

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA  
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç.Dr.SERHAT PABUÇÇUOĞLU

KIVIRCIK IRKI KOYUNLARDA  
MEVSİM İÇİ VE DIŞI ÖSTRUS SENKRONİZASYONU  
VE EMBRİYO TRANSFER ÇALIŞMALARI

T 58864

DOKTORA TEZİ

Veteriner Hekim HASAN RAHİMİ AGHDAM

İSTANBUL - 1997

## İçindekiler

1. GİRİŞ	2
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	5
2.1. Koyunlarda Reprodüksiyon:	5
2.2. Koyunlarda Embriyo Transferinin Tanım ve Tarihçesi:	7
2.3. Koyunlarda Embriyo Transfer Tekniği:	8
2.3.1. Embriyo Transferi İçin Hayvan Seçimi:	8
2.3.2. Alıcı ve Verici Koyunlarda Östrus Senkronizasyonu:	8
2.3.3. Vericilerde Süperovulasyon :	12
2.3.4. Vericilerin Tohumlanması:	15
2.3.5. Embriyoların Kazanılması:	16
2.3.5.1. Cerrahi Yöntem:	17
2.3.5.2 Cerrahi Olmayan Yöntemler:	18
2.3.6. Embriyoların Değerlendirilmesi:	18
2.3.7. Embriyoların Alıcılara Transferi:	19
3. MATERYAL VE METOD	22
3.1-Materyal:	22
3.1.1-Hayvanların Seçimi:	22
3.2- Metod	22
3.2.1-Koyunlarda Senkronizasyon ve Vericilerde Süperovulasyon:	23
3.2.2-Vericilerin Tohumlanması	24
3.2.3- Embriyoların Kazanılması ve Değerlendirilmesi	24
4.BULGULAR:	32
4.1.Alıcı ve Vericilerin Mevsim İçi ve Mevsim Dışı Senkronizasyonu:	32
4.2. Ovaryum Bulguları:	39
4.3. Embriyoların Kazanılması ve Transferleri	40
4.4.Gebelik Sonuçları	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ:	44
6. ÖZET:	50
7. SUMMARY:	52
8. LİTERATÜR LİSTESİ	54
9. ÖZGEÇMİŞ	62
10. TEŞEKKÜR	63

## 1. Giriş

Türkiyedeki koyun sayısı fazla olmasına rağmen, bireysel verimi düşük ırklar çoğunluktadır. Bu tip ırkların verim düzeyini artırmak için yıllardan beri yürütülmekte olan hayvan ıslahı çalışmalarına daha da önem verilmelidir. Bunun için damızlık değeri yüksek hayvanların kullanılmalı veya kültür ırkı ile melezleme yapılmalıdır. Melezlemelerin kontrollü, süratli ve yaygın biçimde yapılabilmesi için başvurulan en yaygın ve rutin tekniklerin başında sun'i tohumlama gelmektedir. Taze spermayı sulandırarak yapılan tohumlamalardan başarılı gebelik sonuçları alınmaktadır. Ancak, ırkların % 100 değişimi ve tamamen ıslahı için sun'i tohumlama veya doğal yolla yapılan melezlemeler yıllar süren bir çalışmayı gerektirmektedir. Bu süreyi kısaltmak hatta bir yıla indirmek, embriyo transfer tekniği ile mümkün olmaktadır. Hayvan yetiştiriciliğini yeniden düzenlemek ve hayvan ıslahı çalışmalarını hızlandırmak amacı ile dünyadaki hayvan yetiştiriciliği sektörü, 1980'li yıllarda biyoteknolojinin yeni bir dalı olarak gelişen embriyo transfer tekniğine yönelmiş durumdadır.

Embriyo transfer teknolojisi sayesinde; damızlık değeri yüksek pedigrisi yapılmış bir hayvandan maksimum düzeyde faydalanabilir, hayvan ıslahına hız kazandırılabilir, hayvansal ürünlerin kalitesi artırılabilir ve bir sürü, bir ırktan başka bir ırka süratli bir şekilde değiştirilebilir, daha ileri aşamalarda embriyo dondurularak milletler arası ithalat ve ihracat gerçekleştirilebilir.

1984'e kadar yürütülen embriyo transferi çalışmalarından yüz güldürücü ve olumlu sonuçların elde edilmesi, araştırmacıları sun'i tohumlamanın yanı sıra embriyo transfer tekniğinin de hayvan ıslahında kullanılabileceğine yönlendirmiştir. Nitekim

embriyo transfer teknolojisi sayesinde gen transferi, mikrocerrahi, klonlama, gibi moleküler biyolojideki son gelişmeler hayvanlardaki bilimsel araştırmalara yeni boyutlar getirmiştir. Böylece genetik mühendisliği ve biyoteknoloji sayesinde embriyo transfer teknolojisine yepyeni bir perspektif kazandırılmıştır.

Sığırlarda 1976 yılında non şırujikal embriyo transferi tekniği ve daha sonra embriyo dondurulma yöntemi geliştirilmiştir. Koyunlarda dondurulmuş embriyoların non şırujikal transferlerinden %30-55 oranında gebelik elde edilirken, şırujikal transferlerle %70'e yaklaşan gebelik oranları gerçekleştirilebilmektedir. Günümüzde embriyo transferi koyunlarda şırujikal yöntemle yapılmakta olup, endoskopinin kullanılması ile tekniğe non şırujikal bir boyut getirilmeye çalışılmaktadır. Son zamanlarda çiftlik hayvanlarında oldukça yeni gelişen splitting (Bölünmüş Embriyo) ve klonlama teknikleri geliştirilmektedir. Bu yaklaşım identikal (Tek Yumurta İkizi) ikizlerin, üçüzlerin ve bir tek embriyodan birbirine eş birçok yavrunun üretilmesini sağlayabilmektedir.

Steen Willadsen 1979'da koyun embriyolarını erken gelişim aşamasında mikrocerrahi ile ikiye bölüp, ilk ikiz (identikal) kuzuları elde ederek bu alandaki çalışmalara ışık tutacak önemli bir hamle yapmıştır. Bu metod, koyun ve sığırlarda identikal yavrular elde etmede halen kullanılan klasik bir yöntem haline gelmiş, fakat ticari anlamda yeterince yaygınlık kazanamamıştır.

Bütün bu çalışmaların yanısıra daha ileri gidilerek IVF, embriyonun sex tayni, spermatozoonun mikroenjeksiyonu, embriyonik hücre kültürü ve somatik hücre kültrürlerinden elde edilen nükleusun döllenenmiş oositlere enjeksiyonu ile yavru elde etme gündeme getirilmiş ve ilk yavrular koyunlardan elde edilmiştir.

Embriyo transferi son yıllarda hızla gelişmesine rağmen embriyoların kazanılması, saklanması ve transferindeki maliyetin yüksek oluşu, ticari alanda yaygın kullanımına engeller getirmektedir.

Gelişmiş dünya ülkeleri günümüzde bu ileri teknolojik çalışmalara yönelmiş olmasına rağmen Türkiye’de ilk teknolojik yöntemlerden olan sun’i tohumlama tekniği henüz tam olarak yaygınlaştırılmamış ve dolayısıyla embriyo transferi de buna bağlı olarak gündeme gelememiştir. Ancak Türkiye çapında sınırlı da olsa veteriner fakülteleri bazında sığır ve koyunlarda birkaç embriyo transfer çalışması yapılmıştır.

Embriyo transfer tekniğinin Türkiyede rutin hale gelebilmesi için bu konudaki bilimsel çalışmalara hız vererek dünya standartlarına ulaşmak gerekmektedir.

Bununla birlikte embriyo transferi pahalı bir yöntem olduğu için, hem yüksek reproduktif performans elde etmek, hem de yılın herhangi bir zamanında embriyo transferini gerçekleştirmek oldukça önem kazanmaktadır. Bundan dolayı sunulan çalışmada koyunlarda embriyo transfer tekniği ile elde edilecek reproduktif performans üzerine sezonun etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

## 2. LİTERATÜR BİLGİSİ

### 2.1. Koyunlarda Reprodüksiyon:

Çiftlik hayvanları içinde koyunların, üreme faaliyetleri hakkındaki bilgilerin nispeten kısıtlı olduğu ve dolayısı ile bu tür üzerinde daha fazla araştırmanın gerekli olduğu bildirilmektedir (24).

Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olup, günün aydınlık/karanlık oranlarına göre başlayan ve biten seksüel sezonun uzunluğu, aynı zamanda ırk, beslenme, iklimin genel durumu gibi faktörlere de bağlıdır (38, 61, 76). Mevsime bağımlılık fotoperiyodik etki sayesinde idare edilir ve gün uzunluğunun kısaldığı dönemde östrus siklusları görülmeye başlar. Genelde yüksek rakımlı dağlık bölge koyun ırkları kısa süreli çiftleşme mevsimine sahipken, daha alçak ovalık bölgelerdeki ırklar nispeten daha uzun çiftleşme mevsimine sahiptir.

Anöstrus döneminde hipofiz bezi yapısında fazla miktarlarda FSH ve LH hormonları bulunur. Bu dönemlerde ovaryumlar üzerinde çok sayıda foliküler yapı bulunurken, korpus luteumlar sadece anöstrus dönemin bitiminde şekillenen ilk ovulasyonlar sonrası gözlenmeye başlar (21, 76).

Anöstrustaki koyunların ovaryumlarında folliküller gelişir ve LH hormon uyarımı ile östradiol salgılanır. Foliküler aktivite gün uzunluğuna ve prolaktin sekresyonuna bağlı olarak yıl boyunca değişiklik gösterir. Fakat prolaktindeki dalgalanmaların koyunlarda çiftleşme sezonu ile ilişkili olup olmadığı açıkça belli değildir (38).

Koyunlarda reproduktif aktivitenin mevsimsel kontrolunda fotoperiyodun önemi uzun süreden beri bilinmektedir. Önceleri, gün uzunluğundaki azalmanın siklus ile

birlikte hormonal değişiklikleri de uyardığı düşünölmüştür. Fakat daha sonraki çalışmalar, fotoperiyoddaki değişimin tonik LH sekresyonu üzerindeki inhibitör baskının ortadan kalkmasına neden olduğunu ve dolayısı ile seksüel sezonun başladığını göstermiştir. LH sekresyonlarının sıklığı östradiölün negatif geriye tepkisine (feed-back) bağlıdır. Çiftleşme mevsimi esnasında düşük olan bu negatif geriye tepki anöstrusa geçiş sırasında artmakta, daha sonra ve gelecek çiftleşme sezonu başlangıcına kadar yüksek düzeyde kalmakta ve sezon başladığında tekrar azalma göstermektedir. Dolayısı ile anöstrus döneminde küçük çaplı folliküllerden salgılanan düşük seviyedeki östradiole bile tepki oluşturarak foliküler aktivitenin azaltılmasına neden olmaktadır (38).

Reeves'in açıklamasına göre gün uzunluğu kısalmaya başladığında, tonik LH merkezinin östrogene duyarlılığı azalmaya başlamakta ve dolayısı ile östrojenin negatif geriye tepkinin etkisi kalkmakta, bunu takiben tonik LH merkezinden LH-RH salınmakta ve hipofiz ön lobundan LH salınımı artmaktadır. Bu sırada aynı şekilde preovulator LH merkezinden hipofiz bezi uyarılarak preovulator LH'nın da salınımı sağlanmakta ve bunu takiben ovaryumda follikül gelişimi meydana getirilmektedir. Bu olaylar üreme mevsimine girildiğini göstermektedir. Yukarda bahsedilen siklik aktivitenin aksine, gün uzunluğunun artmaya başlamasıyla birlikte, tonik LH merkezinin östrogene duyarlılığı artmaktadır, dolayısıyla bu merkezin östrojenin negatif geriye tepkisine maruz kaldığı, buna bağlı olarak LH-RH ve devamında da LH düşük miktarda salınmaktadır. Bunu takiben ovaryumlarda follikül gelişmesine rağmen yeterli miktarda östrojen üretilmediği için preovulator LH'nın salınımı gerçekleşmemekte ve sonuç olarak ovulasyon olmamaktadır. Bu sırada hayvanlar anöstrus dönemindedirler (57).

Fotoperiyodik değişikliklerin neuro-endokrin mesajları nasıl etkilediği henüz tamamen anlaşılmış değildir. Muhtemelen biyolojik saat benzeri bir mekanizmanın koyun hipotalamusunda mevcut olduğu ve ışıktaki değişiklikleri algılaması sayesinde bu etkileri gösterdiği, dış ortamdan elde edilen bilginin hipotalamo-gonadal köprü vasıtasıyla pineal beze aktarıldığı savunulmaktadır. Ayrıca, bir pineal bez hormonu olan melatonin, koyunlarda bu fotoperiyodik değişimlere bağlı olarak salınan bir hormon olup karanlık periyotta yüksek, ışıklı periyotta ise düşük düzeylerde olduğu ve melatonindeki değişimlerin seksüel siklus üzerinde etkin olduğu bildirilmektedir (38).

Koyunlar 5-7 aylık iken puberteye girerler ve ilk ovulasyonu gösterirler. Ancak olay genetik, çevre, ırk, beslenme planı ve doğum zamanı gibi faktörlerden etkilenmektedir. Genelde ilk kızgınlık ergin vucut ağırlığının %50-70'ine ulaşıldığı zaman oluşmaktadır (38, 62, 76).

Kuzey Yarım Küre'de bulunan koyunlar genelde sonbaharda kızgınlık gösterirler ve yavrular doğumdan sonra 6-9 aylıkken puberteye erişirler. Kızgınlık mevsiminde siklus periyodu 17 gün ve östrus süresi 24-36 saattir. Koyunlarda kızgınlık başlangıcından 24-27 saat sonra spontan olarak ovulasyon (her siklusda ırka bağlı olarak ortalama 1-3 adet) gerçekleşir. Bir siklusta luteal faz yaklaşık 14 ve folliküler faz ise 3 gün sürmektedir. Koyunlarda gebelik süresi ortalama 149 gündür (38).

## **2.2. Koyunlarda Embriyo Transferinin Tanım ve Tarihçesi:**

Fertilizasyonu takiben verici hayvanın (donor) ovidukt ya da uterusundan alınan çeşitli gelişim safhalarındaki embriyoların, hemen veya belirli bir süre sakladıktan sonra, aynı türden diğer bir hayvana (resipient) nakline Embriyo Transferi denilmektedir (2, 5, 12).



İlk başarılı embriyo transferinin Heape tarafından 1891 yılında tavşanlarda gerçekleştirildiği bildirilmektedir (5, 31, 50). Çiftlik hayvanları içerisinde koyun ve keçiler embriyo transferinin yapıldığı ilk türler olmuş ve Harwick ile Berry 1949 yılında embriyo transferinden ilk kuzuyu elde etmişler (5, 20) ve ilginçtir ki çalışmada bu tekniğe koyun ve keçilerde türler arası transfer yapmak amacıyla baş vurulmuştur (20).

### **2.3. Koyunlarda Embriyo Transfer Tekniği:**

Embriyo transferi için önce sağlıklı ve verim düzeyi yüksek hayvanlar seçilir, hayvanlar alıcı ve verici olmak üzere iki guruba ayrılır. Alıcı ve vericilerde östrus senkronizasyonu yapıldıktan sonra vericilere superovulasyon uygulanır. Embriyoları kazanmak amacıyla vericilerin uterusu yıkanır ve elde edilen embriyolar alıcılara transfer edilir (11, 31).

#### **2.3.1. Embriyo Transferi İçin Hayvan Seçimi:**

Vericilerin üstün genotipik özellikleri taşımasının yanı sıra, fertilitesi yüksek hayvanlar arasından seçilmesi de önemlidir. Alıcılar verimleri düşük olabilmekle birlikte fenotip olarak yapıları vericilere yakın, iyi gelişmiş, fertilitesi normal ve ayrıca iyi annelik içgüdüsüne sahip olmalıdırlar (2, 11).

