

18106

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları
Anabilim Dalı

ANKARA KEÇİLERİNDE EMBRİYO NAKLİ ÜZERİNDE
ÇALIŞMA

MEHMET RAGIP KILIÇARSLAN

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr.Adem ŞENÜNVER

İSTANBUL - 1990

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ.....	1
LİTERATÜR BİLGİ.....	4
MATERYAL VE METOD.....	21
BULGULAR.....	32
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
ÖZET.....	44
SUMMARY.....	46
KAYNAKLAR.....	48
TEŞEKKÜR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	59

G İ R İ Ő

Bugün dünya hayvancılığı içinde yer alan Ankara keçilerinin sayısında uzun süreden beri belli bir oranda azalma görölmektedir. Ancak ABD ve Güney Afrika Cumhuriyeti gibi ölkelerde Ankara keçileri daha iyi bakım ve beslenme koşulları altında etkin seleksiyona tabi tutulmaktadır. Yıllık tiftik üretimi ortalaması bu ölkelerde hayvan başına ortalama 3 kg'ın üzerindedir. Diğer yandan üretilen tiftiğin kalitesi, bugünkü standartlara göre Türk tiftiğinin kalitesi kadar iyi değildir. Türkiye'de ise Ankara keçilerinin bir yaşında olanlarından yılda 1.5 kg, daha yaşlı olanlarından ise 2.5-3 kg tiftik elde edilmektedir ve ölkemizde yıllık tiftik üretimi yaklaşık 6-8 bin tondur. Bu miktar dünya tiftik üretiminin yaklaşık % 30'udur. Üretilen bu tiftiğin yarısı iç tüketimde elbiselik kumaş, trikotaj, battaniye sanayiinde kullanılmaktadır. Diğer yarısı ise çeşitli ölkelere ihraç edilmektedir. Dünya tiftik ihracatında 1960'lı yılların başlarına kadar birinci sırayı aldığımız halde, geçtiğimiz yıllarda ABD ve Güney Afrika Cumhuriyeti üretim yönünden birinci sırayı almışlardır. Bu nedenle mümkün olan en kısa zamanda Ankara keçilerinin sayısını ve kalitesini artırma çalışmalarına başlanmalıdır. Ölkemizde hayvan ıslahı çalışmalarında uzun süreden beri kullanılan yöntem sun'i tohumlamadır. Bu yöntemin esası, yüksek vasıflı ve bu özelliklerini yavrularına aktarabilen erkek hayvanların spermalarının kullanılmasıdır. Embriyo transfer çalışmalarında ise esas, çok yüksek verimli dişilere (donor) süperovulasyon yaptırmak ve daha sonra kazanılan embriyoların, alıcı (recipient) diye adlandırılan verim düzeyleri düşük hayvanlara nakillerini yaparak o yüksek genetik özelliklere sahip verici hayvanlar-

dan bir yılda verdikleri normal yavru sayısının 5-10 katı kadar yavru almaktadır. Bazı genetikçiler, embriyo transfer tekniğinin uygulanması ile elde edilen genetik ilerlemenin daha yavaş olacağını ileri sürmektedirler. Ancak infantil hayvanlardan elde edilen ve dişi ovumların pubertaya ulaşmış alıcı hayvanlara nakli sonucu kısaltılan generasyon süresi ile seleksiyon yoğunluğunun artırılması, sürü için çok belirgin bir genetik kazanç sağlamakta ve genetik ilerleme çok kısa bir sürede sağlanmaktadır. Ayrıca günümüzde sun'li tohumlamada kullanılan damızlık hayvanların çoğu embriyo nakli ile elde edilmektedir. Ülkemiz küçükbaş hayvan potansiyeli açısından oldukça şanslı bir konumdadır. Ancak eldeki hayvan materyalinden ve yetiştirme imkanlarından azami düzeyde yararlanmak için adı geçen hayvanların seksüel sikluslarının kontrolü yoluna gidilmesi en akılcı yoldur. Kontrollü üreme çerçevesinde, seksüel sikluslar sinkronize edilerek östruslar, tohumlamalar veya aşımalar ile bunu izleyen doğumlar, planlanan kısa bir zaman sürecinde gerçekleştirilebilmektedir. Böylece yemleme, ilaçlama ve aşılama işlemleri kolayca programlanabilmektedir. Ayrıca anöstrus dönemindeki hayvanlarda seksüel aktivitenin uyarılıp yıl içinde birden fazla ya da iki yılda üç kez yavru almak mümkün olabilmektedir. Yine embriyo nakli yöntemi ile yüksek verimli hayvanların ana ve babadan gelen tüm üstün özellikleri daha ilk kuşakta bütünüyle yavrulara aktarılabilir.

