., (2010). Vitamin D(3) synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage. Journal Dairy Science, 93, 2025-9. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2991.

Iiha, G.F., Rovani, M.T., Gasperin, B.G., Ferreira, R., Macedo, M.P., Neto, O.A., … Goncalves P.B.D. (2016). Regulation of anti-müllerian hormone and its receptor expression around follicle deviation in cattle. Reproduction in Domestic Animals, 51(2), 188–194. https://doi.org/10.1111/rda.12662.

Inskeep, E.K. (2004). Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. J Anim. Sci, 82, 24-39. https://doi.org/10.2527/2004.8213_supple24x.

Irani, M., & Merhi, Z. (2014). Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review. Fertil Steril, 102:460–8. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.046.

Irani, M., & Merhi, Z. (2014). Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: A systematic review. Fertil. Steril., 102, 460–468. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.046.

Ireland, J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W, Lonergan, P., & Evans, A.C.O. (2007). 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., 22, 1687-95. https://doi.org/10.1093/humrep/dem071.

Ireland, J.J. (1987). Control of follicular growth and development. Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 34, 39-54.

Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., … Evans, A.C.O. (2011). 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-müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. Reprod Fertil Dev, 23:1-14. www.publish.csiro.au/journals/rfd.

Ireland, J.J., Zielak-Steciwko, A.E., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Bettegowda, A., Scheetz, D., … Evans, A.C.O. (2009). Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. Biology of Reproductıon, 80, 954-64. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073791.

Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., … Ireland JJ. (2008). Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. Biologoy of Reproduction, 79, 1219-1225. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670.

Jacobs, M.H., Reuter, L.M., Baker, V.L., Craig, L.B., Sakkas, D., Surrey, E., & … Timm B. A multicentre evaluation of the Elecsys® anti-Müllerian hormone immunoassay for prediction of antral follicle count. Reprod Biomed Online, 38(5), 845-852. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.12.041.

Jagannatha, S., Keown, J. F., & Van Vleck, L. D. (1998). Estimation of Relative Economic Value for Herd Life of Dairy Cattle from Profile Equations. Journal of Dairy Science, 81(6), 1702–1708. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75737-6.

Jaiswal, R.S (2007). Regülation of follicular wave patter in cattle (Publication no: etd-08302007-163724) [Doctoral dissertation, University of Saskatchewan. Saskatoon, SK Canada]. http://hdl.handle.net/10388/etd-08302007-163724.

Jaiswal, R.S., Singh, J., & Adams, G.P. (2004). Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. Biology of reproduction, 71, 1244–1251. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030726.

Jakobsen, J., Jensen, S.K., Hymøller, L., Wreford Andersen, E., Kaas, P., Burild, A., & Jäpelt, R.B. (2015). Short communication: artificial ultraviolet B light exposure increases vitamin D levels in cow plasma and milk. Journal of Dairy Science 98, 6492–6498. https://doi.org/10.3168/jds.2014-9277.

Jamrozik, J., Fetehi, J., Kistemaker, G. J., & Schaeffer, L. R. (2005). Estimates of genetic parameters for Canadian Holstein female reproduction traits. Journal of Dairy Science, 88(6), 2199–2208. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72895-2.

Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, et al. Which follicles make the most anti-Mullerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. Mol Hum Reprod. 2013;19:519 –527.

Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., … Ireland, J.J. (2009). Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. Biology of Reproduction, 80, 1272-1281. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075093.

Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D.M., Neuder, L.M., Ireland, J.L., Pursley, J.R., Smith, G.W. (2015). Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. Journal of Dairy Science, 98, 3036-45. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8130.

Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D.M., Neuder, M., Ireland, J.L.H, Pursley, J.R., Smith, G.W., … Evans, A.C.O. (2004). Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. J. Dairy Sci., 98, 3036–3045. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8130.

Jost, A. Problems of fetal endocrinology. (1953). The gonadal and hypophyseal hormones. Recent Prog. Horm. Res., 8, 379–413.

Jukic, A.M., Steiner, A.Z., & Baird DD. (2015). Lower plasma 25-hydroxyvitamin D is associated with irregular menstrual cycles in a cross-sectional study. Reprod Biol Endocrinol., 11, 13-20. https://doi.org/10.1186/s12958-015-0012-5.

Jukic, A.M., Upson, K, Harmon, Q.E., & Baird D.D. (2016). Increasing serum 25-hydroxyvitamin D is associated with reduced odds of long menstrual cycles in a cross-sectional study of African American women. Fertil Steril., 106, 172–9.e2. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.03.004.

Jukic, A.M., Steiner, A.Z., Baird, D.D. (2015). Association between serum 25-hydroxyvitamin D and ovarian reserve in premenopausal women. Menopause, 22(3), 312-6. https://doi.org/10.1097/gme.0000000000000312.

Kawamata, M. (1994). Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. J Vet Med Sci., 56, 965-7. https://doi.org/10.1292/jvms.56.965.

Kaya, F. (2020). Yüksek Süt Verimli İneklere Laktasyon Başlangıcında D Vitamini Uygulanmasının Yangısal Parametrelere, Karaciğer Aktivite Ve Fonksiyon İndeksi Üzerine Etkisi

Kevenaar, M.E., Meerasahib, M.F., Kramer, P., van de Lang-Born, B.M., de Jong, F.H., Groome, N.P., … Visser, J.A. (2006). Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice, Endocrinology, 147, 3228–3234. https://doi.org/10.1210/en.2005-1588.