Embriyo naklinde kullanılacak olan verici ve alıcı hayvanların seksüel sikluslarının sağlıklı ve devamlı olması göz önünde tutulması gereken önemli bir konudur. Bu nedenle koyunların embriyo nakli genellikle kızgınlık mevsiminde, seksüel aktiviteleri izlendikten sonra uygulanmaktadır. Normal koşullarda her verici için yaklaşık 10 adet alıcı koyun programlanabilir (2, 11).

#### **2.3.2. Alıcı ve Verici Koyunlarda Östrus Senkronizasyonu:**

Kızgınlıkların kısa bir zaman aralığında topluca oluşturulmasına östrus senkronizasyonu denir. Senkronizasyon sonrası, 24-48 saat gibi sınırlı bir süre içinde koyunların büyük çoğunluğu östrus gösterirler **(37, 45)**.

Östrus senkronizasyonu planlanırken**(3, 45)**:

- a- Koyun başına her doğumda daha çok kuzu elde etmek,
- b- Yıl içinde birden fazla kuzulama sağlamak,
- c- Yaşam sürecinde daha fazla kuzu elde etmek,
- d- Koyunların daha verimli bir şekilde değerlendirilmelerini sağlamak,
- e- Daha kaliteli, yüksek verimli ve bir örnek kuzulara sahip olmak,
- f- Yavru kayıplarını azaltmak gibi amaçlar güdülmektedir.

Başarılı bir östrus senkronizasyonunda kısa çiftleşme periyodu ve yüksek fertilite oranı beklenir. Östrus senkronizasyonu için genelde hormonal teknikler kullanılmasına rağmen, fotoperiyod uygulanması (koyunları kontrollü ışık odalarında tutmak) ve koyunların, koç katımı gibi uyarıcı faktörlerle uyarılmasıyla da senkronizasyon sağlanabilmektedir. Ayrıca fotoperiyod uygulaması ile hormonların kombine kullanımı da başarılı sonuçlar vermektedir **(45, 39)**.

Siklusun luteal dönemindeki dişilerde korpus luteumdan salgılanan progesteron hormonu, LH sekresyonuna negatif geriye tepki oluşturmakta, CL regresyonu ve böylece progesteron seviyesinde azalma oluncaya kadar ovulasyon öncesi folikül gelişimini ve bir sonraki ovulasyonu inhibe etmektedir. Östrus ve ovulasyon senkronizasyonu, diğer bir deyişle CL fonksiyonlarının kontrolü anlamına gelmektedir **(13)**. CL fonksiyonu ve bir sonraki östrus ve ovulasyonun ortaya çıkmasının kontrolünde genelde iki metod izlenir. İlk metod uzun süre (diöstrus süresi = 14 gün) bir progesteron preparatının uygulamasını içerir. Progesteron uygulaması sırasında ovaryum üzerinde bulunan CL endojen yolla salgılanan  $PGF_{2\alpha}$  tarafından regrese

edilir. Bu dönemde eksojen progesteronun, CL regresyonu oluşmasına rağmen LH sekresyonu üzerine negatif geriye tepkisi devam eder. Progesteron tedavisine son verildiği zaman folliküller hızla gelişerek, iki gün içerisinde östrus ve ovulasyon meydana gelir. İkinci genel metod bir luteolitik ajan uygulaması ile CL ömrünün kontrol altına alınmasına dayanır. Luteolitik ajan verildikten sonra 24 - 72 saat içerisinde CL'un regresyonu meydana gelir ve bunu 2 - 3 gün içinde kızgınlık ve ovulasyon izler. Böylece doğal CL ömrü kısalmış olur. Koyunlarda kullanılan luteolitik ajanlar, prostaglandin  $F_{2\alpha}$  veya onların analoglarıdır (13, 37, 45, 48, 61). Ayrıca ruminantlarda östrojenin de luteolitik ajan etkisi vardır (13).

Aşım sezonundaki koyunlarda östrus ve ovulasyonun senkronizasyonu, progestagen ve bir luteolitik ajan kombinasyonu ile de yapılmaktadır (13, 37). Bu yöntemde luteolitik ajan CL'un regresyonu amacıyla kullanılırken, progestagen de regresyona kadar östrusu engelleme görevini üstlenmektedir. Luteolitik ajan ve progesteron kombinasyonu uygulaması ile daha yüksek fertilitte ve ovulasyon senkronizasyon oranları elde edilmektedir (13).

Ayrıca fotoperiyod uygulaması, melatonin uygulanması, GnRH ve koç katımı östrusu indüklemeye başarı sağlamakta, fakat kızgınlıklar daha kısa bir periyod içerisinde oluşmadığından östrus senkronizasyon yöntemleri arasında değerlendirilememektedir (13, 22, 66). Koyunlarda, östrus senkronizasyonu uygulamasına karşı şekillenen tepki veya reaksiyon üzerine ırk, beslenme, süt verimi, doğumdan sonra geçen süre, mevsim ve barındırma tipi gibi pek çok faktör etkili olmaktadır (13).

Progestagenler (progesteron, medroksiprogesteron acetat- MAP, florogeston acetat- FGA, Clorogeston acetat- CAP),  $PGF_{2\alpha}$ , GnRH ve eCG (PMSG) Östrus senkronizasyonu için kullanılan başlıca preparatlardır (1, 2, 11, 13, 37, 45). Mevsim

içinde senkronizasyon amacıyla progestagenler ve prostaglandinler en sık kullanılan hormonlardır (1, 3, 4, 8, 27, 35, 42, 43, 46, 65). Mevsim dışında ise ovaryumlar inaktif olduklarından burada fonksiyonel aktiviteyi uyarmak üzere progestagenler ve eCG hormonları kullanılmaktadır (1, 4, 45, 46, 53).

Progestagenler yeme katılarak oral, deri altı implant, kas içi enjeksiyon, vaginal sünger ve CIDR gibi yollarla uygulanmaktadır (1, 3, 4, 46, 58, 68, 72, 75).

Vaginal süngerler pratik, uygulaması kolay ve etkili olduğu için birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir (65). 20-80 mg medroksiprogesteron acetat (MAP), Cronulon (FGA) veya doğal progesteron içeren süngerler 10 - 16 gün süre ile vaginada tutulmaktadır. (1, 23, 65, 72). Mevsim dışında vaginal süngerlerin çıkarıldığı an alıcılara 400-800 IU eCG verilmesi önerilmekte (4, 11, 13) ve uygulama sonunda en fazla iki gün içinde kızgınlık görüldüğü bildirilmektedir. (12, 13, 30). Equin Chorionic Gonadotropin (eCG / PMSG) kas içi, damar içi veya deri altı yolla verildiğinde, folliküler büyümeyi stimüle edip, ovulasyonu garantilediği, östrusu erken başlattığı, gebelik ve ikizlik oranını artırdığı savunulmaktadır (2, 11, 13, 18, 27, 72).

Human Chorionic Gonadotropin (hCG) ve gonadotropik releasing hormon (GnRH), senkronize edilen alıcı ve vericilerde östrusun başladığı anda veya sünger çıkarıldıktan sonra 24 - 48 saat içinde uygulanarak ovulasyonu sağlamak ve dolayısı ile yüksek oranda senkronizasyon ve fertilizasyon elde etmek için kullanılmaktadır (1, 13).

Quirke ve ark. (53), MAP emdirilmiş intravaginal süngerle gerçekleştirdikleri östruslarda ovulasyonları artırmak amacıyla GnRH veya hCG hormonu uyguladıkları gruplardan, hCG uygulanan hayvanlarda daha başarılı sonuçlar saptadıklarını bildirmişlerdir.

FGA'lı süngerle senkronize edilen koyunları 2 gruba ayırarak 1.gruba 500 I U PMSG, 2.gruba ise herhangi bir uygulama yapmaksızın karşılaştıran Hackett ve Wolynett (30), sırasıyla %57 ve %46 fertilité oranı saptamışlardır.

Mevsim içinde senkronizasyon amacıyla alıcı ve vericilere  $PGF_{2\alpha}$  ve analogları tek veya 9-11 gün arayla çift enjeksiyon şeklinde uygulanabilmektedir (3, 26, 29, 36, 56).  $PGF_{2\alpha}$  ve analogları sırasıyla 10-20 mg ve 125-150 µg dozlarında i.m. kullanılabilir (3, 35, 56). Bazı çalışmalarda i.v. yolla daha düşük ve ekonomik dozların etkili olabildiği ileri sürülmektedir (3).  $PGF_{2\alpha}$  uygulamasını izleyen 2-4 gün içinde şekillenen östrustaki fertilizasyon şansı, ovum ve spermatozoa transportunun olumsuz etkilenmesi nedeniyle bir miktar düşük olabilmektedir (3, 35, 36).

İleri (36), bir prostoglandin analogu olan tiaprost'u mevsim içinde 14 gün arayla 0.150 mg i.m. vererek %100 östrusla senkronizasyonu sağladığını ve sun'i tohumlama ile %76.3 gebelik elde ettiğini bildirmektedir.

Tekin ve ark. (71), Dinoprost Tromethamine ile merinos ırkı koyunlarda yaptıkları mevsim içi tek ve 9 gün arayla çift enjeksiyonlardan sırasıyla %60 ve %90 senkronizasyon oranı elde ettiğini, fakat bu oranların progestagen (FGA) + PMSG uygulamasıyla gerçekleşen senkronizasyon oranından (%96.7) düşük olduğunu belirtmektedirler. Alaçam (3) ise mevsim içinde progesteron ve prostoglandini ayrı ayrı kullanarak yaptığı senkronizasyon çalışmasından sırasıyla %91.48 ve %90.90 gibi birbirine çok yakın oranları elde ettiğini bildirilmektedir.

Diğer taraftan 8 günlük progestagen ile  $PGF_{2\alpha}$ 'nın kombine uygulamasından daha iyi senkronizasyon ve fertilizasyon şansı sağlanabileceği savunulmaktadır (45).

### **2.3.3. Vericilerde Superovulasyon :**

Mevsim içi veya mevsim dışı senkronize edilmiş vericilerin ovaryumlarında daha çok sayıda follikülün gelişmesi ve ovulasyon oluşması ile daha çok embriyo elde edilebilmesi için, gonadotropinlerden eCG, Porcine Follicule Stimulan Hormone (pFSH), Horse Anterior Pituitary Hormon (HAP), ve Human Menaposal Gonadotropin (HMG) hormonları kullanılmaktadır (2, 5, 11, 12, 20, 25, 31, 46, 51, 64, 69).

Mevsime bağlı kızgınlık gösteren ırklar, anöstrus döneminde superovulasyona daha düşük düzeyde cevap vermektedirler (11). Superovulator ajanlar genellikle, siklustaki hayvanlarda luteal fazın sonuna doğru, progesteron uygulamasının bitiminde veya 48 saat öncesinde ve 2. PGF<sub>2α</sub> uygulamasından 24 saat önce enjekte edilir (2, 11). Ovulasyonların oluşması için koyunlara, bu hormon uygulamalarını izleyen birkaç gün içinde hCG, LH veya Gn-RH uygulanırken (7, 10, 31, 33, 49), ergin hayvanlarda bu hormonların verilmesi zorunlu görülmemektedir (31).

FSH ve HAP uygulamalarında, yarılanma ömürlerinin kısa olması nedeniyle bu hormonların son progesteron veya prostaglandin uygulamasından birkaç gün önce başlanarak, 12 saat ara ile, 3 gün bölünmüş dozlarda enjekte edilmeleri gerekmektedir (2, 9, 14, 15, 16, 19, 60, 63, 69).

Koyunlara süperovulasyon amacıyla gonadotrofinler çeşitli doz ve uygulama yolları ile verilmektedir (Tablo 1) (7, 11, 31, 41, 53).

**Tablo 1.** Koyunlarda süperovulasyon amacıyla kullanılan gonadotropinler ve dozları

Veriliş zamanı	Foliküler Gelişme İçin Gonadotropinler		Ovulasyon için Gonadotropinler	
	PMSG (I.U)	FSH (mg.)	hCG (I.U.)	LH (mg.)
östrus siklus günleri 12-14	1000-2000	12-20	1000-1500	50-75

PMSG: Tek doz olarak iv., im. veya sc. verilebilir.

FSH: Günde tek veya çift doz halinde bölünerek 3 gün süreyle im. veya sc. verilir.

hCG, LH: Tek doz enjeksiyonla iv., im. veya sc verilir.

Bondioli ve ark. (10), mevsim dışındaki 17 koyuna, 12 gün süreyle MAP içeren süngerleri uygulayıp, 11. günden itibaren 3 gün boyunca, her gün 2 defa olmak üzere, 12 saat arayla 11. gün 5 mg, 12. gün 4 mg, 13. gün ise 3 mg FSH'yı im. enjekte etmişlerdir. Kızgınlık başladıktan 8 saat sonra 9 koyuna 25 mg iv. LH verilen ve %100 östrus tespit edilen bu çalışmada, FSH grubunda ortalama  $6.0 \pm 4.4$ , FSH+LH grubunda ise ortalama  $13.9 \pm 13.1$  ovulasyon elde edilmiştir.

Bary ve ark. (6), MAP içeren vaginal süngerleri (60 mg) 10 gün süreyle uygulayarak hayvanları senkronize etmiş, PMSG enjeksiyonundan 24 saat önce kas içi  $PGF_{2\alpha}$  (tiaprost-iliren-0.196 mg) uygulamış ve süngerlerin çıkarılmasından 48 saat önce de 1200 I.U. PMSG vererek ortalama  $4.4 \pm 6.0$  korpus luteum elde etmişlerdir.

Heard ve Walker (33), çalışmalarında progesteronlu süngerlerle senkronize edilen koyunların bir grubuna 17 mg FSH'ı bölünmüş 5 enjeksiyonla ve diğer gruba da 1200 I.U. PMSG vererek superovulasyon sağlamışlar ve süngerler çıkarıldıktan 24-72 saat sonra 40  $\mu$ g GnRH vererek ovulasyon oluşturmuşlardır. Birinci grupta ovulasyon sayısını, embriyo sayısını ve fertilizasyon oranını sırasıyla ortalama  $11.3 \pm 0.36$ ,  $7.88 \pm 0.27$ ,  $\%83.7 \pm 2.02$  ve 2. grupta sırasıyla  $7.47 \pm 0.22$ ,  $4.78 \pm 0.15$  ve  $\%86.9 \pm 1.36$  olarak saptamışlardır.

Hofman ve ark. (34) norgestomet implantlarıyla (3-6 mg) senkronizasyonun ardından FSH'nın günde tek veya çift enjeksiyonu arasındaki farkı araştırmışlar ve 14 gün süreyle tutulan implantların çıkarılışından 48 saat önce, toplam 18 mg FSH'yı iki grupta denemişlerdir. Norgestomet miktarındaki 3 veya 6 mg arasında kızgınlık gösterme açısından belirgin bir fark olmazken FSH'nın tek ve çift enjeksiyon uygulamaları arasında (sırasıyla  $\%31$  ve  $\%81$ ) belirgin fark gözlemişlerdir. Buna eş



değer olarak korpus luteum sayısı açısından da (sırasıyla  $0.98 \pm 0.41$  ve  $6.15 \pm 0.30$ ) büyük fark bulmuşlardır.

Süperovulatör ajan olarak Fin koyunlarında 1200, 1500, 1800 I.U. dozda PMSG kullanan Rainio (55), ortalama ovulasyonları sırasıyla  $7.5 \pm 4.4$ ,  $10.9 \pm 7.1$ ,  $12.3 \pm 4.9$ , ortalama transfer edilebilir embriyo sayısını sırasıyla  $5.5 \pm 3.2$ ,  $5.7 \pm 6.2$ ,  $5.1 \pm 4.1$  olarak saptamıştır. En ideal PMSG dozunun 1500 I.U. olduğunu belirten araştırmacı, elde edilen sonuçların PMSG'nin farklı dozuna ve ırka bağlı olarak değişebileceğini vurgulamıştır.