Puberta'ya erişmiş hayvanların ovaryumlarında binlerce yumurta taslağı (oocyst) yer aldığı halde yaşamları süresince bu oocyst'lerden pek az bir kısmı işlev yapabilmektedir. Embriyo nakli yöntemi ile genotip ve fenotip yönünden üstün verimli hayvanlardan elde edilen embriyoların düşük verimli hayvanlara aktarılarak gelişimlerini bu hayvanlarda tamamlamaları sağlanmakta ve bu arada verici hayvanlara belirli aralıklarla aynı işlem uygulanıp kısa sürede birçok yavru elde edilebilmektedir.

Son yıllarda dünyada embriyo nakli üzerinde giderek yoğunlaşan ve biyoteknoloji olarak isimlendirilen yepyeni bir teknoloji ile ilgili çalışmalar tüm hızıyla devam ederken ülkemizdeki üniversitelerde laboratuvar hayvanlarında, alıcı ve vericilerin sinkronizasyonu, vericilerin süperovulasyonu, embriyoların kazanılması, embriyoların değerlendirilmesi ve bu değerlendirilme sırasında canlı tutulabilmeleri için en uygun medium'un

saptanması, embriyoların kültive edilmesi gibi konuyla ilgili temel araştırmalar 1980'li yıllar içerisinde büyük hız kazanmış ancak sığırlarda koyunlarda ve keçilerde sürdürülen embriyo nakli çalışmaları henüz geniş bir uygulama alanı bulamamıştır. Embriyo nakli, adı geçen hayvan türlerinden sadece sığırlarda, cerrahi olmayan bir yöntemle kolay uygulanabilir hale getirilmiş olmasına rağmen daha öncede belirtildiği gibi Türkiye'de henüz rutin hale geldiğini syleyememekteyiz.

Sunulan çalışmada, deney hayvanı olarak kullanılan Ankara keçileri üzerinde genetik ve ekonomik yönler dikkate alınmaksızın, progesteron, PMSG ve HCG hormonları uygulanarak ovariyel aktivitenin daha erken ve topluca uyarılması diğer bir deyişle sinkronizasyon, süperovulasyon ve bu uygulamalara bağlı olarak ovarium'larda şekillenen fizyolojik değişiklikler ile nakil yapılan alıcılardaki gebelik oranlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİ

Embriyo nakli, dölllenmiş ve normal olarak gelişmesine devam eden ovum veya ovumların, verici hayvanın (donor) oviduct veya uterusundan alınarak, alıcı ya da taşıyıcı (recipient) hayvanlara nakli olarak tanımlanabilir(3,46,48,53). Embriyo nakli, bugün başta inek olmak üzere koyun, keçi,kısrak, kedi, köpek gibi bütün evcil hayvanlar ile yabani hayvanlarda, insan ve diğer primatlarda uygulanmaktadır(48,53). Evcil hayvanlarda embriyo nakli operasyon ile veya operasyona başvurulmadan uygulanmaktadır. Koyun ve keçilerde çoğunlukla bu uygulama operasyon ile yapılmaktadır(3,14,40,46,48,82,85). Koyun ve keçilerde embriyo naklinin aşamaları: Verici ve taşıyıcı hayvanların seçimi, verici ve taşıyıcılarda sinkronizasyon, vericilerde süperovulasyon, vericilerin tohumlanması, dölllenmiş ovumların (embriyo) kazanılması ve saklanması, embriyoların değerlendirilmesi, embriyoların nakli, taşıyıcıların bakımı olarak bildirilmiştir(3, 17, 43, 46, 48, 67, 77).