Kitahara, G., Nambo, Y., El-Sheikh Ali, H., Kajisa, M., Tani, M., Nibe, K., & Kamimura, S. (2012). Anti-Müllerian hormone profiles as a novel biomarker to diagnose granüloza-theca cell tumors in cattle. J. Reprod. Dev., 58, 98–104. https://doi.org/10.1262/jrd.11-101t.

Kuijper, E.A.M., Ket, J.C.F., Caanen, M.R., & Lambalk, C.B. (2013). Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. Reprod. Biomed. Online 27, 33–63. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.03.009.

Larson, R.L., & Randle, R.F. (2007). Heifer development: nutrition, health, and reproduction. Youngquist, R.S., & Threlfall, W.R. (Eds.), Large Animal Theriogenology. Saunders Elsevier, St. Louis, MO,(pp. 457–463). https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.11.003.

Le Cozler, Y., Lollivier, V., Lacasse, P., & Disenhaus, C. (2008). Rearing strategy and optimizing first-calving targets in dairy heifers: A review. Animal, 2(9), 1393–1404. https://doi.org/10.1017/S1751731108002498.

Lea, R.G., Andrade, L.P., Rae, M.T., Hannah, L.T., Kyle, C.E., Murray, J.F., … Miller, D.W. (2006). Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. Reproduction, 131, 113-24. https://doi.org/10.1530/rep.1.00844.

Lee, M.M., Donahoe, P.K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G.B., Best, S., … MacLaughlin, D.T., 1996. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 571–576. https://doi.org/10.1210/jcem.81.2.8636269.

Lee, M.M., Donahoe, P.K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G.B., Best, S., ... MacLaughlin, D.T. (1996). Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. J. Clin. Endocrinol. Metab., 81, 571–576. https://doi.org/10.1210/jcem.81.2.8636269.

Lesmeister, J.L., Burfening, P.J., & Blackwell, R.L. (1973). Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. Journal of Animal Science, 36, 1–6. https://doi.org/10.2527/jas1973.3611.

Littledike, E. T. & Horst R. L. (1982). Vitamin D3 toxicity in dairy cows. Journal Dairy Science, 65, 749-59. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(82)82263-7.

Luk, J., Torrealday, S., Neal Perry, G., & Pal, L. (2012). Relevance of vitamin D in reproduction. Hum. Reprod., 27,3015–3027. https://doi.org/10.1093/humrep/des248.

Lundy, T., Smith, P., O'Connell , A., Hudson, N.L., & McNatty KP (1999). Populations of granüloza cells in small follicles of the sheep ovary. Journal of Reproduction and Fertility, 115, 251-262. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1150251.

MacLaughlin, D.T., & Donahoe, P.K. (2004). Sex determination and differentiation. N. Engl. J. Med., 350, 367–378. https://doi.org/10.1056/nejmra022784.

Malloy, P.J., Peng, L., Wang, J., & Feldman, D. (2009). Interaction of the vitamin D receptor with a vitamin D response element in the Mullerian-inhibiting substance (MIS) promoter: regulation of MIS expression by calcitriol in prostate cancer cells. Endocrinology, 150, 1580–1587. https://doi.org/10.1210/en.2008-1555.

Marca, A.L., Signiholfi, G., Radi, D., Argento, C., Baraldi, E., Carducci Artenisio, A., … Volpe, A. (2010). Anti- Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). Human Reproduction update. 16(2), 113-130. https://doi.org/10.1093/humupd/dmp036.

Martinez, M.F., Sanderson, N., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., & Juengel, J.L. (2016). Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. Theriogenology, 85, 466-475. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.026.

Maurer, R., & Echternkamp, S. (1985). Repeat-breeder females in beef cattle: influences and causes. J Anim Sci., 61, 624-36.

McGee, E.A., Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocrine Reviews, 21, 200-214. https://doi:10.1210/edrv.21.2.0394.

McKinley, M.J., Oldfield, B.J., & Vivas, L. (1992). Osmotic and hormonal regulation of thirst in domestic animals. Domestic Animal Endocrinology, 9, 1–11. https://doi.org/10.1016/0739-7240(92)90004-H.

McLennan, I.S., & Pankhurst, M.W. (2015). Anti-Mullerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions. J. Endocrinol., 226, R45–57. https://doi.org/10.1530/joe-15-0206.

Mello, J.R.B. (2003). Review calcinosis–calcinogenic plants. Toxicon 41, 1–12. https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00241-6.

Merhi Z, Seifer DB,Weedon J, et al. Circulating vitamin D correlates with serum antimullerian hormone levels in late-reproductive-aged women: Women's Interagency HIV Study. Fertil Steril. 2012;98:228 –234.

Merhi, Z., Doswell, A., Krebs, K., & Cipolla, M. (2014). Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granüloza cells. J. Clin. Endocrinol. Metab., 99, E1137–E1145. https://doi.org/10.1210/jc.2013-4161.

Modina, S.C., Tessaro, I., Lodde, V., Franciosi, F., Corbani, D., & Luciano, A.M. (2014). Reductions in the number of mid-sized antral follicles are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. Reproduction, Fertility and Development, 26, 235-244. https://doi.org/10.1071/RD12295.

Monniaux D, Clemente, N, Touze, J.L., Belville, C., Rico, C., Bontoux, M., … Fabre, S. (2008). Intrafolicular steroids and anti-müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. Biology of reproduction, 79, 387-396. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065847.

Monniaux, D., Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y., & Larroque, H. (2010). Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? Reprod Fertil Dev., 22, 1083-91. https://doi.org/10.1071/rd09279.

Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touzé, J.-L., … Fabre, S. (2013). Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. Reproduction, Fertility and Development, 25, 1–16. http://doi.org/10.1071/RD12270.

Morotti, F., Santos, G.M.G., Koetz Júnior, C., Silva-Santos, K.C., Roso, V.M., & Seneda, M.M. (2017). Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. Theriogenology, 91, 21-26. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.025.

Mossa, F., Carter, F., Walsh, S.W., Kenny, D.A., Smith, G.W., Ireland, J.L., … Evans, A. (2013). Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. Biol Reprod., 88,92. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107235.

Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L., Smith, G.W., Lonergan, P., … Ireland, J.J. (2010a). Evidence that high variation in antral follicle count during

follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. Reproduction, 140,713-720. https://doi.org/10.1530/REP-10-0214.

Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D.M., Weber-Nielsen, M., Evans, A.C.O., & Ireland, J.J. (2017). Anti-Müllerian hormone (AMH) and fertility management in agriculturral species. Reproduction, 154 R1-R11, 1741- 7899. https://doi.org/10.1530/REP-17-0104.

Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Walsh, S., Berry, D.P., Butler, S.T., Folger, J., … Ireland, J.J. (2010b). Inherent capacity of the pituitary gland to produce gonadotropins is not influenced by the number of ovarian follicles ≥3 mm in diameter in cattle. Reproduction Fertility and Development, 22, 550–557. https://doi.org/10.1071/RD09100.

Mossa, Francesca., & Ireland J.J. (2019). Anti-Müllerian hormone: a biomarker for the ovarian reserve, ovarian function, and fertility in dairy cows. J. Anim. Sci., 97, 1446–1455. http://doi.org/10.1093/jas/skz022.

Mossa. F, Walsh, S.W., Butler, S.T., Berry, D.P., Carter, F., Lonergan, P., … Evans, A.C.O. (2012). Low numbers of ovarian follicles ≥3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. J. Dairy Sci., 95, 2355 -61. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4325.

Nabenishi, H., Kitahara, G., Takagi, S., Yamazaki, A. & Osawa, T. (2017). Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle. Domestic Animal Endocrinology, 60, 19–24. http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.01.002.

Naderi, Z., Kashanian, M., Chenari, L., & Sheikhansari N. (2018). Evaluating the effects of administration of 25-hydroxyvitamin D supplement on serum anti-mullerian hormone (AMH) levels in infertile women. Gynecol Endocrinol., 34(5), 409-412. https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1410785.

Nawaz, M.Y., Jimenez-Krassel, F., Steibel, J.P., Lu, Y., Baktula, A., Vukasinovic, N., … Tempelman, R.J. (2018). Genomic heritability and genome-wide association analysis of anti-Müllerian hormone in Holstein dairy heifers. Journal of Dairy Science, 101, 8063–8075. https://doi.org/10.3168/jds.2018-14798.

NCBI. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed (accessed on 3 April 2019).

Nelson ,S.M., Anderson, R.A., Broekmans, F.J., Raine-Fenning. N., Fleming, R. & La Marca, A. (2012). Anti-Müllerian hormone: clairvoyance or crystal clear? Human Reproduction, 27, 631–636. https://doi.org/10.1093/humrep/der446.

Nelson, C. D., Powell, J. L., Price, D. M., Hersom, M. J., Yelich, J. V., Drewnoski, M. E.,… Bridges, G. A. (2016). Assessment of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations of beef cows and calves across seasons and geographical locations. Journal of animal science, 94(9), 3958–3965. https://doi.org/10.2527/jas.2016-0611.

Nelson, C.D., Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A., Sacco, R.E., Powell, J.L., Drewnoski, M.E. …, Weiss, W.P. (2016). Vitamin D status of dairy cattle: outcomes of current

practices in the dairy industry. Journal of Dairy Science, 99, 10150–10160. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11727.

Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D., Sacco, R.E., & Nonnecke, B.J. (2012). Vitamin D signaling in the bovine immune system: a model for understanding human vitamin D requirements. Nutrients, 4, 181–196. https://doi.org/10.3390/nu4030181.

Nelson, S.M. (2013). Biomarkers of ovarian response: current and future applications. Fertil Steril., 99, 963-9. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.051.

Nelson, S.M., Stewart, F., Fleming, R., & Freeman, D.J. (2010). Longitudinal assessment of antimulerian hormone during pregnancy- relationship with maternal adiposity, insulin, and adiponectin. Fertil. Steril. 93, 1356–1358. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.07.1676.

Nilsson, E.E., Skinner, M.K. (2009). Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. Mol Cell Endocrinol., 313, 9-16. https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.09.004.

Noakes, D. (2001). Endogeneus and exogeneus control of ovarian cyclicity. Noakes, D. , England G.C.V & Arthur G.F. (Eds.). Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8th edt., London: Wb Saunders Company (pp: 3-53).

NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. Washington, D.C.: National Academy Press.

Oliveira, J., Neves, J.P., Moraes, J.C., Gonçalves, P.B., Bahr, J.M., Hernandez, A.G., & Costa, L.F. (2002). Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. Anim Reprod Sci., 73:1-10. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(02)00116-1.

Ozkan, S., Jindal, S., Greenseid, K., Shu, J., Zeitlian, G., & Hickmon, C. (2010). Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. Fertil Steril, 94, 1314–9. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.019.

Paffoni, A., Ferrari, S., Vigano, P., Pagliardini, L., Papaleo, E., Candiani, M., … Somigliana, E. (2014). Vitamin D deficiency and infertility: insights from in vitro fertilization cycles. J Clin Endocrinol Metab, 99, 2372–6. https://doi.org/10.1210/jc.2014-1802.