Smith (67), Targhee koyunlarında,  $PGF_{2\alpha}$  ile yapılan östrus senkronizasyonunun ardından superovulasyon için FSH'nin değişik dozlarının etkisini (toplam doz: 0-12-14.5-17-19.5-22-30 mg) araştırmış ve optimum toplam dozun 19.5 ve 26 mg arasında değiştiğini bildirmiştir. Araştırmacı aynı zamanda 19.5 mg. FSH uygulanan grupta koyun başına ortalama C.L ile embriyo sayısını 12.06 ve 7.72 olarak saptamıştır. Oysa FSH'nin 12 mg.'lık doz uygulamasında aynı değerleri sırasıyla 6.67 ve 1.33 olarak bulmuştur.

#### **2.3.4. Vericilerin Tohumlanması:**

Superovulasyon uygulanan vericilerde, sperma transportunun aksaması, zamansız ovulasyon ve defektli oositler fertilizasyon oranının düşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle sun'i tohumlama yapılan koyunlar daha çok sayıda spermatozoon içeren sperma (400 milyon motil spermatozoon tohumlamada ) yada elde sıfat yöntemi ile 12 saat arayla tohumlanmalıdırlar. En ideal tohumlama yöntemi, progesteron tedavisinden 48 saat sonra veya östrus başlangıcında lokal anestezi ile 0.02 ml spermanın şirurjikal olarak doğrudan cornu uteriye verilmesi olarak bildirilmektedir (2, 11, 20, 31, 32)



### 2.3.5. Embriyoların Kazanılması:

Diğer evcil hayvanlarda da olduğu gibi koç spermatozoonlarının dişi genital kanalında ovumu fertilize etmek için kapasite olmalı ve fertilizasyon kapasitesini 48 saat korumalıdır. Ovumun fertilizasyon ömrü ovulasyondan sonra 10-12 saat olmakta ve 24 saata kadar uzayabilmektedir (69). Ovumlar ovidukta cumulus hücreleri ile birlikte salınırlar ama fertilizasyon zamanında cumulus hücreleri ovum etrafında bulunmazlar (52). Fertilize ovumun bölünmesi veya 2 hücreli evreye dönüşümü fertilizasyondan 16 saat, dolayısı ile ovulasyondan yaklaşık 24 saat sonra oluşmaktadır (52).

Koyunlarda östrusu ve tohumlamayı takiben embriyolarının gelişim safhaları şu şekildedir (2, 11):

Zaman (gün)	Gelişim Safhası
0 (Kızgınlık Günü)	Çiftleşme-Fertilizasyon
1	1-2 hücreli
2	2-4 hücreli
3	4-16 hücreli
4	16-32 hücreli
5	32 hücre (morula)
6	Geç morula / Erken blastocyst

Koyun embriyoları fertilizasyondan sonra ortalama 3 gün içinde oviduktu geçerek uterusu ulaşırlar (2, 20, 31). Embriyo kazanma işlemi fertilizasyondan itibaren embriyo zona pellucidayı terk edene kadar yapılabilir (11). Ancak erken dönemdeki embriyolar çok hassas olduklarından ve manipulasyonlara fazla dayanıklı olmadıklarından genelde embriyo toplama işlemi 3-7. günlerde (Östrus-0. gün) yapılmaktadır (2, 11, 20, 25, 31, 44, 69). Ayrıca uterusu inmiş embriyolar genelde yüksek gebelik şansına sahip ve dondurma işlemine daha uygun olmasından dolayı daha erken gelişme dönemindeki embriyolara tercih edilirler (31). Yapılan çalışmalarda elde edilen embriyo sayısının, genellikle ovaryumlarda bulunan korpus luteum sayısının %40-80'i kadar olduğu bildirilmektedir (31). Uterus yıkaması için

kullanılacak medyumun pH'sının 7.2 - 7.8 arasında ve osmolaritesinin 300 mOsm olması istenilmektedir (2). Başarı ile kullanılan ve bir protein kaynağı ile zenginleştirilmiş dengeli tuz solusyonlarından oluşan birkaç yıkama medyum geliştirilmiştir. Protein kaynağı olarak homolog veya heterolog serum (%10-20 hacminde) veya çeşitli serum albumini (örneğin: BSA 3mg/ml) kaynakları kullanılmaktadır (2, 11). Çoğu zaman kullanılan medyum Dulbecco'nun fosfat-buffered salin'idir (PBS) (2, 11, 12, 17, 19, 41, 55, 69).

Koyunlarda embriyo elde etmek için değişik yöntemler ve kataterler kullanılmakta ve genel olarak cerrahi ve cerrahi olmayan yöntemler olarak iki ana grup altında incelenmektedirler. (11, 12, 20, 31).

#### **2.3.5.1. Cerrahi Yöntem:**

Embriyoların cerrahi yöntemle kazanılması genel yada lokal anestezi altında, laparotomi veya son zamanlarda sıkça kullanılan laparoskopik yöntemle yapılmaktadır (11,12, 19, 20, 31, 33, 41, 60,69).

Laparatomide genel veya lokal anestezi ile sırt üstü yatırılan hayvanın median hattı üzerinde memenin hemen önünde ensizyonla karın boşluğuna girilir. Ovidukt yıkamasında, infundibulumu küçük çaplı yumuşak bir katater sokulması ve uterotubal bölgeden küt bir iğneyle 3-6 ml yıkama medyumunu verilerek infundibulumu doğru yıkama yapılır. Cornu yıkamasında bifurkasyo noktasına yakın bir yerden cornu uteriye 2 yollu Foley katateri (10 numara) ile girilip balonu şişirerek buraya tesbit edilir veya barsak pensini yerleştirerek yıkama sıvısının geri kaçması önlenir. Daha sonra ovidukta yakın bir yerden uterus küt bir iğne ile delinir ve 10-25 ml yıkama sıvısı vererek korpusa yakın olarak yerleştirilen foley kataterinden geçen sıvı toplama kabına aktarılır (2, 11, 31). Laparoskopik yöntemde periton boşluğuna yalıtım

sağlamak için yaklaşık 4 litre CO2 gazı verilir ve laparoskop yardımı ile dışarıdan yönlendirilen foley katater kullanılarak laparatomide olduğu gibi yıkama işlemi yapılır (14, 17, 47).

Steyn ve ark. (70) embriyo elde etmek için laparotomi ve laparoskopik yöntemleri karşılaştırmış ve laparoskopinin belirgin şekilde fertilité yönünden daha üstün olduğunu saptamışlardır.

### **2.3.5.2 Cerrahi Olmayan Yöntemler:**

Küçük ruminantlarda ilk non şirurjikal embriyo kazanılması 1984 yılında Bondurant ve ark.(40) tarafından rapor edilmiştir. Bu yöntemle genel anestezi veya epidural anestezi altında serviksten geçirilmiş foley katateri (24 numara 2 yollu) veya metal katater (3 yollu, küçük ruminant için özel) ile yıkama işlemi yapılmaktadır (7, 40). Serviksi açmak için Barry ve ark. (7) 0.5mg'lık prostoglandin E tabletini (3 ml izotonik suda eritilip) eksternal serviks kanalına ve aynı zamanda 1 mg östradiol cypionatı kas içi vermişler ve bu yolla embriyo kazanmada %65 (Kazanılan Embriyo/Korpus luteum sayısı) başarı elde etmişlerdir. Rickords ve ark. (59) ise sezon dışındaki koyunlarla yaptıkları çalışmada serviksi açmak için lokal olarak 10 mg PGE<sub>2</sub> (Dinoprostone) uygulamışlar ve 1-6 saat içinde 1-4 mm açılmayı saptamışlardır.

Folers- Foxworth ve ark. (28) keçilerde embriyo toplamak için Transservikal yöntemle laparoskopik yöntemin karşılaştırmasında laparoskopik yöntemden daha fazla embriyo elde ettiklerini (lap:%78.7, Transservikal %36.9) ancak transfer sonrası gebelik açısından önemli fark görmediklerini bildirmişlerdir.

### **2.3.6. Embriyoların Değerlendirilmesi:**

Koyun embriyolarının morfolojik değerlendirmesinde kişisel deneyim hala 6nemini korumaktadır (11). Embriyolar vericilerden toplandıktan sonra X100-X150 b6y6tme stereo mikroskop altında seğilmekte ve morfolojik incelemeler k6lt6r medyumunu içerisinde X40-X200 b6y6tme ile uygun bir pipet kullanarak yapılmaktadır. Embriyolar tek h6creliden hatched blastocyst d6nemine kadar olan her safhada, uygun bir ortama transfer edildiğinde gelişebilmesine rağmen çok erken ve çok geç d6nemlerinde başarı oranı daha y6ksek olmaktadır. Sekiz h6creli ve blastocyst d6nemlerinde transfer edilen embriyolardan daha y6ksek gebelik oranı elde edilmektedir (2, 31). İdeal bir embriyo dolgun ve k6re şeklinde, blastomerleri aynı b6y6kl6kte ve renkte, rengi ne çok açık ne de çok koyu olmalıdır. Sitoplazmada granulasyon olmayıp, orta b6y6kl6kte vakuoller yer alabilir. sağlıklı bir embriyonun perivitellin aralığı boş olup, zona pellusidası buruşuk veya kollabe olmaması gerekmektedir (2). Aşağıdaki morfolojik anomalileri g6steren defektli embriyolar değenere olarak değerlendirilmektedirler.

- a- Değişik 6l6lerde tek tip olmayan blastomerler,
- b- Morulada h6cresel yıkıntılar,
- c- K6şeli biçimde bir zona pelucida içinde dejenere olmuş kollabe blastosist,
- d- B6t6nl6ę6 bozulmuş mitotik şekil,
- e- Fark edilemeyen k6p6k g6r6n6ml6 blastomerler,
- f- Parçalanmış ekirdek ve sitoplazma,
- g- Anormal şekilli morula ve blastosist (31).

### **2.3.7. Embriyoların Alıcılara Transferi:**

Başarılı bir embriyo transferi için alıcının genital organları ile embriyonun gelişim d6nemi senkronize olması gerekmektedir. Nitekim embriyo transferinde alıcı ve verici arasındaki senkronizasyon farkı -24 saat olanlar, -48, 0, +24 saat olanlardan daha iyi sonuç alınmaktadır (11, 20, 31, 44).

Genelde 8 hücreliden daha erken gelişim safhasındaki embriyolar 0.01-0.02 ml medyum içinde cam pipetle C.L. olan tarafın infundibulumundan 2-4 cm ovidukt içine sokularak verilirler. 8 hücreliden daha ileri dönemlerdeki embriyolar ise uterotubal bağlantının 2-3 cm gerisine cornu uteriye bırakılırlar **(2, 11, 31)**.

Koyunlarda embriyo transferi cerrahi ve cerrahi olmayan yöntemlerle yapılabilmektedir **(2, 11, 12, 20, 31)**.

Cerrahi yöntemler genel yada lokal anaztezi altında laparotomi, laparoskopik veya basitleştirilmiş operatif yolla yapılabilmektedir, ancak günümüzde en yaygın kullanılan metod laparoskopik olanıdır **(14, 25, 40, 54, 64, 69, 74)**.

Embriyolar cerrahi olmayan yöntemlerde serviks yolu ile cornu uteriye transfer edilebilirler **(2, 28)**.

Stefani ve ark. **(69)** koyun başına transfer ettikleri 1 veya 2 embriyoda farklı bir gebelik oranı elde etmemişler, buna karşın Csehveseregi **(25)** 2 embriyo verilenlerden %55.2 ve tek embriyo verilenlerden %75.6 gebelik elde etmiştir.

Stefani ve ark **(69)**. laparoskopik transferden %80 ve laparotomi ile yapılan transferlerden %65 oranında gebelik elde etmişlerdir.

Laparoskopik yöntemle embriyo transfer tekniği kullanan Walter ve ark **(74)** %41, Mutiga ve Baker %75 gebelik elde etmişlerdir **(40)**.

Schiewe ve ark **(64)** laparotomi ve laparoskopinin transfer sonuçlarını karşılaştırmış ve sırasıyla %16.6 ve %50 gebelik elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bucksell ve ark.**(14)** ise laparoskopik yöntemle %22 oranında gebelik elde ederlerken laparotomi yöntemini kullandıklarında %76 oranında gebelik elde etmişlerdir.

Embriyo transferinde korpus luteumu olan ovaryumun kornusuna genelde 1 veya 2 hatta 4 embriyo verilebilmektedir (14, 25, 69, 74).

Qin ve Sher (54) genel anestezi altında, koyunun pubis kemiklerinin orta kısmından 1.2-2.5 cm'lik bir ensizyonla girerek, ovaryumlar ve kornu uteriyi parmak veya pens yardımıyla dışarı çıkarıp, embriyoları ovidukt veya kornuya transfer etmişler ve bütün bu işlemleri 3-5 dakikada bitirmişlerdir. Araştırmacılar bu methodla, yapılan diğer transferlere yakın oranda gebelik elde etmişler ve uygulama süresinin ve transfer sonrası yapışmaların az olmasını bu methodun avantajı olarak belirtmişlerdir.

Maurer (44) tek kornuya yaptığı embriyo transferinden %68.7, iki cornuya yaptığı transferden ise %47.7 gebelik oranı elde etmiştir.

Vivianco ve ark (73), tarafından sezon içi ve sezon dışı embriyo transferinin karşılaştırmasında embriyoların yaşama oranı arasında mevsime bağlı bir fark tesbit edememişlerdir.

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. Materyal:**

Çalışmanın materyalini toplam 53 baş Kıvırcık koyunu oluşturdu. Bu koyunların 26'sı mevsim içinde (Temmuz ayı), 27'si de mevsim dışında (mart ayı) kullanıldı. Koyunların tohumlanmasında ise yine aynı ırktan 4 adet koçtan yararlanıldı.

##### **3.1.1. Koyunların Seçimi:**

Materyal olarak kullanılan hayvanlar İ.Ü.Veteriner Fakültesi Araştırma Uygulama ve Eğitim Çiftliğinin mevcut sürüsündeki en az bir doğum yapmış 2-3 yaşlarındaki koyunlar arasından rastgele seçildi. Tohumlamalarda kullanılan koçlar da yine aynı sürünün, 2-3 yaşları arasındaki spermatolojik bulguları belirlenenler arasından seçildi.

Seçilen hayvanlar çalışma başlangıcından en az 2 ay önce Anabilim Dalına nakledildiler ve koyunlara çalışma başlangıcına kadar anti-paraziter (Ivomec®, Topkim, 0.5cc. sc.) tedavileri ve vitamin uygulamaları yapıldı. Beslenmelerinde mera koşullarından, konsantre koyun yemi ve ilave olarak kuru ottan yararlanıldı.

#### **3.2. Metod**

Çalışma alıcı ve vericilerde senkronizasyon, vericilerde superovulasyon, embriyoların kazanılması ve değerlendirilmesi ile embriyoların transferi olmak üzere dört aşamada gerçekleştirildi.

### **3.2.1. Koyunlarda Senkronizasyon ve Vericilerde Superovulasyon :**

Koyunların mevsim içi ve mevsim dışı senkronizasyonunda 60 mg MAP (medroksiprogesteronasetat- Syncromat®, Intervet) içeren vaginal süngerler ve kas içi PMSG (Intergonan®, Vemie Veterinar Chemie GmbH) hormonu kullanıldı.