2.1 Verici ve Taşıyıcı Hayvanların Seçimi

Embriyo naklinde kullanılacak alıcı ve verici hayvanların seçimi elde edilecek başarıyı önemli ölçüde etkilediğinden verici hayvanların yapısal veya görülebilir bir bozukluğu olmayan, üstün genetik özelliklere sahip olan, puberti yaşından itibaren düzenli bir siklus gösteren, herhangi bir reproduktif problemi olmayan, daha önce en az bir kere doğum yapmış ve normal bir puerperium dönemi geçirmiş olan uygun yaştaki (3-10 yaş ara-

sındaki) hayvanlar arasından seçilmesi gerektiği bildirilmektedir(3,46). Taşıyıcı hayvanlar da verimleri düşük olabilmekle birlikte fenotip olarak vericilere yakın, iyi gelişmiş, fertilitesi iyi, normal besili, seksüel siklusları düzgün ve belirgin, sağlam kondüsyonlu ayrıca iyi annelik özelliklerine sahip hayvanlar arasından seçilmektedir(17,53,77).

2.2. Verici ve Taşıyıcıların Sinkronizasyonu

Sinkronizasyon, östrus ve ovulasyonun istenilen zamana göre ayarlanması şeklinde tanımlanabilmekte olup koyun ve keçi yetiştiriciliğinde hem aşım sezonunda hem de anöstrus döneminde uygulanabilmektedir(3,35,46,47,48). Koyun ve keçilerde aşım sezonunda sinkronizasyon, östrusu geciktirip buna bağlı olarak ovulasyonu bloke etmek ve corpus luteum'un regresyonuna (Luteolysis) neden olmak suretiyle sağlanabilmektedir(7,26,35,46,55,66). Bu dönemdeki verici ve taşıyıcı hayvanların sinkronizasyonu amacıyla, progestagenler oral, deri altı implant, kas içi enjeksiyon veya vaginal tamponlar şeklinde uygulanarak östrus ve ovulasyon istendiği sürece geciktirilebilirken, prostaglandinler veya sentetik analogları kas içi yolla enjekte edilerek fonksiyonel corpus luteum lyse edilip 2-5 gün içinde folliküler aktivite sağlanabilmektedir(18,19,35,41,42,46,49,55). Aşım sezonundaki hayvanlarda östrus sinkronizasyonu için corpus luteum'un regresyonuna neden olan prostaglandinlerin seksüel siklusun 4-13. günleri arasında tek veya 7-11 gün arayla çift enjeksiyon şeklinde uygulandığı bildirilmektedir(21,42,46,47,66). Anöstrus dönemindeki hayvanlarda fonksiyonel corpus luteum bulunmadığından östrusun başlatılmasında prostaglandinlerin kullanılmasının yarar sağlamayacağı ileri sürülmektedir(19,46). Aşım sezonu dışında anöstrus dönemindeki koyun ve keçilerde ovariyel aktiviteyi uyarmak için değişik yöntemler uygulanmış, bu amaçla günlük ışık süresi ve çevre sıcaklığının ayarlanması, sürüye koç ve teke katımı ile çeşitli hormon uygulamalarının başlıca yöntemler olduğu ortaya konmuştur(36,37,38,50,52,75,79). Sürüye koç veya teke katımı seksüel aktiviteyi uyarmada etkili olmakla birlikte daha rasyonel bir sinkronizasyon için progestagenler, prostaglandinler, FSH ve PMSG gibi hormonlar kullanılmıştır(7,18,25,35,64). Üreme sezonu dışındaki koyun ve keçilerde östrus ve ovulasyonu başlatmak için progestagenler, değişik dozlarda yemlere katılarak