Pagliardini, L., Vigano, P., Molgora, M., Persico, P., Salonia, A., Vailati, S.H., … Candiani, M. (2015). High prevalence of vitamin D deficiency in infertile women referring for assisted reproduction. Nutrients 2015;7:9972–84. https://doi.org/10.3390/nu7125516.

Pal, L., Zhang, H., Williams, J., Santoro, N.F., Diamond, M.P., Schlaff, W.D., … Legro, S.D. (2016). Vitamin D status relates to reproductive outcome in women with polycystic ovary syndrome: secondary analysis of a multicenter randomized controlled trial. J Clin Endocrinol Metab, 101, 3027–35. https://doi.org/10.1210/jc.2015-4352.

Pankhurst, M.W., Clark, C.A., Zarek, J., Laskin, C.A., & McLennan, I.S. (2016). Changes in circulating ProAMH and total AMH during healthy pregnancy and post-

partum: a longitudinal study. PLoS One 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162509.

Pellatt, L., Rice, S., Dilaver, N., Heshri, A., Galea, R., Brincat, M., … Mason, H. (2011). Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle stimulating hormone in human granüloza cells. Fertility and Sterility, 96(5), 1246–1251. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.08.015.

Perry, G.A. (2016). Factors affecting puberty in replacement beef heifers. Theriogenology, 86, 373–378. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.051.

Pfeiffer, K.E., Jury, L.J., & Larson, J.E. (2014). Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. Domestic Animal Endocrinology ,46, 58–64. http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.05.004.

Picard, J.Y., & Josso, N. (1984). Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. Mol. Cell. Endocrinol., 34, 23–29. https://doi.org/10.1016/0303-7207(84)90155-2.

Picon, R. (1969). Action du testicule foetal sur le développement in vitro des canaux de Müller chez le rat. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp., 58, 1–19.

Pohler, K.G., Geary, T.W., Atkins, J.A., Perry, G.A., Jinks, E.M., & Smith, M.F. (2012). Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. Cell Tissue Res, 349, 649-664. https://doi.org/10.1007/s00441-012-1386-8.

Poole, D.H., Ocon-Grove, O. M., & Johnson, A.L. (2016). Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type II expression and AMH activity in bovine granüloza cells. Journal of Theriogenology, 86(5), 1353–1360. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.078.

Rae, M.T., Kyle, C.E., Miller, D.W., Hammond, A.J., Brooks, A.N., & Rhind, S.M. (2002). The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. Anim Reprod Sci., 72, 63-71. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(02)00068-4.

Rae, M.T., Palassio, S., Kyle, C.E., Brooks, A.N., Lea, R.G., Miller, D.W., & Rhind S.M. (2001). Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. Reproduction, 122, 915-22.

Randel, R. D., & Jr, T. H. W. (2015). Joint Alpharma-beef Species Symposium : Interactions of feed efficiency with beef heifer reproductive development JOINT ALPHARMA-BEEF SPECIES SYMPOSIUM : Interactions of feed ef fi ciency with beef heifer reproductive development 1, (September). https://doi.org/10.2527/jas2012-5679.

Rawlings, N. C., Evans, A. C. O., Honaramooz, A., & Bartlewski, P. M. (2003). Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle , sheep and goats. Animal Reproduction, 78, 259–270. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00094-0.

Reinhardt, T.A., & Hustmyer, F.G. (1987). Role of vitamin D in the immune system. Journal of Dairy Science, 70, 952–962. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(87)80099-1.

Ribeiro, E.S., Bisinotto, R.S., Lima, F.S., Greco, L.F., Morrison A., Kumar, A., … Santos, J.E.P. (2014). Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. J. Dairy Sci., 97, 6888-900. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-7908.

Richardson, M.C., Guo, M., Fauser, B.C., & Macklon, N.S. (2014). Environmental and developmental origins of ovarian reserve. Hum. Reprod. Update, 20, 353–369. https://doi.org/10.1093/humupd/dmt057.

Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbiès-Tran, R., Jarrier, P., Touzé, J.L., … Monniaux, D. (2012). 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, 24,932-944. http://dx.doi.org/10.1071/RD11290.

Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., Di Clemente, N., Clément, F., Bontoux, M., … Monniaux D. (2009). Anti-müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. Biology of Reproduction, 80, 50-59. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157.

Rico, C., Medigue, C., Fabre, S., Jarrier, M., Bontoux, M., Clément, F., Monniaux, D. (2011). Regulation of anti-müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular and granüloza cell levels. Biology of Reproduction. 84(3): 560–571. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088187.

Russe, I. (1983). Oogenesis in cattle and sheep. Biblthca anatomica, 24, 77-92.

Rüsse, I. (1983). Oogenesis in cattle and sheep. Bibl Anat., 24, 77-92.

Sakatani, M., Yamanaka, K., Kobayashi, S., & Takahashi, M. (2008). Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in in vitro early stage bovine embryos. J Reprod Dev., 54, 496-501. https://doi.org/10.1262/jrd.20017.

Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Barreiros, T.R.R., Morotti, F., Sanches. B.V., de Moraes, F.L.Z., … Seneda, M.M. (2016). High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. Anim Reprod Sci, 165, 17-21. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.024.

Santos, G.M.G., Silva-Santos, K.C., Siloto, L.S., Morotti, F., Marcantonio, T.N., Marinho, L.S.R., … Seneda, M.M. (2012). Dinâmica folicular em fêmeas bovinas de alta, média e baixa contagem de folículos antrais: resultados preliminares. Acta Sci Vet, 40, 422.