Mevsim dışı 27 koyun 13 alıcı ve 14 verici olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Daha sonra verici ve alıcılar transfer tarihlerine göre sırasıyla 5 gruba (alıcı-verici: 1-2, 3-3, 3-3, 2-3, 4-3) ayrılarak her gruba aynı gün vajinal süngerler uygulandı. Süngerler, vulva antiseptik solusyonla temizlendikten ve özel adaptör yine antiseptik pomatla kayganlaştırıldıktan sonra vajinanın kranialine yerleştirildi ve 14 gün süreyle koyunlar kontrol edilerek süngerlerin düşüp düşmediği belirlendi. Alıcı koyunlara süngerlerin çıkarılışından 24 saat önce 500 İ.Ü. PMSG (Intergonan®- Intervet) kas içi enjekte edildi. Sünger çıkarıldıktan sonra her 12 saatte bir arama koçu ile kızgınlıklar tesbit edilip, ilk kızgınlık görüldüğü anda alıcılara 500 IU hCG (Corulon®- Intervet) kas içi yolla uygulandı. Vericilere ise, süperovulasyon oluşturmak için süngerlerin çıkarılışından 36 saat önce 1500 IU PMSG kas içi uygulandı ve yine her 12 saatte bir arama koçu katarak kızgınlık tesbiti yapıldı. Östrusun başladığı tesbit edilen koyunlara hemen 1000 IU hCG kas içi enjekte edildi.

Mevsim içi grubunda bulunan 26 koyun, 12 alıcı ve 14 verici olarak 2 ana ve daha sonra tekrar transfer tarihlerine göre toplam 6 alt gruba ayrıldılar (alıcı-verici: 2-1, 2-3, 2-3, 2-2, 2-2, 2-3). Mevsim dışında olduğu gibi yine alıcı ve vericilere aynı günlerde süngerler yerleştirildi ve 14 gün süreyle vajinada bırakılarak, günlük kontrolleri yapıldı. Mevsim dışında olduğu gibi alıcılara sünger çıkarılışından 24 saat önce 500 IU, vericilere ise 36 saat önce 1500 IU PMSG kas içi yolla uygulandı. Süngerler alındıktan sonra alıcı ve vericilerin her 12 saatte bir arama koçu ile



kızgınlıkları tesbit edildi. Kızgınlık gösteren alıcılara hemen 500 IU, vericilere ise 1000 IU hCG kas içi enjekte edildi.

### 3.2.2. Vericilerin Tohumlanması:

Östruslar görüldüğü anda vericilere ovulasyonları garanti altına almak için 1000 IU hCG kas içi uygulandı ve elde sıfat yöntemi ile östruslar sonlanıncaya kadar 12 saat ara ile tohumlandı.

### 3.2.3. Embriyoların Kazanılması ve değerlendirilmesi

Vericilerden embriyoların kazanılması kızgınlığı takip eden 7. günde gerçekleştirildi.

Kullanılan Malzeme: Stereo mikroskop (Olympus®, VMZ 1X-4X), Etüv (37° C), sıcak tabla (37° C), cam petri kutuları (9 cm çaplı silikonlanmış), küçük plastik petri kutuları (Grainer®, 3 cm çaplı), plastik enjektörler (5 ml - 50ml), ucu kütleştirilmiş 12 gaugelik enjektör iğnesi, 2 yollu pediyatrik foley idrar kateteri (10 FG X 25cm-Balom size 3 ml), mikropipet (silikonlanmış), mikropipet tutucusu, cellulase acetate filtre (Milipore®, 0.45 mikron), %3 (v/v) oranında sığır serumu içeren zenginleştirilmiş yıkama sıvısı PBS medyumumu (Dulbeco'nun Phospat Buffer Salin-Tablo 2).

Bulunan embriyolar transfer edilinceye kadar %20 (v/v) sığır serumu ile zenginleştirilmiş PBS kültür medyumunda saklandılar.

**Tablo 2.** Dulbeco'nun PBS (Phospat Buffered Saline) medyumunun yapısı (31).

<u>Kimyasal Madde</u> :	<u>Konsantrasyon (g/l)</u> :	<u>mM</u> :
NaCl	8.00	136.9
CaCl <sub>2</sub> *	0.12	0.9
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.10	0.5
KCl	0.20	2.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20	1.5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.16	8.1
bidistile su	qsp 1 litre	

\*ayrı eritilip daha sonra ilave edildi

Hazırlanan PBS medyumuna olası bir kontaminasyona karşı ml'ye 100 IU kristal penisillin (Potasyum penisillin) ve 0.05 mg Streptomisin sulfat katıldı.

PBS medyumunu hazırlanırken kimyasal maddeler tartılıp steril, 1 lt'lik balon içine konuldu. Daha sonra üzerine bir miktar steril, bidistile su ilave edilip, magnetik karıştırıcı aracılığı ile maddeler tamamen eritildikten sonra medyumun hacmi 1 litreye tamamlandı ve %3 oranında daha önce hazırlanan sığır serumu ve antibiyotik ilaveleri yapılarak sterilizasyon amacıyla filtre edildi. Filtrasyon işlemi otoklavda sterilize edilmiş, por genişliği 0.45 µm olan milipor filtreden geçirilerek yapıldı. Sterilizasyon sonrası olası bir kontaminasyonun kontrolü amacıyla, hazırlanan medyum 24 saat süre ile 37°C'lık inkübatörde bekletildi.

#### Sığır Serumunun Hazırlanması:

Medyuma katılan sığır serumu, sağlıklı sığırlardan elde edildi. Bu amaçla sığırlardan venöz kan steril tüplere alındı. Kanlar pıhtılaştıktan sonra çizilerek, serumu ayrılması için oda ısısında 24 saat bekletildi. Elde edilen serumlar 3000 devirde 20 dakika santrifüje edildikten sonra, dipteki tortudan ayrılıp ikinci kez, aynı devir ve sürede santrifüje edildiler. Santrifüj sonrasında serumlar yapısında bulunan ovosid faktörlerin inaktive olması için 56 °C'da 30 dakika bekletildi. Elde edilen bu serumlar daha sonra küçük porsiyonlar halinde derin dondurucuda dondurularak kullanılıncaya kadar saklandı.

Uterus yıkaması yapılacak koyunlar 1 gün önceden operasyona hazırlık amacıyla aç bırakıldı. Genel sedasyon için 0.5 - 1.0 ml Rompun® (Xilazin) kas içi enjekte edildi.

Genel sedasyon sağlandıktan sonra 3 ml lidokain ile lumbo sakral anestezi (Lumbo aralıktan) uygulandı (**Resim 1**).

**Resim 1.** Koyunlarda lumbo sakral anestezinin uygulanışı.



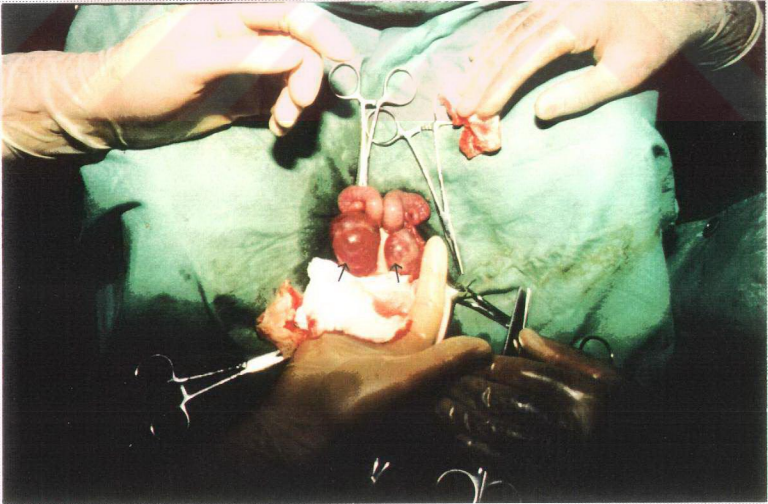
Lumbo sakral anestezi uygulanmasını takiben koyunlar sırtüstü pozisyonda operasyon masasına yatırılıp operasyon bölgesinin gerekli hazırlığı gerçekleştirildikten sonra, median çizgi üzerinde memelerin hemen önünden başlanarak yaklaşık 10 cm uzunluğunda bir ensizyon yapıldı. Uterus ve ovaryumlar bulunup ensizyon hattına çekildikten sonra ovaryumlar üzerindeki korpus luteumlar ve patlamayan folliküller sayılıp follikül çapları ölçülerek ovaryum bulguları saptandı (Resim 2, 3).

**Resim 2.** Süperovulasyon uygulanmış koyundaki ovaryumun görünümü.



→ korpus luteum

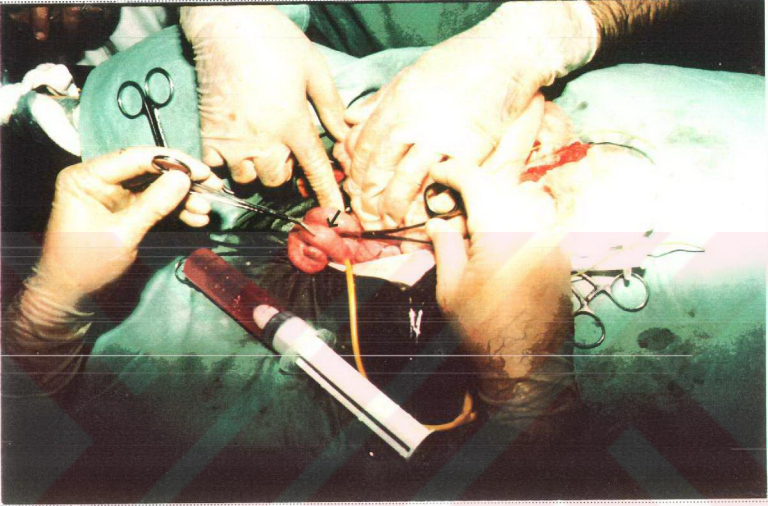
**Resim 3.** Süperovulasyon uygulanmış koyunun ovaryumunda şekillenmiş kistik folliküller



→kistik follikül

Yıkama işlemine ensizyon hattına çıkarılmış uterusun bifurkasyon noktasından kornuya küt bir delik açılarak başlandı. Foley katater bu açılan delikten kornunun

**Resim 4.** Verici koyunda foley kateterinin yerleştirilmesi.



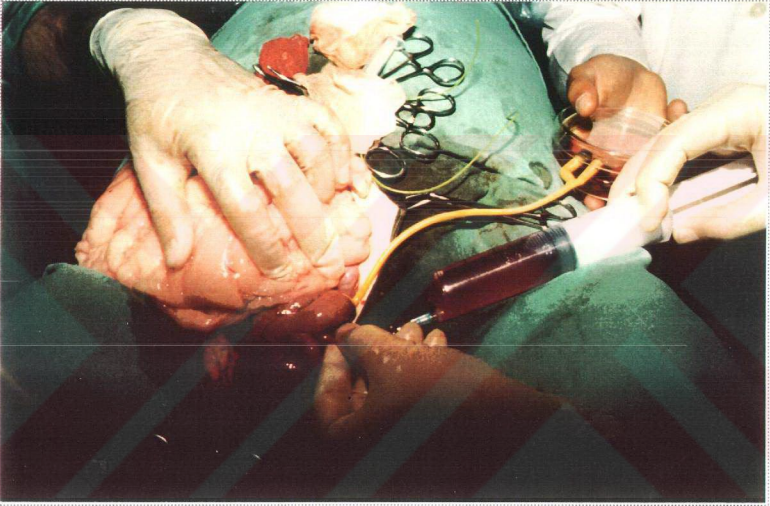
→ foley kateterin balonunun yaptığı şişkinlik

kranialine doğru yönlendirildi ve tesbit için balonu kornu lümenini iyice kapatacak şekilde 2-3 ml hava ile şişirildi. Daha sonra ucu kütleştirilmiş bir enjektör iğnesi ile uterotubal birleşme yerine yakın bir yerden lümenine sokularak 20 ml medyum buradan yavaş yavaş uterus lumenine verildi. Foley kataterin dışarıda kalan ucu ise petri kutusuna yerleştirildi ve uterus içine verilen yıkama sıvısının, kornuya hafif masaj uygulayarak foley katateri aracılığı ile petri kutusuna akması sağlandı (**Resim 4, 5**). Yıkama işlemi bitince kanül ve kateter uterustan çıkarılıp her iki deliğe hafif basınç uygulanarak muhtemel kanamaların önlenmesi sağlandı. Bütün bu işlemler diğer kornu uteriye de tekrarlandı ve yıkamalar bitince uterus yerine konulup karın boşluğu kapatıldı



Embriyoları içeren yıkama sıvıları, değerlendirme aşamasına kadar 37°C'a ayarlı sıcak tabla üzerinde bekletildi. Bu bekletilme süresi, yıkama sıvısı içinde bulunabilecek ve üreme organlarından köken alan zararlı etkenlerden (kan hücreleri vb.) embriyoları

**Resim 5.** Uterus yıkamasının yapılışı.



korumak amacıyla mümkün olduğunca kısa tutuldu. Yıkama sıvısı içinden mikropipet aracılığıyla dışarıya alınan embriyolar, oviduktan gelen sıvı ve hücrelerden arındırılmak amacıyla, üç ayrı petri kutusu içinde bulunan Dulbecco's PBS kültür medyumundan ayrı ayrı geçirilerek yıkandılar.

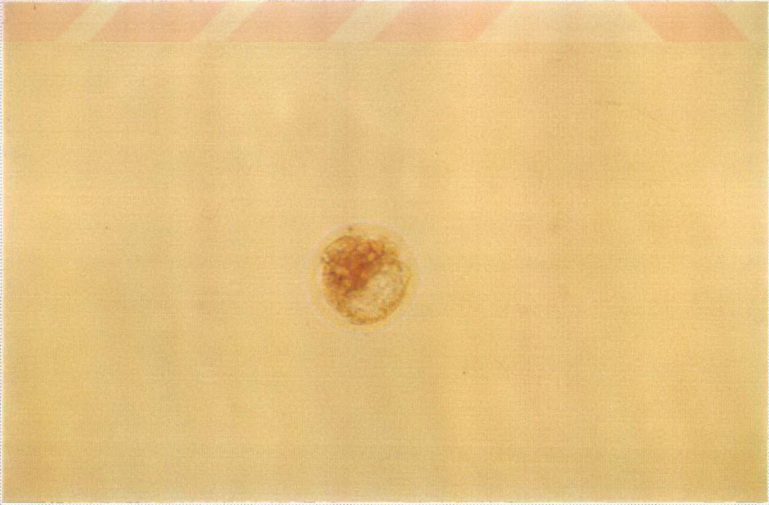
Embriyoların kazanılmasından sonra transfer aşamasına kadar yapılan tüm işlemler, içi ultraviyoleet lambası ile sterilize edilen bir cam kabin içinde gerçekleştirildi. Kabin iç yüzeyinin sterilizasyonu için ultraviyoleet lambası uygulamalardan 12 saat önce çalıştırıldı ve kabinin cam kapağı kapalı tutuldu.

Embriyoların değerlendirilmesi ve diğer tüm manipulasyonlar, camlı dolap içinde bulunan, X10-X40 büyütme stereo mikroskop (Olympus®: VMZ.4F) altında gerçekleştirildi.

Değerlendirme sonunda normal olarak nitelendirilen embriyolar transfer için kullanıldı (**Resim 6, 8**). Verici hayvanlardan kazanılan embriyolar kısa bir süre içinde değerlendirilerek (Yaklaşık 60 dakika içinde) taşıyıcı koyunlara transfer edildiler.