oral yolla, kas içi ya da derialtı enjeksiyonlarla uygulanmıştır(3,9,22,35,47,49,72). Anöstrus döneminde progestagen tedavisi uygulanan koyun ve keçilerde progesteron uygulamasının bitiminden 48 saat önce veya son progesteron tedavisinin yapıldığı gün gebe kısraak serum gonadotropini (PMSG) 250-750 IU kas içi kullanıldığında sinkronizasyon oranının yüksek olduğu bildirilmektedir(14,20,29,31,33,49,57,80). Progestagenlerin oral kullanımında, günde 5-10 mg dozda 15-20 gün boyunca, kas içi enjeksiyon şeklinde ise günde 12 mg dozda 12-16 gün süre ile verilmesi gerektiği bildirilmektedir(7,35,39,48,63,65). Kulak veya koltuk altına implant şeklinde uygulanan progestagenler 10-12 günlük tedavi sonrası östrusların başlamasını sağlamaktadır(23,35,72). Koyun ve keçilerde gerek anöstrus döneminde gerekse aşım sezonunda ovarium'ların uyarılması ve siklusun sinkronizasyonunda, 40-60 mg Medroxyprogesteron acetate (MAP), 30-40 mg Fluorogestone acetate (FGA) içeren vaginal süngerlerin, koyunlarda 12-16 gün keçilerde 17-22 gün süre ile uygulanmasının kolay, pratik ve etkili bir yol olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir(1,3,19,32,35,47,63,81). Vaginal sünger uygulanan bazı hayvanların vaginalalarında hafif bir suprasyon şekillendiği, ancak bunun birkaç gün içerisinde tedavisiz olarak kendiliğinden geçtiği ve fertilitiyi olumsuz yönde etkilemediği gözlenmiştir(35,46). Aşım sezonu dışında, koyun ve keçilerde östrus ve ovulasyonu uyarmak için GnRH'nın kas içi, damar içi enjeksiyon ya da jelatin kapsül içinde subkutan olarak 100-300 mikrogramlık dozları önerilmektedir(2,18,35,49,56,80). Ancak bazı araştırmacılar, GnRH'nın 250 mikrogramlık tek bir kas içi enjeksiyonunun yeterli olmadığını ve daha başarılı sonuçlar için GnRH tedavisinin, PMSG tedavisinden sonra uygulanması gerektiğini ileri sürmektedirler(20,49). Anöstrustaki keçilerde sentetik luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) enjeksiyonları ile ovulasyonun sağlanabildiği ve plazma PGE ve PGF₂ α konsantrasyonunun artırılması ile ovulasyonun öne alınabileceği ileri sürülmüştür(2).

Akınlosotu ve ark.(2) Anöstrustaki Clun Forest koyunlarında 150-300 mikrogram dozda LH-RH'nın ovulasyonun başlatılması için yeterli olduğunu buna karşılık Scottish Blackface koyunlarında, ovulasyonun LH-RH ile başlatılamadığını bildirmektedirler. Bazı araştırmacılar ise LH-RH ile mevsimsel anöstrustaki koyunlarda ovulasyonun uyarılmasına

rağmen fonksiyonel corpus luteum oluşturmanın güç olduğunu, bunun ise LH sekresyonunun yetersizliğine bağlı olarak şekillendiğini ileri sürmektedirler(35).

Gustafsson ve ark.(34) Üreme sezonu dışındaki koyunlarda östrus ve ovulasyonun başlatılması amacıyla farklı iki diphenylethylene derivesinin etkisini araştırdıklarını ve birinci gruptaki hayvanların 4.0 ± 0.9 gün içinde, ikinci gruptaki hayvanların ise 3.5 ± 0.2 gün içinde östrus gösterdiklerini ancak enjeksiyondan 10 gün sonra yapılan laparatomide ovarium'ların küçük, folliküllerin çapının 2 mm kadar olduğunu tespit ettiklerini bildirmektedirler.

Britt ve ark.(18) Anöstrustaki keçilerde 45 mg FGA içeren vaginal süngerlerin 18-21 gün süre ile uygulanması ve uygulamanın bitiminden 2 gün önce PMSG'nin 400-800 IU dozda kas içi enjeksiyonu ile östrus ve ovulasyonun başlatılabileceğini, östrusun süngerlerin çıkarılmasından sonraki 12. saatten itibaren şekilleneceğini bildirmektedirler. Keçilerde sinkronizasyon amacıyla ekzojen iki değişik hormon kullanan Kılıçoğlu ve ark.(47), prostaglandinlerle sinkronize ettikleri grupta birinci enjeksiyonu izleyen sinkronizasyon oranını % 61.53, ikinci enjeksiyon sonrasında aynı oranı % 84.61, MAP emdirilmiş süngerler ile sinkronize ettikleri grupta ise bu oranı % 96 olarak saptamışlardır.

Beck ve ark.(14) Üreme sezonunda 60 mg MAP emdirilmiş vaginal süngerler ile tek enjeksiyon şeklinde ve 11 gün ara ile iki kez uygulanan prostaglandinlerin oluşturduğu sinkronizasyon oranını karşılaştırmışlar ve en yüksek sinkronizasyon oranını (% 93) progesteron süngerler ile elde etmişler ayrıca 11 gün ara ile iki kez prostaglandin uyguladıkları grupta sinkronizasyon oranının daha düşük (% 83) olduğunu gözlemişler, aynı araştırmacılar yine prostaglandinlerin 11 gün arayla iki kez uygulanmasının, 9 gün arayla uygulanmasından daha iyi sonuçlar verdiğini ileri sürmüşlerdir.