Scheetz, D., Folger, J.K., Smith, G.W. & Ireland, J.J. (2012). Granüloza cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. Reproduction Fertility and Development, 24, 327–336. https://doi.org/10.1071/RD11020.

Sempos, C.T., Vesper, H.W., Phinney, K.W., Thienpont, L.M., & Coates, P.M. (2012). The Vitamin D Standardization Program (VDSP). Vitamin D Status as an International Issue: National Surveys and the Problem of Standardization. Scan J Clinical Lab Invest., 2012, 72 (Suppl 243), 32–40. https://doi.org/10.3109/00365513.2012.681935.

Senger, P.L. (1997). Embryogenesis of the pituitary gland and the male or female reproductive system. In: Pathways to pregnancy and parturition. Current conception Inc., 1 th edt. (pp: 58-76).

Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B., Cousins, R.J., Editors. (2005). Modern Nutrition in Health and Disease. Tenth. Lippincott Williams & Wilkins.

Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Koetz Júnior, C., Morotti, F., Siloto, L.S., Marcantonio, T.N., Urbano MR, … Seneda, M.M. (2014a). Antral follicle populations and embryo production - in vitro and in vivo - of Bos indicus-taurus donors from weaning to yearling ages. Reprod Domest Anim, 49, 228-232. https://doi.org/10.1111/rda.12255.

Silva-Santos, K.C., Siloto, L.S., Santos, G.M.C., Morotti, F., Marcantonio, T.N., & Seneda, M.M. (2014b). Comparison of antral and pre-antral ovarian follicle populations between Bos indicus and Bos indicus-taurus cows with high or low antral follicles counts. Reproduction in Domestic Animals, 49, 48-51. https://doi.org/10.1111/rda.12222.

Singh, J., Domınguez, M., Jaiswal, R., & Adams, G.P. (2004). A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. Theriogenology, 62, 227-43. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.020.

Small, J.A., Charmley, E., & Kennedy, A.D. (2000). The performance of primiparous and multiparous beef cows rearing single and simulated-twin calves. Can. J. Anim. Sci., 80, 569–576. https://doi.org/10.4141/A99-087.

Smitz, J.E.J., & Cortvrindt, R.G. (2002). The earliest stages of folliculogenesis in vitro. Reproduction, 123, 185-202. https://doi.org/10.1530/rep.0.1230185.

Sommerfeldt, J. L., J. L. Napoli, E. T. Littledike, D. C. Beitz & Horst R.L. (1983). Metabolism of orally administered [3H]ergocalciferol and [3H]cholecalciferol by dairy calves. Journal of Nutrition, 113, 2595-600. https://doi.org/10.1093/jn/113.12.2595.

Souza, A.H., Carvalho, P.D., Rozner, A.E., Vieira, L.M, Hackbart, K.S., Bender, R.W. … Wiltbank, M.C. (2015). Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. Journal of Dairy Science, 98, 169–178. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182.

Steckler, T., Wang, J., Bartol, F.F., Roy, S.K., & Padmanabhan V. (2005). Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. Endocrinology, 146, 3185-93. https://doi.org/10.1210/en.2004-1444.

Stein, L.E., & Anderson, E.H. (1979). A qualitative and quantitative study of rete ovarii development in the fetal rat: correlation with the onset of meiosis and follicle

cell appearance. Anatomical Record, 193, 197-211. https://doi.org/10.1002/ar.1091930203.

Steiner, A.Z., Herring, A.H., Kesner, J.S., Meadows, J.W., Stanczyk, F.Z., Hoberman, S., & Baird, D.D. (2011). Antimüllerian hormone as a predictor of natural fecundability in women aged 30-42 years. Obstet Gynecol., 117(4), 798-804. https://doi.org/10.1097/aog.0b013e3182116bc8.

Stevenson, JS. (1997). Clinical reproductive physiology of the cow. Youngqist, R.D, (Eds.). Current Therapy in Large Animal Theriogenelogy. 2th edt., Philedelphia: Wb Saunders Company (pp: 257-267).

Stojsin-Carter, A., Costa, N., De Morais, R., De Bem, Tiago., Costa, M., Carter, T., … King W.A. (2017). Fetal sex alters maternal anti-Mullerian hormone during pregnancy in cattle. Animal Reproduction Science, 186, 85-92. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.09.010.

Sümer, S., Öner, R., Öğüş, A., & Öner, C. (Ed.). (2011). Genetik Kavramlar (8. Baskı) içinde (s.300-306). Ankara:Palme Yayıncılık .

Şenünver, A. & Nak, Y. (Ed.). (2019). İnfertilite. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Üçüncü Baskı., Malatya: Medipres Yayınları (s. 321-367).

Tao, S., Dahl, G.E. (2013). Invited review: heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. J Dairy Sci., 96, 4079-93. https://doi.org/10.3168/jds.2012-6278.

Tessaro, I., Luciano, A.M., Franciosi, F., Lodde, V., Corbani, D., & Modina S.C. (2011). The endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide system is involved in the defective quality of bovine oocytes from low mid-antral follicle count ovaries. J. Anim. Sci., 89, 2389-2396. https://doi.org/10.2527/jas.2010-3714.

Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. Mayo Clin. Proc. 2011 Jan;86(1):50–60.

Thienpont LM, Stepman HCM, Vesper HW. Standardization of Measurements of

Thompson, J. N., & Hidiroglou, M. (1983). Effect of large oral and intravenous doses of vitamins D2 and D3 on vitamin D in milk. Journal of dairy science, 66(8), 1638–1643. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81986-9.