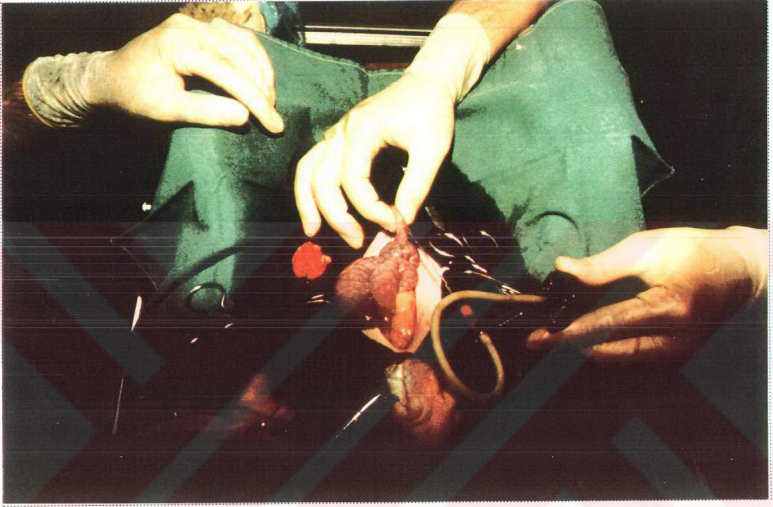
Alicılara laparotomi için Rompun'la (05-1.0 ml, im) genel sedasyon sağlandıktan sonra lumbal anestezi (3cc lidokain) uygulandı ve sırt üstü yatırılıp traş dezenfeksiyonu ve ayakların tesbitinden sonra memelerin hemen önünden median hat üzerinde yaklaşık 10 cm ensizyon gerçekleştirildi. Uterus ve ovaryumlar özenle ensizyon hattına çekilerek ovaryum bulguları tesbit edildi. Korpus luteum şekillenmiş ovaryum tarafındaki kornu uteri saptandı ve transfer edilecek embriyo 0.02 ml medyum içinde pastör pipetine çekildi. Transferin gerçekleştirilceği kornu uteri

**Resim 6.** Transfer edilebilir nitelikte blastosist safhasındaki bir embriyo.



önce küt bir iğne ile delindi ve transfer pipetinin ucu bu delikten uterusu sokuldu ve embriyo kornu uterusun apeksine doğru uterus lumenine verildi (**Resim 7**).

**Resim 7.** Embriyoların intra uterin transferinin yapıışı.



Transfer yapılan kornu uteride'ki deliğe kısa bir süre hafifçe basınç yapılarak oluşabilecek bir kanama önlenirken bir yandan da küçük bir ihtimal de olsa embriyo transfer pipetinde kalabileceğinden, transferde kullanılan pipet mikroskop altında incelenerek embriyonun uterusu verilip verilmediği kontrol edildi. Uterus özenle karın boşluğundaki yerine konularak ensizyon yeri yöntemine uygun bir şekilde kapatıldı. Muhtemel enfeksiyonları önlemek için tetrasiklin grubu antibiotik (Panterramisin®-3cc) kas içi uygulandı ve bir hafta sonra dikişler alındı.

Elde edilen bulgular *t*-test analiz yöntemi ile değerlendirildi.



#### 4. BULGULAR:

##### 4.1. Alıcı ve Vericilerin Mevsim İçi - Mevsim Dışı Senkronizasyonu:

Mevsim içi alıcı gruptaki 12 baş koyundan sadece 1 tanesinde kızgınlık görülmedi ve %91.67 oranında östrus elde edildi (**Tablo 3**). Kızgınlık göstermeyen koyunun ovaryum incelenmesinde sol ovaryumun inaktif olduğu ve sağ ovaryumda 1 adet korpus luteumun varlığı saptandı.

Tablo 3. Mevsim içi alıcılarda sünger çıkarılışından itibaren yapılan kontrollarda kızgınlıkların görüldüğü süreler (n=12).

Hayvan no	Kızgınlık gösteren	Sünger çıkarıldıktan sonra geçen süreye göre kızgınlıklar (saat)						Hiç kızgınlık göstermeyen
		12	24	36	48	60	72	
207	+	-	+	+	+	-	-	-
323	+	-	-	+	+	+	-	-
329	+	-	-	+	+	+	+	-
334	+	-	-	+	-	-	-	-
342	+	-	-	+	-	-	-	-
350	+	-	-	+	+	+	-	-
353	+	-	-	+	+	+	-	-
377	+	-	-	-	+	+	-	-
388	+	-	-	+	+	+	+	-
395	+	-	+	+	+	+	-	-
373	+	-	-	+	+	+	-	-
736	-	-	-	-	-	-	-	+
Toplam (%)	11 (91.67)	0 (0.0)	2 (16.67)	10 (83.33)	9 (75.00)	8 (66.67)	2 (16.67)	1 (8.33)

Mevsim dışı alıcılarda ise 13 koyundan 7 tanesinde (%53.85) kızgınlık saptandı (**Tablo 4**). Kızgınlık göstermeyen koyunlarda yapılan operatif incelemede 6 koyundan 5'inin ovaryunlarında korpus luteum ve follikül bulunduğu saptandı (**Tablo4, 9**).

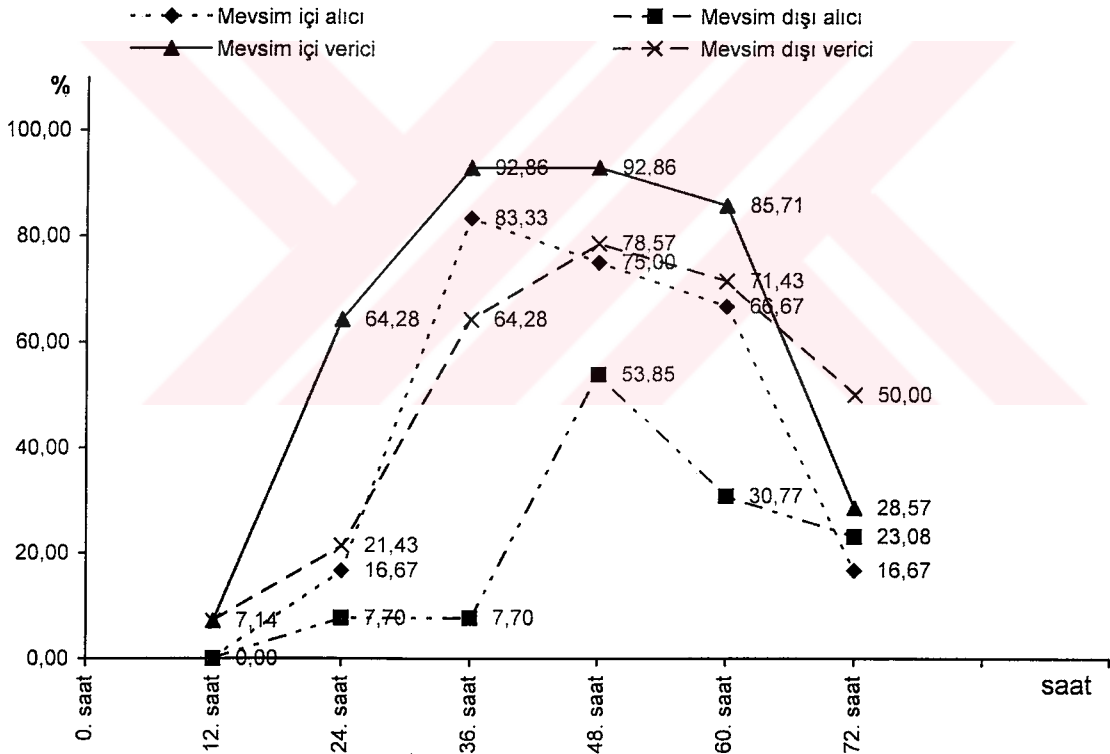
Tablo 4. Mevsim dışı alıcılarda sünger çıkarılışından itibaren yapılan kontrollarda kızgınlıkların görüldüğü süreler (n= 13).

Hayvan no	Kızgınlık gösteren	Sünger çıkarıldıktan sonra geçen süreye göre kızgınlıklar (saat)						Hiç kızgınlık göstermeyen
		12	24	36	48	60	72	
601	-	-	-	-	-	-	-	+
286	-	-	-	-	-	-	-	+
44	-	-	-	-	-	-	-	+
206	-	-	-	-	-	-	-	+
626	+	-	+	+	+	-	-	-
46	+	-	-	-	+	+	-	-
445	+	-	-	-	+	+	+	-
800	+	-	-	-	+	+	+	-
289	+	-	-	-	+	-	-	-
843	-	-	-	-	-	-	-	+
49	+	-	-	-	+	-	-	-
847	-	-	-	-	-	-	-	+
502	+	-	-	-	+	+	+	-
Toplam (%)	7 (53.85)	0 (0.0)	1 (7.70)	1 (7.70)	7 (53.85)	4 (30.77)	3 (23.08)	6 (46.15)

Mevsim içi alıcılarda senkronizasyon oranları mevsim dışı ile karşılaştırıldığında, mevsim içi bulgular mevsim dışına göre önemli derecede yüksek bulundu( $P<0.05$ ).

Mevsim içi uygulamaya alınan alıcılarda kızgınlıkların 24. saatte başladığı, 72. saatte bittiği ve 36. saatte %83.3 ile en yoğun seviyesine ulaştığı görüldü (**Şekil 1, Tablo 3, 7**).

**Şekil 1.** Sünger çıkarıldıktan sonra geçen süreye göre östrusların gruptaki kumulatif dağılımları.



Mevsim dışı alıcılarda kızgınlıklar 24. saatte başladı, 48. saatte yoğunlaştı ve 72. saatte devam ederek azaldı. Belirtilen saatlerde kızgınlık oranları sırasıyla, %7.69, %53.85, %23.08 olarak bulundu (**Şekil 1, Tablo 4, 7**).

Mevsim içi verici gruptaki 14 baş koyunun tamamı östrus gösterdi (%100.0) (Tablo 5). Mevsim içi vericilerde kızgınlıkların 12. saatte başladığı, 36. ve 48. saatlerde en yoğun seviyesine ulaştığı, 72. saatte azaldığı gözlemlendi. Belirtilen aşamalarda (12., 24., 36., 48. ve 72. saat) kızgınlık oranları sırasıyla %7.14, %64.29, %92.86, % 92.86 ve %28.57 olarak saptandı (Şekil 1, Tablo 5, 7).

Tablo 5. Mevsim içi vericilerde sünger çıkarılışından itibaren yapılan kontrollarda kaydedilen östrus bulguları (n= 14).

Hayvan no	Kızgınlık gösteren	Sünger çıkarıldıktan sonra geçen süreye göre kızgınlıklar (saat)						Hiç kızgınlık göstermeyen
		12	24	36	48	60	72	
290	+	+	+	+	+	+	-	-
312	+	-	+	+	+	+	+	-
314	+	-	+	+	+	+	-	-
324	+	-	+	+	+	+	+	-
336	+	-	-	-	-	-	+	-
341	+	-	-	+	+	+	+	-
357	+	-	-	+	+	+	-	-
358	+	-	+	+	+	-	-	-
361	+	-	+	+	+	+	-	-
397	+	-	+	+	+	+	-	-
734	+	-	+	+	+	+	-	-
301	+	-	+	+	+	+	-	-
311	+	-	-	+	+	+	-	-
322	+	-	-	+	+	+	-	-
Toplam (%)	14 (100.0)	1 (7.14)	9 (64.28)	13 (92.86)	13 (92.86)	12 (85.71)	4 (28.57)	0 (0.00)

Mevsim dışı senkronizasyon ve süperovulasyona alınan verici koyunlarda tamamının kızgınlık gösterdikleri belirlendi (Tablo 6). Bu gruptaki vericilerde östrus yanıtları, 12. saatte başladı, 48. saatte yoğunlaştı ve 72. saatte azalarak devam etti. Saatlere göre sırasıyla, % 7.14, %78.57 ve %50.00 kızgınlık oranı elde edildi (Şekil 1, Tablo 6, 7).

Tablo 6. Mevsim dışı vericilerde sünger çıkarılışından itibaren yapılan kontrollarda kaydedilen östrus bulguları (n= 14).

Hayvan no	Kızgınlık gösteren	Sünger çıkarıldıktan sonra geçen süreye göre kızgınlıklar (saat)						Hiç kızgınlık göstermeyen
		12	24	36	48	60	72	
513	+	-	-	+	+	+	-	-
125	+	-	-	-	+	+	-	-
721	+	+	+	+	-	-	-	-
265	+	-	-	-	-	+	+	-
900	+	-	-	+	-	-	-	-
576	+	-	-	-	+	+	+	-
420	+	-	-	-	+	+	+	-
608	+	-	+	+	+	+	-	-
133	+	-	-	-	+	-	-	-
87	+	-	-	+	+	+	+	-
920	+	-	-	+	+	+	+	-
81	+	-	-	+	+	+	+	-
199	+	-	+	+	+	+	+	-
71	+	-	-	+	+	-	-	-
Toplam (%)	14 (100.0)	1 (7.14)	3 (21.43)	9 (64.29)	11 (78.57)	10 (71.43)	7 (50.00)	0 (0.00)

Uygulanan östrus senkronizasyonları sonucunda herbir deneme grubu için elde edilen toplu sonuçlar ayrı ayrı ele alındığında mevsim içi alıcılarda toplam 12 hayvandan 11 tanesinin (%91.67), mevsim dışı alıcılarda 13 koyundan 9'unun (%53.85), mevsim içi ve mevsim dışında uygulamaya alınan verici koyunların ise tamamının kızgınlık gösterdiği belirlendi (**Tablo 7**).

Tablo 7. Mevsimlere göre alıcı ve verici koyunlarda sünger çıkarılışından itibaren yapılan kontrollarda kaydedilen östrus bulguları.

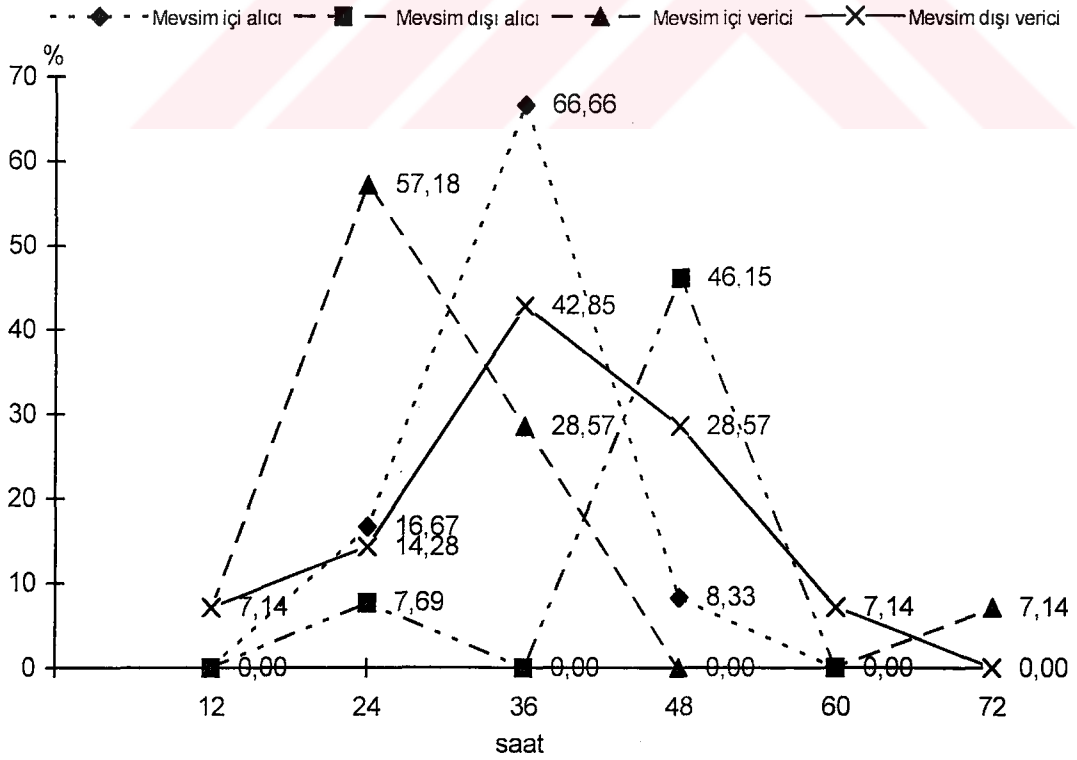
Gruplar	Hayvan sayısı(n)	Süreye (saat) göre kızgınlık gösteren hayvanların sayısı ve oranlar (%)						Toplam Östrus gösteren (%)
		12	24	36	48	60	72	
Mevsim içi alıcı	12	0 (0.00)	2 (16.67)	10 (83.33)	9 (75.00)	8 (66.67)	2 (16.67)	11 (91.67)
Mevsim dışı alıcı	13	0 (0.00)	1 (7.69)	1 (7.69)	7 (53.85)	4 (30.77)	3 (23.08)	9 (53.85)
Mevsim içi verici	14	1 (7.14)	9 (64.29)	13 (92.86)	13 (92.86)	12 (85.71)	4 (28.57)	14 (100.0)
Mevsim dışı verici	14	1 (7.14)	3 (21.43)	9 (64.29)	11 (78.57)	10 (71.43)	7 (50.00)	14 (100.0)

Gerek mevsim içi ve gerekse mevsim dışı alıcı ve vericilerde östrusların sünger çıkarılışından sonra mevsim içi alıcıların %66.66'sının 36. saatte, mevsim dışı alıcıların ise %46.15'inin 48. saatte en yoğun olarak östrusa geldikleri gözlemlendi (**Tablo 8; Şekil 2**). Mevsim içi ve mevsim dışı vericilerde en yoğun östrus başlangıç sürelerinin sırasıyla %57.18 ile 24. saat ve 42.85 ile 36. saatte görüldüğü saptandı (**Tablo 8; Şekil 2**).