Tervit ve ark.(84) Günlük 12 mg dozda 17 gün süre ile progesteron enjeksiyonu yapılan 16 adet Ankara keçisi ile 60 mg MAP içeren sünger uyguladıkları 183 adet yabancı keçide iyi bir sinkronizasyon sağlamışlar

ve östrusların, birinci grupta son enjeksiyondan sonraki 2.9 gün içinde, ikinci grupta ise süngerlerin alınmasından sonraki 3.5 gün içinde oluştuğunu gözlemişlerdir.

Kılıçoğlu ve ark.(46) Aşım mevsiminde ve anöstrus döneminde 65 koyun üzerinde yaptıkları çalışmada, aşım mevsimine girmiş koyunlarda birinci gruba 14 gün boyunca 60 mg MAP içeren vaginal süngerleri, ikinci gruba 11 gün ara ile iki kez 10 mg dinoprost tromethamine (PG) uygulamışlar ve tedavinin bitiminden sonraki 24-72 saat içinde sırasıyla % 91.48 ile % 90.90 oranında sinkronizasyon elde etmişler, aynı araştırmacılar üreme sezonu dışındaki 7 koyunda 24 saatte 10 saat ışık ve 20-22 C çevre ısıyı sağlayarak yaptıkları çalışmada, hayvanlara 14 gün süreyle 60 mg MAP içeren vaginal süngerler uygulamışlar tedavinin bitiminden sonraki 44 ile 50. saatlerde hayvanların % 71.42'sinde östrus saptamışlardır.

Özkoca(65) yaptığı bir çalışmada, 30 mg Cronolone (Fluorogestone acetate 17 acetoxy- 9 fluoro- 11 B hydroxyl-4-prenene-3,20 dione) içeren vaginal süngerleri 45 koyuna 17 gün boyunca uygulamış, süngerlerin çıkarılmasından sonraki 120 saat içinde koyunların % 97.7'sinde östrusu saptamıştır.

Carpenter ve ark.(23) Anöstrustaki 110 koyuna 3 mg norgestomet içeren kulak implantları 10 gün süre ile uygulamışlar ve implantların alınmasından sonraki 5 gün içinde koyunların % 72'sinde östrus saptamışlardır.

Aşım dönemindeki embriyo nakli uygulamalarında taşıyıcı olarak çok sayıda hayvan mevcutsa bunlar arasından doğal olarak verici ile aynı günde östrus gösterenlerin seçilebileceği ve bu nedenle sinkronizasyon gerekmeyeceği bildirilmektedir(3,16,17,39,59,82). Embriyo nakli çalışmalarında kullanılan taşıyıcı ve verici hayvanlar arasındaki sinkronizasyon farkı ± 24 saati geçmemelidir ve bu sürenin ± 12 saat olması ideal olarak kabul edilmektedir(3,17,43,46,48,54,73,82).

2.3. Vericilerin Süperovulasyonu

Ovarium'larda çok sayıda follikül geliştirilmesi ve ovulasyonların sağlanması şeklinde tanımlanabilen süperovulasyon, follikül stimulan hormon (FSH) veya pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) enjeksiyonları ile koyun ve keçilerde hem anöstrus döneminde hem de aşım mevsiminde sağlanabilmektedir(3,40,43,46,48,61). Uygun bir süperovulasyon uygulaması ile normal ovum sayısı inek, koyun, keçi ve tavşanda yaklaşık 5 kat, domuz ve atta ise daha az oranda artırılabilir(41). Koyun, keçi ve sığırdaki her süperovulasyon tedavisinde ortalama 12 ovulasyon sağlanabileceği tahmin edilmektedir(14). Süperovulasyon amacıyla, aşım mevsimindeki koyunlarda seksüel siklusun 11-13. günlerinde PMSG'nin adale içi veya deri altı yolla 1000-1500 IU dozda tek enjeksiyonu veya FSH kullanılması halinde siklusun 12.gününden itibaren bölünmüş dozlarda toplam 12-20 mg olmak üzere birden fazla enjeksiyonu, yine keçilerde siklusun 16-18. günlerinde PMSG'nin adale içi veya deri altı yolla tek enjeksiyonu veya FSH'nin siklusun 17.gününde aynı dozda birden fazla enjeksiyonunun gerektiği bildirilmektedir(14,17,27,39,40,54,59,63,78,82).