Thys-Jacobs, S., Donovan, D., Papadopoulos, A., Sarrel, P., & Bilezikian, J.P. (1999). Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome. Steroids , 64, 430–5. https://doi.org/10.1016/s0039-128x(99)00012-4.

Tilbrook, A.J., de Kretser, D.M., & Clarke, I.J. (1992). A role for inhibin in the regulation of the secretion of follicle stimulating hormone in male domestic animals. Domestic Animal Endocrinology, 9, 243–260. https://doi.org/10.1016/0739-7240(92)90013-N.

Tomkins, N.W., Elliott, R., McGrath, J.J. , & Schatz, T. (2020). Managing plasma P concentrations in beef heifers with a slow release vitamin D supplementation. Animal Production Science, 60, 610–617. https://doi.org/10.1071/AN17601.

Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. Acta Derm. Venereol. 2011 Mar;91(2):115–24.

Tsuruta, S., Misztal, I., & Lawlor, T. J. (2005). Changing Definition of Productive Life in US Holsteins : Effect on Genetic Correlations. Journal of Dairy Science, 88(3), 1156–1165. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72782-X.

Vernunft, A., Schwerhoff, M., Viergutz, T., Dıederıch, M., & Kuwer, A. (2015). Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. Journal of Reproduction and Development, 61,74–79. https://doi.org/10.1262/jrd.2014-091.

Verstuyf, A., Carmeliet, G, Bouillon, R., & Mathieu, C. (2010). Vitamin D: a pleiotropic hormone. Kidney Int, 78, 140–5. https://doi.org/10.1038/ki.2010.17.

Vigier, B., Tran, D., Legeai, L., Bezard, J., Josso, N. (1984a). Origin of anti-Mullerian hormone in bovine freemartin fetuses. J. Reprod. Fertil., 70, 473–479. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700473.

Visser, J.A., & Themmen, A.P.N. (2005). Anti- Müllerian hormone ve folliculogenesis. Moleculer and Celluler Endocrinology, 234, 81-86. https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.09.008.

Wallis, G. (1938). Some effects of a vitamin D deficiency on mature dairy cows. Journal of Dairy Science, 21, 315-333.

Walsh, S.W., Mossa, F., Butler, S.T., Berry, D.P., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., … Ireland, J.J. (2014). Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. Journal of Dairy Science, 97,4503-4511. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7758.

Walter, B., Coelfen, A., Jäger, K., Reese, S., Meyer-Lindenberg, A., & Aupperle-Lellbach, H. (2018). Anti-Muellerian hormone concentration in bitches with histopathologically diagnosed ovarian tumours and cysts. Reprod. Domest. Anim., 53, 784–792. https://doi.org/10.1111/rda.13171.

Wathes, D.C., Pollott, G.E., Johnson, K.F., Richardson, H., & Cooke, J.S. (2014). Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. Animal, 8, 91–104. https://doi.org/10.1017/s1751731114000755.

Webb, R., Buratini, J., Gutierrez, C. G., & Campbell, B. K. (2016). Follicle development and selection : Past , present and future, (January 2017). https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR883.

Wehrman, M.E., Kojima, F.N., Sanchez, T., Mariscal, D.V., & Kinder JE. (1996). Incidence of precocious puberty in developing beef heifers. Journal of Animal Science, 74, 2462–2467. https://doi.org/10.2527/1996.74102462x.

Winship, A.L., Gazzard, S.E., Cullen-McEwen, L.A., Bertram, J.F., & Hutt, K.J. Maternal low protein diet programmes low ovarian reserve in offspring. Reproduction, 156(4), 299–311. https://doi.org/10.1530/REP-18-0247.

Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. Anim Reprod Sci., 60-61, 535-47. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00102-0.

Wrobel, K.H., Süss, F. (1998). Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. Anat Embryol (Berl)., 197, 451-67. https://doi.org/10.1007/s004290050156.

Xu, J., Hennebold, J.D., & Seifer, D.B. (2016). Direct vitamin D3 actions on rhesus macaque follicles in three-dimensional culture: assessment of follicle survival, growth, steroid, and antimüllerian hormone production. Fertil Steril., 106(7), 1815-1820. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.037.

Xu, J., Lawson, M.S., Xu, F., Du, Y., Tkachenko, O.Y., Bishop, C.V., … Hennebold, J.D. (2018). Vitamin D3 Regulates Follicular Development and Intrafollicular Vitamin D Biosynthesis and Signaling in the Primate Ovary. Front Physiol., 14, 9, 1600. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01600.

Yang, M.Y., & Fortune, J.E. (2008). The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. Biol Reprod., 78, 1153-61. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066688.

Yang, M.Y., Cushman, R.A., & Fortune, J.E. (2017). Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles. Molecular Human Reproduction, 23(5), 282–291. https://doi.org/10.1093/molehr/gax010.

Yao, X., Wang, Z., El-Samahy, M.A., Ren, C., Liu, Z., Wang, F., & You, P. (2020). Roles of vitamin D and its receptor in the proliferation and apoptosis of luteinised granüloza cells in the goat. Reprod Fertil Dev., 32(3), 335-348. doi: 10.1071/RD18442. https://doi.org/10.1071/rd18442.

Zanini, B.M., Andrade, K.R.S., Pradiee, J., Veiga, G.B., Garcia, D.N., Mondadori, R.G., … Schneider A. (2020). Calorie restriction during gestation affects ovarian reserve in offspring in the mouse. Reprod Fertil Dev., 32(18):1338-1349. https://doi.org/10.1071/RD20107.