Tablo 8. Mevsimlere göre alıcı ve verici koyunlarda sünger çıkarılışından sonra östrusların başlangıç sürelerine göre kaydedilen oranlar (%).

Gruplar	Hayvan sayısı(n)	Östrus başlangıç süreleri (saat) ve oranlar (%)					
		12.	24.	36.	48.	60.	72.
Mevsim içi alıcı	12	0 (0.00)	2 (16.67)	8 (66.66)	1 (8.33)	0 (0.00)	0 (0.00)
Mevsim dışı alıcı	13	0 (0.00)	1 (7.69)	0 (0.00)	6 (46.15)	0 (0.00)	0 (0.00)
Mevsim içi verici	14	1 (7.14)	8 (57.18)	4 (28.57)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (7.14)
Mevsim dışı verici	14	1 (7.14)	2 (14.28)	6 (42.85)	4 (28.57)	1 (7.14)	0 (0.00)

Şekil 2. Sünger çıkarılışından sonra östrusların başlangıç sürelerine göre hayvanların gruplardaki oranları (%).



#### 4.2. Ovaryum Bulguları:

Çalışmada operasyonlar sırasında yapılan ovaryum incelemelerinde mevsim içi alıcılarda koyun başına düşen patlamamış follikül sayısı (Follikül sayısı/koyun) ortalama  $2.50 \pm 2.29$ , mevsim dışında ise  $1.69 \pm 1.20$  olarak saptandı (**Tablo 9**).

Tablo 9. Mevsim içi ve mevsim dışı senkronize edilen alıcılarda ovaryum bulguları ortalamaları.

Grup	n	Ortalama Korpus Luteum Sayısı	Ortlama Follikül Sayısı	Follikül Ölçüleri		
				2 mm	3-4 mm	> 4 mm
Mevsim içi	8	$1.75 \pm 1.71$	$2.50 \pm 2.29$	$0.62 \pm 1.11$	$0.75 \pm 0.85$	$1.13 \pm 1.05$
Mevsim dışı	13	$2.31 \pm 1.49$	$1.69 \pm 1.20$	$0.35 \pm 0.95$	$0.38 \pm 0.92$	$0.46 \pm 1.08$

Aynı şekilde alıcılarda mevsim içi korpus luteum sayısı ortalama  $1.75 \pm 1.71$ , mevsim dışında ise  $2.31 \pm 1.49$  olarak bulundu (**Tablo 9**).

Mevsim içi ve mevsim dışı operasyona alınan alıcıların ovaryumlarında karşılaşılan mevcut normal ve kistik görünümlü folliküllerin (**Resim 3**) ölçülerine göre dağılımları ise tabloda belirtildiği gibi gözlemlendi (**Tablo 9**).

Mevsim içi vericilerde patlamamış follikül sayısı ortalama  $9.07 \pm 5.57$ , mevsim dışı vericilerde ise  $4.57 \pm 3.01$  olarak gerçekleşti (**Tablo 10**).

Tablo 10. Mevsim içi ve mevsim dışı senkronize edilen vericilerde ovaryum bulguları ortalamaları.

Grup	n	Ortalama CL Sayısı	Ortlama Follikül Sayısı	Follikül Ölçüleri		
				2 mm	3-4 mm	> 4 mm
Mevsim içi	14	$4.43 \pm 2.82$	$9.07 \pm 5.57$	$0.0 \pm 0.0$	$0.86 \pm 1.35$	$8.21 \pm 5.48$
Mevsim dışı	14	$4.57 \pm 4.19$	$4.57 \pm 3.01$	$0.07 \pm 0.26$	$1.36 \pm 1.91$	$3.14 \pm 3.04$



Mevsim içi vericilerde ortalama korpus luteum sayısı  $4.43 \pm 2.82$ , mevsim dışında  $4.57 \pm 4.19$  olarak saptandı (**Tablo 10**).

Mevsim içi ve mevsim dışı operasyona alınan vericilerin ovaryumlarında karşılaşılan mevcut folliküllerin ölçülerine göre dağılımları ise tabloda belirtildiği gibi gözlemlendi (**Tablo 10**).

### 4.3. Embriyoların Kazanılması ve Transferleri

Kızgınlıkların belirlenmesinden 7 gün sonra operasyona alınan mevsim içi vericilerden koyun başına ortalama  $1.71 \pm 1.83$  adet embriyo kazanıldı. Kazanılan embriyoların değerlendirmesi sonucu sağlıklı bulunanlardan ortalama  $1.43 \pm 1.55$  tanesinin transfer edilebilir nitelikte olduğu gözlemlendi (**Tablo 11**).

Tablo 11. Mevsim içi ve mevsim dışı senkronize edilen vericilerde kaydedilen korpus luteum sayıları ve kazanılan embriyo ortalamaları.

Grup	n	Ortalama korpus luteum Sayısı	Kazanılan Embriyo Sayısı	Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı
Mevsim içi	14	$4.43 \pm 2.82$	$1.71 \pm 1.83$	$1.43 \pm 1.55$
Mevsim dışı	14	$4.57 \pm 4.19$	$1.86 \pm 2.61$	$1.50 \pm 1.84$

Mevsim dışı vericilerden ortalama  $1.86 \pm 2.61$  embriyo elde edilerek, bunlardan ortalama  $1.50 \pm 1.84$ 'ünün transfer edilebilir nitelikte olduğu görüldü (**Tablo 11**).

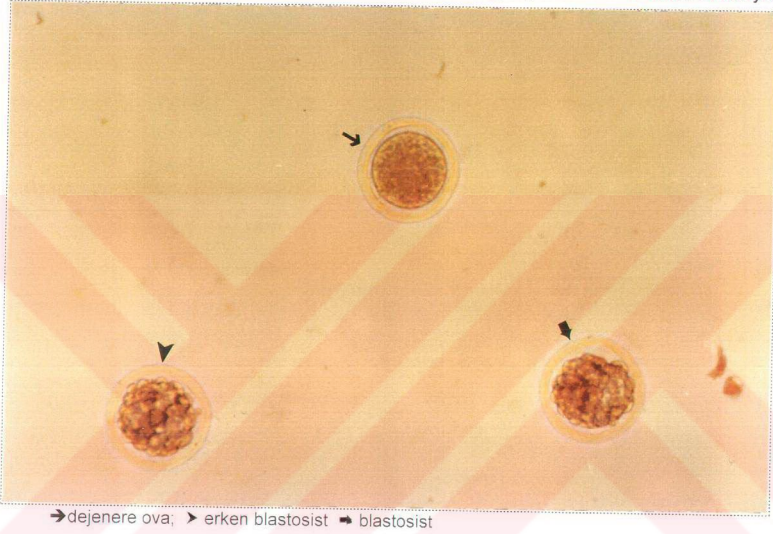
Tablo 12. Mevsim içi ve mevsim dışı senkronize edilen vericilerde kazanılan embriyoların gelişim safhalarına göre sayıları ve oranları (%).

Gruplar	n	Embriyo Sayısı	Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı (%)	Embriyoların Gelişim Safhaları (%)			
				8-16 Bl.	Morula	Blastosist	Dejenere
Mevsim içi	14	24	20(83.33)	1 (4.17)	9 (37.50)	10 (41.67)	4 (16.67)
Mevsim dışı	14	26	21(87.50)	3 (12.50)	12 (50.00)	6 (25.00)	5 (20.83)

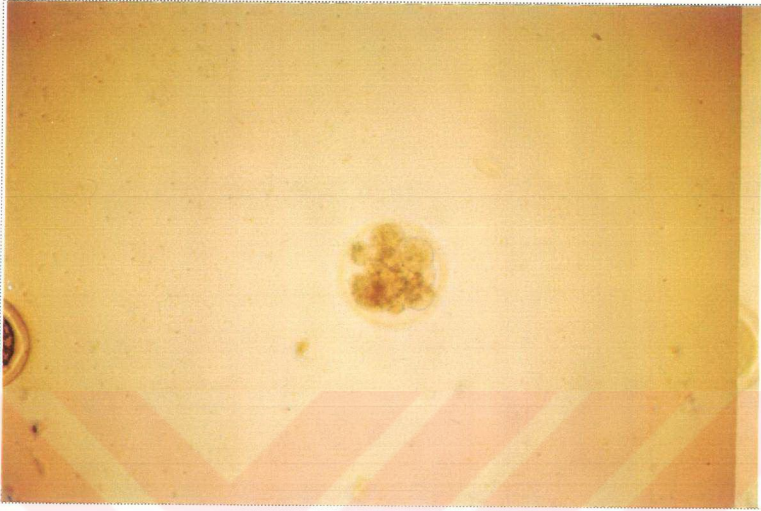
Bl: blastomer

Vericilerde yapılan yıkamalarda, mevsim içinde kazanılan toplam 24 adet hücreden 20 tanesinin (%83.33) transfer edilebilir olduğu, 1 tanesinin (%4.17) 8 blastomerli, 9 tanesinin ((%37.50) morula, 10 tanesinin (%41.67) blastosist (Resim 6, 8)

**Resim 8.** Uterus yıkaması ile kazanılan farklı gelişme safhasındaki embriyolar



ve 4 tanesinin de (%16.67) dejenere(Resim 9) olduğu, mevsim dışında ise bu değerler sırasıyla 26, 21 (%87.50), 3 (%12.50), 12 (%50.00), 6 (%25.00) ve 5 (%20.83) olarak belirlendi (Tablo 12).

**Resim 9. Dejenere bir embriyo**

Kazanılan embriyoların transfer edilebilir nitelikte olanlarından mevsim içinde 14 tanesi ve mevsim dışında ise 20 tanesi alıcılara transfer edildi (**Tablo 13**).

#### 4.4. Gebelik Sonuçları:

Gebelik sonuçları doğum oranları esas alınarak saptandı. Mevsim içinde embriyo verilen 7 alıcıdan 3 tanesinin (%42.86), mevsim dışı ise 13 alıcıdan 3 koyunun (%23.07) doğurduğu belirlendi (**Resim 10**) (**Tablo 13**). Mevsim içinde ikizlik elde edilemezken, mevsim dışı %7.69'luk bir ikizlik oranı sağlandı (**Tablo 13**).

Tablo 13. Mevsim içi ve mevsim dışı vericilerden kazanılan ve transfer edilen embriyo sayıları ile transfer gerçekleştirilen alıcı koyunlar ve doğum oranları.

Grup	Verici sayısı	Kazanılan Toplam Embriyo Sayısı	Transfer Edilen Embriyo Sayısı	Alıcı Sayısı	Doğum Yapan Alıcı Sayısı (%)	Doğan Yavru Sayısı	İkiz Doğum Sayısı (%)
Mevsim içi	14	24	14	7	3 (42.86)	3	0(0.00)
Mevsim dışı	14	26	20	13	3 (23.07)	4	1(7.69)

**Resim 10.** Embriyo transferi nden doğan bir yavru ile verici ve alıcı koyunlar.



### 5.TARTIŞMA VE SONUÇ:

Dünya nüfusunun hızla arttığı günümüzde gıda açığının aynı oranlarda büyüdüğü gözlenmektedir. Mevcut açığın giderilmesi açısından hayvansal üretimin mümkün olduğunca artırılması gerekmektedir. Bunun için de sun'i tohumlama, kriyobiyoloji, gen transferi, gibi biyoteknolojik yöntemler gündeme gelmekte ve hızla gelişme kaydedilmektedir. Bunların içinde sun'i tohumlama ve kısmen de embriyo transferi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu yöntemler içinde bulunan embriyo transferinin başarısı, metod içinde uygulanan östrus senkronizasyonu ve süperovulasyonunun başarısına bağlı bulunmaktadır. Gerek mevsim içinde ve gerekse mevsim dışında uygulanacak olan östrus senkronizasyonu yönteminin iyi seçilmesi gerekmektedir.

Koyunların embriyo transfer tekniğinde çeşitli östrus senkronizasyon yöntemleri kullanılmaktadır (1, 4, 58, 68, 72, 75). Bu yöntemlerden intravaginal progesteron emdirilmiş sünger ile birlikte PMSG kullanımı, yüksek senkronizasyon oranları sağlamaktadır (1, 30, 46, 65, 72). Mevsim içinde senkronizasyon amacıyla tek başına veya başka hormonlarla birlikte progesteronlar ve prostaglandinler en sık kullanılan hormonlardandır (1, 3, 4, 8, 27, 35, 42, 43, 46, 65).

Sunulan çalışmada embriyo transfer amacıyla vericilerde mevsim içi ve mevsim dışında progesteron emdirilmiş süngerler 14 gün vagende bırakılmıştır. Sünger çıkarılışından 48 saat önce 1500 IU. PMSG enjeksiyonu yapılarak uygulanan östrus senkronizasyonunda tüm verici hayvanların (%100.0) kızgınlık gösterdiği ve çiftleştikleri gözlenmiştir (Tablo 5, 6, 7).

Alaçam ve ark (3) mevsim içi iki ayrı grupta sırasıyla progesteron emdirilmiş süngerler ve prostoglandin enjeksiyonu kullanarak senkronizasyon gerçekleştirdikleri koyunlarda %91.48 ve %90.90 gibi çok yakın oranlar kaydetmişlerdir. Öte yandan Tekin ve ark. (71), Merinos koyunlarında progestagen (FGA) + PMSG uygulamasıyla %96.7 senkronizasyon elde etmişlerdir. Sunulan çalışmada saptanan senkronizasyon oranları diğer araştırmacıların elde ettikleri senkronizasyon oranlarından daha yüksek gerçekleşmiştir. Bunun sebebi, yapılan çalışmada PMSG' nin süperovulatör dozda uygulanmasına bağlanabilir.