Zanwar ve ark.(87) Süperovulasyon amacıyla 50 adet koyuna 2000 IU dozda PMSG uyguladıklarını ve ortalama ovulasyon sayısını 5.86 olarak saptadıklarını bildirmektedirler.

Allen ve ark.(6) Anöstrus dönemindeki 8 adet koyuna 12 gün süre ile MAP içeren vaginal süngerleri uygulayarak % 100 sinkronizasyon sağladıklarını, süperovulasyon için sünger koyduktan sonraki 11.günden başlayarak 12 saat arayla ve 3 gün boyunca her koyuna toplam 24 mg FSH uyguladıklarını, koyunların tamamında süperovulasyon oluşturduklarını ve ortalama 6.0 ± 1.5 ovulasyon elde ettiklerini bildirmektedirler.

Moore ve ark.(60) Aşım mevsimindeki koyunlara FSH uyguladıklarını % 95 oranında süperovulasyon ve her bir hayvanda ortalama 11.3 adet ovulasyon elde ettiklerini bildirmektedirler. Diğer bir bölüm araştırmacı ise verici olarak kullandıkları 16 adet Ankara keçisinin yarısına süperovulasyon oluşturmak için PMSG, diğer yarısına FSH uyguladıklarını ve

ovulasyon ortalamasını birinci grupta 9.1, ikinci grupta ise 15.1 olarak tespit ettiklerini ileri sürmektedirler(84). Bu amaçla bir başka araştırmacı grubu 12 ergin sütçü keçiye FSH, 6 keçiye PMSG uyguladıklarını ve FSH verilen grupta 15 ± 3 , PMSG verilen grupta ise 6 ± 3 ortalama ovulasyon sağladıklarını bildirmektedirler(45). Araştırmacıların bir kısmı, süperovulasyon çalışmalarında ovulasyonu başlatmak için yetişkin inek, koyun ve keçiye chorionic gonadotropin (HCG) veya luteinize edici hormon (LH) tedavisinin gerekli olmadığını savunurken, diğer bir kısmı ise garantili ovulasyon için HCG veya LH hormonu enjeksiyonunu gerekli görmektedirler(6,14,40,46,48,55,63,82,86). Koyun ve keçilerde ovulasyonu garanti altına almak için östrustaki hayvanlara HCG hormonunun 1000-1500 IU dozda veya LH hormonunun 50-75 mg dozda kas içi ya da damar içi verilmesi gerektiği bildirilmektedir(40,46,86). Verici hayvanlar uygun aralarla süperovulasyon için ve embriyo elde etmek amacıyla kullanılabilir(3,50). Birden fazla süperovulasyon uygulanan vericilerde birinci, ikinci ve üçüncü uygulamalardan elde edilen sonuçların birbirine benzer olduğu ancak sık aralıklarla yapılan uygulamalarda olumsuz sonuç alınabileceği bu nedenle uygulamalar arasında en az iki aylık bir süre olması gerektiği ileri sürülmekte, bu durumun gonadotropinlerin, uygulanan organizma için yabancı bir protein yapısında olması ve vücutta immunolojik olarak bir antigen-antikor reaksiyonu oluşturması nedeniyle şekillendiği bildirilmektedir(40,55,82). Bir kısım araştırmacılar keçilere 33 gün arayla 1000 IU PMSG enjeksiyonu uyguladıklarını ve birinci enjeksiyonun ikinci hormon uygulamasının meydana getirdiği ovulasyon ortalamasını deprese ettiğini, ancak enjeksiyonlar arası 340 gün olduğunda birinci tedavinin ikinci tedaviyi etkilemediğini, 38 gün arayla verilen 700 IU PMSG hormonunun ise ovulasyon ortalamasını 8.1'den 2.5'e düşürdüğünü ileri sürmektedirler(63).