Zeron, Y., Ocheretny, A., Kedar, O., Borochov, A., Sklan, D., & Arav, A. (2001). Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. Reproduction, 121, 447-54.

Zık, B. (2019). Genel Embriyoloji. Bursa: Ezgi Kitapevi, (s:1-78).

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

IU: İnternasyonal Ünite

L: Litre

ml: Mililitre

mm: Milimetre

ng: Nanogram

nm: Nanometre

pg: Pikogram

1,25(OH)$_2$D: 1,25 dihidroksi Vitamin D/ Kalsitriol

25(OH)D: 25 Hidroksi Vitamin D

AFS: Antral Folikül Sayısı

AMH: Anti Müllerian Hormon

bFGF: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü

BMP-15: Kemik Morfogenetik Protein-15

CL: Korpus Luteum

FIG-α: Germ Hücreleri için Spesifik Farklılaşma Faktörü-α

FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon

GDF-9: Büyüme Farklılaşma Faktörü- 9

GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

GWAS: Genom boyu ilişki analizi

H_2O_2: Hidrojen Peroksit

LC-MS/MS: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/ Kütle Spektrometresi

LH: Lüteinleştirici Hormon

NRC: National Research Council

OPU: Ovum Pick-up

PTH: Parathormon

PTSGS: Prostaglandin-endoperoksidaz Sentaz

RANKL: Nükleer Faktör –Kb

SF: Steroidogenik Faktör

SHS: Somatik Hücre Sayısı

SNP: Tek nükleotid polimorfizim

STAR: Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein

TGF-β: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β

VDBP: D Vitamini Bağlayıcı Protein

VDR: Vitamin D Reseptörü

VDRE: D Vitamini Yanıt Elemanı

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

8. EKLER

EK-1

SIRA NO	KÜPE NO	YAŞ	CANLI AĞIRLIK
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			

EK-2

		AMH/25(OH) D NUMUNE ALIMI			
SIRA NO	KÜPE NO	0. Gün	7. Gün	14. Gün	28. Gün
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					

EK-3

		AMH/25(OH) D DÜZEYLERİ			
SIRA NO	KÜPE NO	0. Gün	7. Gün	14. Gün	28. Gün
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					

EK-4

10.01.2020

İLGİLİ MAKAMA

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yavuz NAK'ın danışmanı olduğu Araş. Gör. Davut KOCA'nın "Siyah Alaca Sütçü Düvelerde Vitamin D_3 Uygulamalarının Kan Serumu Anti-Müllerin Hormon Seviyesine Üzerine Etkileri " adlı doktora tez çalışmasının çiftliğimizde yürütülmesi uygun görülmüştür.

İTİMAT PEYNİRCİLİK SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİ

İMALAT PAZARLAMA SANAYİ TİCARET A.Ş.

İşletme Kayıt Numarası: TR16298432

ADRES: Demirboğa Köyü, Yenişehir/Bursa

Yiğit GEZEROĞLU
Veteriner Hekimi
Dip.No: 1999-1360
Suni Tah.No: 143

İTİMAT PEYNİRCİLİK
SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİ İMALAT
PAZARLAMA SANAYİ TİCARET A.Ş.
DEMİRBOĞA ÇİFTLİĞİ
Demirboğa Köyü YENİŞEHİR-BURSA
Anadolu Kurumlar V.D. 283 000 2881

Sorumlu Veteriner Hekim

Yiğit GEZEROĞLU

EK-5

PDF.js viewer https://e-belge.tarim.gov.tr/edys-web/pdfjs19/web/viewer.xhtml?fil...

T.C.
BURSA VALİLİĞİ
İl Tarım ve Orman Müdürlüğü

15 Ocak 3 BURSA

Sayı :61352012-325.04.02-E.164316 15.01.2020
Konu :Çalışma İzinleri

Sayın Prof. Dr. Yavuz NAK
Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Görükle Kampüsü NİLÜFER / BURSA

İlgi : 14.01.2020 tarihli ve E. 148629 sayılı başvurunuz.

İlgide kayıtlı dilekçenizde, yürütücüsü olduğunuz "Siyah Alaca Sütçü Düvelerde Vitamin D3 Uygulamalarının Kan Serumu Anti-Müllerin Hormon Seviyesine Üzerine Etkileri" isimli projenin Bakanlığımız veri tabanında TR16298432 numara ile kayıtlı işletmede yapılacağı, çalışmada 11-13 aylık 60 adet siyah alaca düve kullanılacağı hayvan refahı, hayvan ve halk sağlığının korunmasından Veteriner Hekim Yiğit GEZEROĞLU'nun sorumlu olduğu projeye izin verilmesi talep edilmektedir.

Konu 13.12.2011 tarih ve 28141 sayılı Resmi Gazete'de Yayımlanarak yürürlüğe giren "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik" çerçevesinde incelenmiş olup 01.02.2020-01.05.2020 tarihleri arasında yapılacak proje, Yönetmeliğin 19. maddesi gereğince uygun görülmüştür. İzin hayvan refahının sağlanması ve yer için verilmiş olup, yerel etik kurul izni yerine geçmez.

Projede kullanılan hayvanlara ait bilgilerin 2021 yılı Ocak ayının 15'ine kadar proje yürütücüsü tarafından Yönetmeliğin Ek-11 ve Ek-13 'üne doldurularak İl Müdürlüğümüze teslim edilmesi gerekmektedir.

Bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır
Hamit AYGÜL
Vali a.
İl Müdürü

5070 Sayılı Kanun gereğince E-İMZA ile ... tasdik olunur. ..... 15 Ocak 2020
MUHUR Adı Soyadı Ünvanı İmzası
Bahattin KAHRAMAN

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evrak Doğrulama Kodu : FGMUEPVA Evrak Takip Adresi: https://www.turkiye.gov.tr/tarim-ve-orman-bakanligi-ebys
Adalet Mah. 1.Hürriyet Cad No:98 Osmangazi Bursa
Tel: (0224) 246 42 30 Faks:(0224) 247 43 24

Bilgi için:Figen KAHRAMAN
Veteriner Hekim

EK-6

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Sayı: B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/27 28.01.2020

Konu: Araştırma Projeniz

Sayın Prof. Dr. Yavuz NAK

Yürütücüsü olduğunuz "*Siyah Alaca Sütçü Düvelerde Vitamin D3 Uygulamalarının Kan Serumu Anti-Müllerin Hormon Seviyesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması*" isimli çalışmanız Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28.01.2020 tarihli toplantısında görüşülmüş olup kurul kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY
HADYEK Başkanı

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*Siyah Alaca Sütçü Düvelerde Vitamin D3 Uygulamalarının Kan Serumu Anti-Müllerin Hormon Seviyesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Yavuz NAK BUÜ Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Doç. Dr. Musa Özgür ÖZYİĞİT Araş. Gör. Davut KOCA
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Davut KOCA'nın Doktora Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.02.2020 – 01.05.2020
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	60 Adet Dişi Sığır

	Belge Adı	Tarihi
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	**21.01.2020**

KARAR BİLGİLERİ

Karar No : 2020 - 02 / 11 **Tarih : 28.01.2020**

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırıcıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi.

1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması,
2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması,
3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi,
4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması,
5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR Üye	Tıp- Anatomi	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Dr.Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Murat YALÇIN Üye	Veteriner-Fizyoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Doç. Dr. Özgür ÖZYİĞİT Üye	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	■ E ☐ H			
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ■ H			
Asiye Işıl SEZER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Diş Hekimi	☐ E ■ H			
Filiz KUNLAR Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ■ H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	BUÜ-DEHYUAM	☐ E ■ H			

9. TEŞEKKÜR

Her insanın doğumu ile başlayan, içerisinde mutluluk, hüzün, başarı, hayal kırıklıkları içeren sayısız anların bulunduğu bir hayat yolculuğu vardır. Bu uzun yolculukta ilk yol göstericilerimiz anne ve babalarımızdır. Kalpleri bir güvercin kalbi gibi evlat duygusu ile titrerken umut, sevgi ve hoşgörü dolu bir yaşamın temellerinide atan onlardır. Akademik bireyler için hayatın önemli dönüm noktalarından birisi de doktora eğitim sürecidir. Bu eğitim sürecinde yegane kılavuzlarımız danışman hocalarımızdır. Eğitim sürecimde şahsım için her türlü bilgi, tecrübe ve yönlendirmeleriyle ayrıca insani ve ahlaki değerleri ile örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur ve gurur duyduğum saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Yavuz NAK ve Prof. Dr. Deniz NAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez jürisinde yer alan ve tezimin iyileştirilmesine yönelik yapıcı eleştiri ve katkılarda bulunan değerli hocam Prof. Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT'e, doktora eğitimimin başından itibaren her türlü akademik imkan ve desteği sağlayan ve beni yönlendiren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sait ŞENDAĞ'a çok teşekkür ederim. İstatistik analizlerinin yapılmasında büyük emeği ve katkıları olan Prof. Dr. İlker ERCAN'a, Doktora eğitimim boyunca bünyesinde bulunduğum, ders aldığım ve pek çok yönden bana tecrübe kazandıran Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve eğitimim boyunca bana rahat ve huzurlu bir çalışma ortamı sunan Bursa Uludağ Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve Veteriner Fakültesine teşekkür etmeyi bir borç bilirim. TÜBİTAK-TOVAG Araştırma grubu tarafından 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında 118O864 nolu proje ile çalışmamın bir kısmına gerekli finansal desteği sağlayan TÜBİTAK'a ve tez saha çalışmamın yapılabilmesine olanak tanıyan İtimat Çiftliğinin yöneticisi değerli büyüğüm Sn. Ufuk ARKIL Beyefendi'ye ve işletmede çalışan tüm meslektaşlarıma ve çalışanlara, doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen başta Dr. Öğr. Talha AVCILAR ve Dr. Öğr. M.Eren ŞAHİN olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Hayatımın her alanında beni destekleyen babam Kadir KOCA'ya, annem Ayşe KOCA'ya ve kardeşlerime, son olarak ise doktora eğitimimim boyunca hep yanımda olan, beni her yönüyle destekleyen, kıymetli eşim, can yoldaşım Ayşe ÇELEN KOCA'ya ve masumiyetiyle beni zor zamanlarımda bile neşelendiren ve bana güç katan minik kızım Betül KOCA'ya minnet duygularımı ve sonsuz teşekkürlerimi ifade etmeyi bir borç bilirim.

10. ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta öğrenimimi Süller Kasabası İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi ise Çal Anadolu Lisesi'nde tamamladım. Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2009 yılında kazandım ve 2015 yılında fakülte dönem ikincisi olarak mezun oldum. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi'nde 22.02.2016 tarihinde ÖYP programı ile Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başlamaya hak kazandım. Doktora eğitimime ise Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda 10.10.2016 tarihinde başladım.