Çalışmada, mevsim içi ve mevsim dışı alıcılarda senkronizasyon oranları sırasıyla %91.6 ve %53.84 olup mevsim içi senkronizasyon oranı mevsim dışına göre oldukça yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Mevsim içi alıcılardan elde edilen senkronizasyon oranları diğer çalışmalara benzer şekilde olmasına karşın, mevsim dışındaki oranlar oldukça düşük düzeyde gerçekleşmiştir (3, 71). Bununla birlikte mevsim içi alıcı ve vericilerden elde edilen bulgular, prostaglandinlerle yapılan diğer çalışmalara göre (43, 71), İleri'nin (36) tiaprost'la elde ettiği %100 kızgınlık oranı hariç, yüksek bulunmuştur. Mevsim içi ve mevsim dışı elde edilen bulgular göz önünde tutulduğunda, mevsim içinde progestagen+ PMSG ile elde edilen sonucun üstünlüğünü, diğer araştırmaların sonuçları da desteklemektedir (1, 3, 43, 71). Oysa, mevsim dışı alıcılardan elde edilen sonuçların, literatür verilerinden düşük olduğu görülmektedir. Bu düşüklüğün sebebi, arama koçlarının mevsim dışındaki libido yetersizliği nedeni ile koyunlardaki kızgınlıkların tam olarak tesbit edilememesi ve sakin kızgınlığa bağlanabilir. Çünkü, mevsim dışında kızgınlık göstermeyen alıcı koyunların ovaryum bulguları göz önünde tutulduğunda, kızgınlık gösteren koyunlarla önemli bir farkının olmadığı ve aktif korpus luteumların bulunduğu saptanmıştır (Tablo 3, 4, 7, 9).



Östrusların başlangıç süreleri mevsim içi ve mevsim dışı alıcı gruplarında karşılaştırıldığında, mevsim içi grubun sünger çıkarılışından 36 saat sonra daha yoğun olarak (%66.66) östrus gösterdikleri, mevsim dışında ise bu sürenin 48. saate uzadığı (%46.15) gözlemlendi ve aralarında önemli bir farkın bulunduğu ( $P<0.001$ ) saptandı (**Şekil 2**). Süngerler çıkarıldıktan sonra geçen süreler göre östrusların kumulatif dağılımları ise yine mevsim dışı alıcılarda yoğunluğun daha uzun sürelere doğru kaydığı (48. saat %53.85) mevsim içinde ise koyunların 36. saatte çoğunluğunun (%83.33) östrus gösterdiği, mevsim farkının oldukça etkili olduğu gözlemlendi ( $P<0.001$ ) (**Şekil 1**).

Çalışmada mevsim dışı ve mevsim içi vericilerde, koyun başına ortalama C.L. sayısı sırasıyla  $4.57 \pm 4.19$  ve  $4.43 \pm 2.82$  olarak saptanmıştır. Yapılan istatistik değerlendirmelerde mevsim dışı ve mevsim içi elde edilen sonuçlar arasında önemli bir fark görülmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar, Bondioli ve ark.(10)'nın bildirdikleri değerlerden düşük, Barry ve ark.(6)'nın buldukları sonuçlarla hemen hemen benzer olarak gerçekleşmiştir. Öte yandan Heart(33)'nin çalışmasında saptadığı sonuçlardan oldukça düşük veriler elde edilmiştir. Belirtilen araştırmaların sonuçlarına göre genel bir değerlendirme yapılırsa, uygulanan farklı süperovulatör ajanın ovaryum bulgularında etkili olabileceğini akla getirmektedir. Sunulan çalışma ile benzer sonuç elde eden Barry ve ark.(6)'nın süperovulatör ajan olarak PMSG kullandığı, oysa diğerlerinin (10, 33) FSH kullandıkları görülmektedir. Nitekim, Heart (33) FSH ve PMSG'yi karşılaştırmış ve FSH'dan daha yüksek süperovulasyon oranı elde etmiştir. Bununla birlikte, çalışmada süperovulatör ajan olarak 1500 IU PMSG kullanan Rainio (55)'nin elde ettiği ovulasyon oranı, sunulan çalışmada elde edilen ovulasyon oranından yüksektir. Aynı ajan ve doz kullanılmasına karşın şekillenen bu farklılık,



koyun ırkı ve çevre faktörlerinin (bakım, besleme ve iklim) değişik olmasına bağlanabilir.

Sunulan çalışmada kazanılan embriyo sayısı mevsim içi ve mevsim dışı vericilerde koyun başına sırasıyla ortalama  $1.71 \pm 1.83$  ve  $1.86 \pm 2.61$  olarak saptanmıştır. Bunlardan gruplara göre sırasıyla ortalama  $1.43 \pm 1.55$  ve  $1.50 \pm 1.84$  tanesi transfer edilebilir nitelikte (Vericilerde sperovulasyon oluşturulduğu ve buna bağlı olarak gecikmiş ovulasyonlar olabileceği düşüncesi ile 8-16 blastomerli embriyolar da sağlıklı olarak değerlendirildi.) sağlıklı görünümdeki embriyolar olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçların Heart (33), Smith (67) ve Rainio (55)'un bildirdikleri sonuçlardan düşük olduğu görülmektedir.

Araştırmada mevsim içi alıcılarda %42.86 doğum gerçekleşirken, ikizlik gözlenmemiştir. Mevsim dışı transfer gerçekleştirilen koyunlarda ise %23.08 doğum, %7.69 ikizlik oranı saptanmıştır. Mevsimler arası karşılaştırma yapıldığında mevsim içi doğum oranı daha yüksek bulunmasına rağmen aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur. Nitekim, Vivianco ve ark.(73) elde ettikleri sonuçlara göre, mevsim içi ve mevsim dışı embriyo yaşam oranı açısından fark saptamadıklarını bildirmişlerdir.

Koyunlarda embriyo transferi yapan Eseh ve Sergi (25) %55.2, Stefani ve ark. (69) %65.0, Buckselve ve ark. (14) %76.9 fertillite elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların saptadıkları fertillite oranları sunulan çalışmada elde edilen fertillite oranlarına göre yüksektir. Fakat, sözü edilen araştırmacıların fertillite oranlarını gebelik oranlarına göre, sunulan çalışmada ise doğum oranlarına göre saptandığı göz önünde tutulması gerekmektedir. Aynı zamanda bu çalışmalarda kullanılan materyalin farklı ırklar olduğu da dikkate alınmalıdır. Bununla birlikte, çalışmada kaydedilen oranlara benzer olarak, yaptıkları transferlerden Mauer (44) %47.7,

Walter ve ark. **(74)** %41.0, Schiewe ve ark. **(64)** %16.6, Bucksell ve ark. **(14)** %22.0 oranlarında fertilitte elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Yukarıda belirtilen araştışıcıların saptadıkları fertilitte oranları değişkenlik göstermektedir. Sunulan çalışmada elde edilen fertilitte oranları kimi araştışıcıların bulduklarından düşük gerekleşiirken **(14, 25, 69)**, çoğu araştışıcının bildirdikleri değerlere benzer veya yüksek olduğu görülmektedir **(14, 44, 64, 74)**. Görülen farklılıkların sebebi, transfer metoduna, ırk faktörüne ve çevresel faktörlere bağlanabilir. Bu faktörlerin çalışma üzerinde ayrı ayrı veya birlikte etkili olduğu göz önünde tutulursa ve sonuçların diğer çalışmaların sonuçlarıyla bir lde benzer olduğu dikkate alınırsa, elde edilen fertilitte oranı mevcut şartlara göre çalışmanın ilk kez yapıyor olmasına rağmen başarılı olarak kabul edilebilir.

Gerek senkronizasyon ( $P < 0.05$ ) gerekse ovaryum bulguları ve doğum oranlarının mevsim içi uygulamalarda daha yüksek ( $P > 0.05$ ) bulunması nedeniyle, mevsim içi uygulamaların mevsim dışına göre daha başarılı olduğu sonucuna varılabilir. Bununla birlikte kullanılan süperovulatör ajanın PMSG oluşunun araştırmanın sonuçlarını etkilediği söylenebilir. Nitekim, PMSG'nin progesteron salınımını artırarak spermatozoa transportu üzerinde olumsuz etki yapabildiği bilinmektedir **(11)**. Yapılan araştışmada tohumlamaların şirurjikal yolla intra uterin tohumlama yerine doğal aşım oluşu dikkate alınırsa bu olumsuz faktör çalışma sonuçlarına da yansımış olabilir. Superovulatr ajan olarak FSH'nin kullanılmasının PMSG uygulamalarına nazaran daha başarılı sonuçlar verdiği bilinmektedir **(10, 33, 63)**. Bundan dolayı senkronizasyon ve embriyo transfer çalışmalarında FSH'nin superovulatr ajan olarak kullanılmasının fertilitteyi olumlu yönde etkileyebileceği söylenebilir. Yapılan çalışmada ovaryumlar üzerinde büyük çaptaki follikül sayısının fazla olduğu, ovulasyon oranlarının düşük olduğu ve dolaysı ile kazanılan embriyo

sayısının da az olduğu gözlenmiştir. Bondurant (11) hCG'nin LH'ya göre LH etkisinin yanı sıra FSH etkisine de sahip olduğunu, ayrıca hCG'nin yarılanma ömrünün de uzun olduğunu bildirmiştir. Çalışmada büyük çaplı follikül sayılarının fazla olması ve dolayısıyla ovulasyon oranlarının düşüklüğü, Bondurant'ın (11) bildirdiği hCG'nin bu etkileşimine bağlanabilir. Böylece ovulasyonları indüklemek amacıyla hCG yerine LH'nın kullanılması ile daha üstün sonuçlar alınabileceği düşünülebilir.

Embriyo transfer çalışmalarının laparotomi yöntemine kıyasla , literatür kaynaklarda belirtildiği gibi, gebelik oranlarının daha yüksek, postoperatif komplikasyonların minimumda olması ve yöntemin laparotomi yöntemine göre daha fazla sayıda tekrarlanabilmesi nedeni ile laparoskopik yöntemle yapılması daha başarılı sonuçlar alınmasını sağlayabilir.

## 6. ÖZET

Çalışmada mevsim içinde ve mevsim dışında MAP emdirilmiş süngerler ile senkronize edilen alıcı ve verici kıvırcık koyunlarında embriyo transferi ve sezonun embriyo transferine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Bunun için mevsim içinde 12 alıcı ve 14 adet verici, mevsim dışında ise 13 alıcı ve 14 verici Kıvırcık ırkı koyun kullanıldı. Gruplardaki koyunlara MAP emdirilmiş süngerler 14 gün süre ile vagen içine yerleştirildi. Alıcı koyunlarda süngerlerin çıkarılışından 24 saat önce 500 IU, verici koyunlarda ise süperovulasyon oluşturmak için 36 saat önce 1500 IU PMSG kas içi yolla uygulandı. Sünger çıkarılışından itibaren her 12 saatte bir arama koçları aracılığı ile kızgınlıkta olan koyunlar belirlendi. Kızgınlık gösteren alıcılara anında 500 IU hCG enjeksiyonu yapıldı. Verici koyunlara ise östrus tespitinden hemen sonra 1000 IU hCG uygulanarak elde sıfat yöntemi ile tohumlandılar. Vericilerin kızgınlık belirtileri kayboluncaya kadar her 12 saatte bir çiftleşmeleri sağlandı.

Verici koyunlar östrus başlangıcından 7 gün sonra operasyona alınarak uterus yıkaması ile embriyolar kazanıldı. Embriyolar değerlendirildikten sonra uygun bulunanlar senkronize edilmiş alıcı koyunların uteruslarına transfer edildi. Alıcı koyunlar takip edilerek doğumlar kaydedildi. Fertilité oranları doğumlara göre saptandı.

Mevsim içi ve mevsim dışında alıcı koyunların sırasıyla %91.67 ve %53.85'inin östrus gösterdikleri belirlendi ( $P < 0.05$ ). Vericilerde ise östrus oranlarının her iki grupta da %100.0 olduğu gözlemlendi. Alıcı koyunlarda Sünger çıkarılışından itibaren, nevsim içinde (36. saat: %66.66) mevsim dışına göre (48. saat: %46.15) östrusların

daha erken başladığı saptandı ( $P<0.001$ ). Buna benzer olarak mevsim içinde 36. saatte alıcı koyunların çoğunluğunun (%83.33) östrusda olduğu, mevsim dışında ise bu yoğunluğun 48. saatte (%53.85) olduğu gözlemlendi ( $P<0.001$ ).

Yapılan operasyonlarda mevsim içi alıcı koyunların ovaryumlarında ortalama  $1.75 \pm 1.71$  adet korpus luteum, mevsim dışında ise  $2.31 \pm 1.49$  adet korpus luteum bulunduğu tespit edildi. Verici koyunlarda ise bu değerler sırasıyla  $4.43 \pm 2.82$  ve  $4.57 \pm 4.19$  olarak belirlendi.

Verici koyunlardan uterus yıkaması ile mevsim içinde koyun başına ortalama  $1.71 \pm 1.83$ , mevsim dışında ise  $1.86 \pm 2.61$  adet embriyo kazanıldı. Mevsim içinde 14 koyundan kazanılan toplam 24 embriyonun 20 tanesinin (%83.33), mevsim dışında ise 14 koyundan kazanılan toplam 26 embriyodan 21'inin (%87.50) transfer edilebilir olduğu gözlemlendi. Kazanılan embriyolardan mevsim içinde 14 tanesi 7 alıcının uterusuna, mevsim dışında ise 20 tanesi 13 adet alıcıya transfer edildi. Gebelik süreleri sonunda mevsim içi 7 alıcıdan 3 tanesi (%42.86), mevsim dışında ise 13 alıcıdan 3 tanesi (%23.07) doğum yaptı ( $P>0.05$ ). Doğum yapan koyunlardan mevsim dışındakilerden sadece 1 tanesinde (%7.69) ikizlik gerçekleşti.

Çalışma sonucunda senkronizasyon ( $P<0.05$ ) ve ovaryum bulguları ile doğum oranlarının mevsim içi uygulamalarda daha iyi ( $P>0.05$ ) sonuç vermesi nedeniyle, mevsim içi yapılacak embriyo transfer çalışmalarının mevsim dışına göre daha başarılı olabileceği sonucuna varıldı.

## **7. SUMMARY**

The goal of this study was embryo transfer in Kivircik ewes synchronised by MAP sponges in and out of the breeding season and to investigate the effects of season on embryo transfer.

12 recipients and 14 donor Kivircik ewes were used in the season and 13 recipients and 14 donors were used out of the season. MAP sponges were administered to the ewes for 14 days. The recipient ewes were injected with 500 IU PMSG 24 h prior the withdrawal of the sponges and the donors were injected with 1500 IU PMSG to achieve superovulation 36 h before the withdrawal of the sponges by IM route.

After the removals of the sponges heat detection was carried out by teasing rams every 12 hour. Recipients on heat were injected by 500 IU hCG immediately. Donors were injected by 1000 IU hCG after heat detection and mated under control. Donors were mated every 12 hour until the oestrus behaviours disappear.

Embryos were collected by uterus flushing from the donors 7 days after the onset of oestrus. The embryos were evaluated and the ones suitable for transfer were transferred to the uteri of recipients. Recipient ewes were kept under control and lambings were recorded. Fertility rates were determined according to delivery rates.

Recipient ewes had an oestrus rate 91.67% and 53.85% respectively in and out of the season ( $p < 0.05$ ). This rate was 100% in both donor groups. Oestrus behaviours began earlier ( $p < 0.001$ ) in recipients after the withdrawal of sponges in

season (36. Hour 66.66%) than out-season (48. Hour 46.15%). Similarly most of the recipients (83.33%) were on heat at 36th hour in the season. This rate was highest (53.85%) at 48th hour out of the season ( $p < 0.001$ ).

In the season  $1.75 \pm 1.71$  and out of the season  $2.3 \pm 1.49$  corpus luteum were observed on the ovaries of the recipients. These values were  $4.43 \pm 2.82$  and  $4.57 \pm 4.19$  in the donors.

In the season  $1.71 \pm 1.83$  embryos per ewe and out of the season  $1.86 \pm 2.61$  per ewe were recovered from the donors by uterus flushing. In the season total 24 embryos were recovered from 14 ewes and 20 of these (83.33%) were transferable. Out of the season total 26 embryos were recovered from 14 ewes and 21 (87.50%) of these were transferable. In the season 14 of the recovered embryos were transferred to the uteri of 7 recipients and out of the season 20 embryos were transferred to 13 recipients. At the end of the gestation 3 of 7 ewes (42.86%) in the season and 3 of 13 ewes (23.07%) out of the season delivered ( $p > 0.05$ ). Only one ewe from the out-season group had twins (7.69%).