2.4. Vericilerin Tohumlanması

Embriyo nakli çalışmalarında verici olarak kullanılan koyun ve keçiler, doğal aşım, sun'i tohumlama veya operatif yolla spermanın direkt olarak conu uteri'lere verilmesi ile tohumlanabilirler(3,8,17,46,48,85). Süperovulasyon uygulanan verici hayvanların diğer hayvanlara göre daha fazla spermatozoit ile daha sık tohumlanması gerektiği bildirilmesine rağmen

süperovulasyon uygulanan verici hayvanlarda fertilizasyon oranının, tedavi görmeyen hayvanlarınkinden belirgin olarak daha az olduğu, bunun nedeninin süperovulasyon uygulanan koyun ve keçilerde spermatozoitlerin cervix uteri'den geçişlerinin yavaşlaması, ovulasyonun tohumlamadan çok sonra meydana gelmesi, kusurlu oositler ve diğer sebepler olduğu ileri sürülmüştür(14,17,40,82). Verici hayvanlarda doğal tohumlama uygulanacaksa östrusun başlamasından itibaren seksüel istek bitene kadar 12 saat ara ile aşım yaptırılması gerektiği ileri sürülmektedir(17,46,71,74). Sun'i tohumlama uygulanacaksa östrusun başlamasından itibaren 12-24 saat ara ile normal tohumlama dozundan daha fazla spermatozoit içeren 0.2 ml sperma (400 x 10⁶ motil spermatozoit) intra servikal olarak verilmektedir(3,13,46). Araştırmacılar tarafından taze sperma ile yapılan sun'i tohumlamadan elde edilen fertilizasyon oranının, donmuş sperma ile elde edilenden daha yüksek olduğu bildirilmiştir(8,41). Koyun ve keçilerde verici hayvanların tohumlanmasında yüksek bir fertilizasyon oranı sağlayabilmek için en iyi yolun operatif tohumlama olduğu ileri sürülmektedir(3,17,46,48,63). Sinkronizasyon uygulanmış verici hayvanlarda progesteron tedavisinin bitiminden sonraki 2.günde yapılan operatif tohumlamaların daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir(17,46). Araştırmacılar operatif tohumlama için 0.5 mg/kg dozda adale içi verilen Rompun ile genel sedasyon sağlandıktan sonra operasyon bölgesine infiltrasyon anestezisi uygulandığını ve bu işlemi takiben median hat üzerinden laparotomi yaparak veya median hattın sağ ve solundan yaklaşık 4 cm uzaklıktan laparoskop uygulamak suretiyle karın boşluğuna girildiğini, karın boşluğuna girildikten sonra 0.01-0.02 ml spermanın doğrudan cornu uteri'lere, utero-tubal noktanın 4-5 cm cranial'inden verilmek suretiyle operasyonun tamamlandığını bildirmişlerdir(46,51,85). Süperovulasyon tedavisinden sonra uygun zamanda yapılan cerrahi tohumlamanın kızgınlık göstermeyen verici hayvanların da tohumlanmasını sağladığı bildirilmektedir(3,17,46,48,63).

Meinecke ve Wassmuth(60), süperovulasyon tedavisi uyguladıkları verici koyunlara, östrus göstermelerinden sonra 8 saat ara ile koç kattıklarını ve % 64.4 fertilizasyon oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Davis ve ark.(27), süperovulasyonu takiben doğal tohumlama uyguladıkları koyunlarda fertilizasyon oranını % 88 olarak tespit ettiklerini buna karşılık Riddel ve ark.(76), uyguladıkları doğal tohumlama sonucu % 13.5 fertilizasyon oranı elde ettiklerini bildirmektedirler.

Moore(63), operatif tohumlama ile % 90'ın üzerinde başarı elde edilebileceğini ileri sürmekte iken Kılıçoğlu ve ark.(46), koyunlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada her 3 tohumlama yöntemini de uyguladıklarını, doğal aşım ile % 57.14, sun'i tohumlama ile % 57.14 ve operatif tohumlama ile % 56 fertilizasyon oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