At the end of the study, since the synchronisation ( $p < 0.05$ ) and ovarial findings and birth rates gave better results in the season ( $p > 0.05$ ), it is concluded that embryo transfer will be more successful in the breeding season



## 8. LİTERATÜR LİSTESİ

1. Alaçam, E. ve ark. (1986): Anöstrus dönemindeki koyunlarda ovariel aktivitenin Medroksi Progesteron Asetat (MAP) ve PMSG hormonu ile kontrol altına alınması üzerinde çalışma. Ulu. Ün. Vet. Derg. Sayı: 1-2-3, Cilt: 5-6, Yıl: 6-7, 103-110.
2. Alaçam, E. (1990): Koyunlarda embriyo nakli:Koyun ve Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği,504-507.
3. Alaçam, E. (1993): Koyunlarda siklik düzen ve üremenin denetlenmesi. Hayvancılık Araştırma Dergisi (1993), 3, 2, 65-69.
4. Arthur, G.H., Noakes, D.E., Pearson, H. (1989): The oestrus cycle and its control. p: 3-45 Bailliere Tindall. In: Veterinary Reproduction and Obstetrics.
5. Arthur,G.H., Noakes, D.E. and Pearson,H.(1989): Embriyo transfer in large domestic animals, 603-618, Ed., Bailliere Tindall In: Veterinary Reproduction And Obstetrics.
6. Barry, D.M., et al (1988): Superovulatory response and time of ovulation in sheep treated with FSH-P or PMSG followed by GnRH or hCG. Theriogenology 29(1), 217
7. Barry, D.M. et al. (1990): Cervical embriyo collection in sheep after "Ripening" of the cervix with prostoglandin E<sub>2</sub> and estradiol. Theriogenology, 33(1), 190
8. Beck, N., F., G., et al. (1987): Oestrus synchronisation and fertility in ewes: A omparison of three methods. Anim. Prod. 1987. 44, 251-254.
9. Boland, M., P., et al. (1988): Factors influencing the superovulatory response in sheep. Theriogenology

10. Bondioli, K., R., et al. (1982): Induction of estrus and superovulation in seasonally anestrous ewes. *Theriogenology*. 17(1), 74
11. Bondurant, R., H. (1986): Embryo transfer in sheep and goats., 63-66, Ed., Morrow, D., A., In: *Current Therapy In Theriogenology*.
12. Bowen, R., A., Pineda, M., H. (1989): Embryo transfer in domestic animals, 526-555., Ed., L.E., McDonald. In: *Veterinary Endocrinology And Reproduction*.
13. Britt, J., H. (1987): Induction and Synchronisation of Ovulation. p.507-516. Ed: J.E.S.E.Hafez. In: *Reproduction in Farm Animals*.
14. Buckrell, B., C., et al. (1989): Results of a commercial sheep embryo transfer program. *Theriogenology*. 31 (1),178
15. Buckrell, B., C., et al. (1990): Superovulation in Dall's Sheep. *Theriogenology*. 33 (1),201
16. Buckrell, B., C., et al. (1993): Evaluation of a transcervical AI technique for transferring embryos in sheep. *Theriogenology*. 39, 197
17. Capehart, J., S., et al, (1984): A modified technique for the collection of uterine stage ovine embryos. *Theriogenology*. 21 (1), 227.
18. Carpenter, R., H., Spitzer, J., C. (1981): Response of anostrous ewes to norgestomet and PMSG. *Theriogenology*, 15 (4) 389-393.
19. Crosby, T., F. (1993): Superovulation in sheep: The effects of pFSH Tup and breed. *Theriogenology*. 39,205.
20. Drost, M. (1986): Embryo Transfer., 927-941, Ed.Roberts,In: *Veterinary Obstetrics And Genital Diseases*.
21. Driancourt, M., A. (1991): Follicular Dynamics In Sheep And Cattle. *Theriogenology*.35 (1); 55-79.

22. Duratoye, L., A., et al.(1991): Effect of constant-release melatonin implants on the onset of oestrus activity on reproductive performance in the ewe. p. 489-497 Anim.prod. (1991) 52: 489-497
23. Echterkamp, S., E. (1982): Influence of breed and season on ovarian and pituitary response in progesteron- PMSG treated ewes. Theriogenology. 18 (1),95-106.
24. Ensminger, M., E. (1983): Breeding sheep. Anim.Sci.Ch.31, 627-631. The interstate, printersxpublishers, inc.Danuille, Illinois.
25. Eseh, S., Seregi, J. (1993): Practical experiences with sheep embriyo transfer. Theriogenology. 39, 207
26. Fairnie, I., J., Martin, E., R., Rogers, S., C. (1978): The lambing performance of merino ewes following synchronisation of ovulation with cloprostenol. A prostoglandin analogue (ICI 80996). P.Aus.Soc.Anim.Prod. 12, 56.
27. Faure, A.S., Boshoff, D.A., Burger, F.J.L. (1983): The effect of whole and halved sponges combined with either subcutaneous or intravenous administration of PMSG on synchronisation of the estrus cycle of Karakul ewes. Anim. Breed. Abst. 52 (4), Abst. 1784.
28. Flores-Foxworth, G. et al (1992): A comparison between laparoscopic and transcervical embriyo collection and transfer in goats Theriogenology. 37 (1), 213.
29. Hacket, J.A., Robertson, H.A. (1981): Effect of dose and time of injection of prostoglandin F2 $\alpha$  in cyclig ewes. Theriogenology. 13 (5), 374-351
30. Hackett, A.J, Wolynets, M.S. (1982): Effect of PMSG on the reproductive performance of totally confined ewes bred at synchronised estrus. Theriogenology. 17 (2),215-221.
31. Hafez, E.S.E. (1986): Embriyo transfer, IVF and genetic engineering.528-568.,Ed., E.S.E, Hafez, In: Reproduction In Farm Animals.

32. Hawk, H.W., et al. (1981): Increased sperm death in the cervix and uterus of estrus ewes after regulation of estrus with prostoglandin or progestagen. *Journal of Animal Science*. 52 (3), 601-610.
33. Heard, T.M.; Walker, S.K. (1992): Premature ovulation and embriyo collection in the ewe. *Theriogenology*, 37 (1), 220
34. Hoffman, K.A., et al (1988): Once daily versus twice daily treatments with Follicule Stimulating Hormone in ewes synchronised with different doses of norgestomet. *Theriogenology* 29(1), 261.
35. Hoppe, K.F., sluter, A.L. (1989): Effects of prostoglandin F2 $\alpha$  on synchronising ovine estrus using a modified single injection regimen. *Theriogenology*. 31 (8),1191-1200.
36. İleri, İ.K. (1985): Koyunlarda bir prostoglandin analogu olan Tiaprost (İliren) ile östrus sinkronizasyonu ve sun'i tohumlama çalışmaları. *İ.Ü.Vet.Fak.Derg.* 11 (1), 15-30
37. İleri, İ.K., Ak, K., Pabuççuoğlu, S., Usta, S. (1994): Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama ders notları No: 23 İstanbul Üniv.Vet.Fak.Yayıni, İstanbul.
38. Jainudeen, M.R. (1986): Sheep and goats., 315-323,Ed., E.S.E, Hafez, In: *Reproduction In Farm Animals*.
39. Khalid, M.; Jackson, G.L. (1991): Exposure of ewes to long-day photoperiod before the winter solstice can disrupt refractoriness to short days. *Animal Reprod. Science* 25, 225-232. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam
40. Kraemer, D.C. (1989): Embriyo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology*. 31 (1), 141-148.
41. Legender, X., et al. (1988): Embriyo collection from ewes by laparoscopy using A3-way rigid catheter. *Theriogenology* 29(1), 269.
42. Lopez, G., Martinez, J.A. Garcia, P. (1988): Ovulation control of merino ewe lambs born during sexual season and seasonal anoestrus, influence of mating age. 11th

International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin. Ireland (1988) 555-557.

43. Loubser, P.G., Niekerk, C.H. (1991): Estrus synchronisation in sheep with progesteron-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostoglandin analogue. *Theriogenology*. 15 (6), 547-552.
44. Maurer, R.R. (1988): Embriyo splitting and transfer in sheep. *Theriogenology*. 29 (1),276.
45. Mc Donald, M.F. (1986): Eostrous Synchronisation and Control of The Eostrus Cycle. p. 887-889. Ed. Morrow. In: *Current Therapy in Theriogenology*.
46. Meinecke-Tilman, V.S., Wassmuth, R. (1978): Sonderdruck aus Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie Bd. 94 (1977/78), H. 3/4, S. 209-216.
47. Mekelvey, W.A.C., et al. (1986) : Repeated recoveries of embriyos from ewes by laparascopy. *Theriogenology*. 25 (6), 855-865.
48. Melin, T.N., Busch, R.D. (1975): Effect of PGF<sub>2α</sub> on luteal function of the ewe. *J. Anim. Sci.* 39, 218
49. Moore, N.W. (1982) : Egg transfer in the sheep and goat. p.119-133. Ed. Cyrill E. Adams. In: "Mammalian Egg Transfer" Florida.
50. Mopletoft, R.J.(1986): Embriyo transfer and genetic engineering.,51-53., Ed., Morrow,D.A.,In: *Current Therapy In Theriogenology*.
51. Mutiga, E.R., Baker, A.A. (1982): Ovarian response, ova recovery on fertility in merino ewes superovulated either during the luteal phase of their oestrus cycle or after intravaginal progestagen treatment. *Theriogenology*. 17 (5), 537-544
52. Pineda, M.H. (1989); *Reproductive Patterns Of Sheep And Goat*, 428- 447, Ed, L.E, Mc Donald. In ; *Veterinary Endocrinology And Reproduction*.
53. Quirke, J.F., et al. (1979): Oestrus, time of ovulation, ovulation rate and conception rate in progestagen treated ewes given Gn-rh, GnRH analogues and gonadotropins. *J.Prod. Fert.* (1979): 56, 479-488.

54. Qin, G., Shu-Lši, N. (1980): A simplified method of embriyo transfer in sheep. 9th International Congress on Animal Reproduction. A.I. vol. V. Symposia (6 to 9), 543-547, 16-20 June/Spain-Madrid.
55. Rainio, V. (1991): PMSG-dose in Finnsheep embriyo production. *Theriogenology* 35 (1), 261
56. Raino, V. (1992): Estrus synchronisation in Finn sheep with cloprostenol. *Theriogenology*. 37 (1), 280.
57. Reeves, J.J. (1987): Endocrinology of reproduction., 85-106,Ed., E.S.E, Hafez, In: *Reproduction In Farm Animals*.
58. Rhodes, L., Nathanielsz, P.W. (1988): Comparing of a controlled internal drug release device containing progesteron with intravaginal medroxy progesterone sponges for estrus synchronisation in ewes. *Theriogenology*. 30 (4), 831-836.
59. Rickords, L.F., White, K.L. (1988): Dinoprostone induce cervical dilation in the ewe. *Theriogenology*. 29 (1), 296.
60. Riddel, G., et al (1988): Superovulation of sheep during the spring and summer in the Southeastern United States. *Theriogenology*. 29 (1), 297
61. Roberts, S.J.(1986): Infertility in ewes and does.654-674. Ed.Roberts,In: *Veterinary Obstetrics And Genital Diseases*.
62. Robertson, H.A.(1977): Reproduction in the ewe and goat. Ch. 18, 475- 498. Ed., H.H. Cole and P.T. Cupps. In: *Reproduction In Domestic Animals*.Academic Press, New York.
63. Ruttle, J., et al (1988): Ovine oestrus synchronisation and superovulation using norgestomet B and Follicule Stimulating Hormone- Pituitary. *Theriogwenology*. 30 (2), 421-427
64. Schiewe. M.C., et al. (1984): Laparoscopic embriyo transfer in domestic sheep: A preliminary study. *Theriogenology* 1989 vol.22 No.6 p.675-682

65. Shelby, D.R., Awagi, S.A. (1987): Estrus synchronisation in the ewe comparing progestins and prostoglandins. *Journal of Animal Science. Abs.* 65 (1), 424.
66. Slyter, A.L. et al (1986): Use of controlled photoperiod to induce out of season breeding in ewes. *Theriogenology*, 25(4): 609-616.
67. Smith, C.L. (1984): Dose effect of follicule stimulating hormone for superovulation of crossbred Targhee ewes. *Theriogenology* 21(1), 262
68. Spitzer, J.C., Carpenter, R.H. (1981): Estrus and pregnancy rates following synchronisation with chronolone intravaginal sponge or norgestomet ear implant in cycling ewes. *Theriogenology*. 16 (3), 287-294.
69. Stefani, J.S., et al (1990): Laparoscopic versus surgical transfer of ovine embriyos. *Theriogenology*. 33(1), 330.
70. Steyn, M.C., Morgenthal, J.C., Barry, D.M. (1993): The effect of embriyo collection technique on subsequent fertility in Samutton Merino ewes. *Theriogenology*. 39, 317
71. Tekin, N., ve ark. (1991): Östrusları sinkronize edilen koyunlarda sun'i tohumlama yöntemiyle elde edilen döl verimi. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.* 38 (1-2), 60-73
72. Trejo, G.A., et al (1988): Artificial insemination with frozen semen in progesteron synchronised ewes. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin. Ireland (1988).
73. Vivanco, H.W., Greaney, K.B. (1992): Comparison of survival of bisected and whole sheep embriyos transferred in season and out of season. *Theriogenology*. 37 (1),316
74. Walker, S.K., et al (1985): Laparoscopic technique for the transfer of embriyos in sheep. *Australian Veterinary Journal*. 62 (3), 105-106.
75. Walkwe, S.K. et al (1989): Time of ovulation in the south Australian merino ewe following synchronisation of estrus. 1. Variation within and between flocks. *Theriogenology*. 31 (3), 545-553.



76. Ward, W.R.(1986): The breeding season and the oestrus cycle.,846-847.Ed.,  
Morrow,D.A., In: Current Therapy In Theriogenology.



## ÖZGEÇMİŞ

1962 yılında İran'ın Tebriz kentinde doğdum. İlk, Orta ve Lise eğitimimi Tebriz'de tamamladım. 1986 yılı Güz yarısında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde Eğitimime başladım. 1991 yılı Haziran döneminde mezun oldum. Aynı yılın Ekim ayında İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Doktora eğitimime başladım.



## 10. TEŞEKKÜR

Öncelikle Doktora eğitimimin başlangıcında danışmanım olan ve daha sonra emekli olan hocam sayın Prof.Dr.Adnan Özkoca'ya ve daha sonra danışmanım olan ve doktora çalışmam sırasında karşılaştığım her türlü zorlukta gerek bilimsel gerekse kişisel yardımlarına başvurduğum hocam sayın Doç.Dr.Serhat Pabuççuoğlu'na saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora tezimin her aşamasında, bilimsel öneri ve eleştirileri ile özverili yardımlarını esirgemeyerek beni yetiştiren, değerli hocam sayın Prof.Dr.İ.Kâmuran İleri'ye, çalışmam süresince deneyimlerinden yararlandığım ve çalışmalarımda bana destek olan hocalarım, Doç.Dr.Kemal Ak'a, Yard.Doç.Dr.Sema Birler'e, Uzm.Dr.Serhat Alkan'a, Araş.Gör.Dr.Yavuz Öztürkler'e Araş.Gör.Dr.Alper Baran'a ve emeği geçen tüm Anabilim Dalı elemanlarına teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca, öğrenim yaşamım boyunca her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere erişmemde en büyük payı olan aileme sonsuz şükranlarımı, sevgi ve saygılarımı sunarım.