2.5. Döllenenmiş Ovumların (Embriyo) Elde Edilmesi

Döllenenmeden hemen sonra embriyoların zona pellucida'larından ayrılma safhasındaki dönem içinde kazanılabilmekte oldukları ayrıca kızgınlığın başlangıcından itibaren embriyoların elde edilme anına kadar geçen süre uzadıkça kazanılan embriyo sayısının azalmakta olduğu, bunun nedeninin ise genetik olarak yaşayamayan embriyoların erken ölümü, pre-matüre luteal regresyon ve embriyonun atılması olabileceği ileri sürülmektedir(17). Embriyolar mezbahada kesilmiş hayvanlardan veya kesilip çıkarılmış genital organlardan elde edilebildiği gibi sağlam hayvanların oviduct ya da cornu uteri'lerinden cerrahi veya cerrahi olmayan yöntemlerle kazanılmıştır(43,82). Bugün için yapılan embriyo nakli uygulamalarında koyun ve keçilerden embriyoların kazanılması işlemi cerrahi yöntemle yapılmaktadır(3,14,46,48). Döllenenmiş ovumların koyun ve keçilerde uterusu 4.günde ulaştığı bildirilmektedir(8,14). Bu nedenle yapılan embriyo nakli çalışmalarında embriyolar 3.günde veya daha erken dönemde (8 adet veya daha az blastomerli iken) oviduct'tan, 4 günlük veya daha yaşlı embriyolar ise (16-20 blastomerli) uterustan elde edilmişlerdir(3,17,46,82). Koyun ve keçilerde embriyoların kazanılması işlemi cerrahi metodla yapılmaktadır ve embriyolar, uygun bir sıvının (medium) oviduct'tan fimbria ovarica'ya doğru veya utero-tubal birleşme yerinden oviduct'ta doğru yada cornu uteri'nin utero-tubal noktaya yakın kısmından uterusu doğru verilmesi ile elde edilmektedir(8,40,82). Araştırmacılar küçük ruminant'larda uterus yıkamasının, birbirinden pek az farklı birkaç teknikle yapılabildiğini, operasyon

öncesi hazırlıkların tamamlanmasını takiben anestezi altındaki hayvana memelere mümkün olduğunca yakın bir yerden manipulasyona başlamak suretiyle median çizgi üzerinde bir ensizyon yapılarak karın boşluğuna girildiğini ve bunu takiben uterus ve ovarium'ların ensizyon hattı dışına alınarak, oviduct'un ovarium tarafındaki serbest ucuna (fimbria ovarica) 2 mm çapında özel bir katater yerleştirildiğini, bu işlemden sonra utero-tubal noktanın 4-5 cm cranial'inden küt bir iğne ile uterusu girilerek 10-20 ml miktarındaki medium'un uterus lümenine enjekte edildiğini ve bu arada da medium'un geriye doğru akmasını engellemek için bifurcatio uteri kısmında cornu uteri'ye yakın bir kısma bağırsak pensi konulduğunu veya işaret parmağı ile bu bölgeye basınç uygulandığını, daha sonra uterus duvarına, cornu uteri'lerin uç tarafına doğru yapılan masajlar ile uterus yıkantısının oviduct'tan geçirildiğini ve bundan önce de fimbria'ya uygulanan katater yardımı ile uterus yıkantısının petri kutularında toplandığını aynı işlemlerin diğer cornu uteri'de de aynı şekilde tekrar edildiğini bildirmektedirler(3,17,46). Bu yöntemle hem kazanılan ovum yüzdesinin arttığı hem de genital organlara az zarar verilmiş olacağı ancak yine de post-operatif dönemde oviduct'ta veya uterusu yapışmalar meydana gelebileceği, operasyon sonu yapışmaları en aza indirebilmek için uygulamaların çok dikkatli yapılması ve manipulasyon yapılan dokulara heparinli izotonik veya yüksek moleküllü yoğun dekstran ile irrigasyon yapılması gerektiği ileri sürülmektedir(82). Diğer bir uterus yıkama tekniğinde ise cornu uteri'ye bifurcatio uteri kısmında bir bağırsak pensi veya baş ve işaret parmağı ile basınç uygulandıktan sonra utero-tubal noktadan küt bir iğne ile 10 ml medium'un uterus lümenine verildiği, cornu uteri iyice dolup gerildiğinde bifurcatio uteri'den özel bir kanül ile uterus lümenine girilerek uterus yıkantısının bu kanül aracılığıyla petri kutusuna alındığı ve aynı işlemlerin diğer cornu uteri'de de tekrar edildiği bildirilmektedir(17,82,83). Uterus yıkamasından sonra, uterusu kalabilecek embriyoları öldürmek ve oluşabilecek enfeksiyonları önlemek amacıyla uterus içerisine bir miktar antibiyotik verilmektedir(3,14,42). Embriyoların operatif yöntemler ile kazanıldığı türlerde, uygun aralıklarla ve genital organlara en az hasar verecek şekilde özenli çalışılsa bile verici hayvanlarda fibröz yapışmaların şekilleneceği ve yine uterus ve oviduct'tun çevre dokulara yapışabileceği bu nedenle bu işlemin yalnızca birkaç kez tekrar edilebileceği söylenmektedir(14,82). Yapı-

lan araştırmalarda embriyoların kazanılması ve nakile kadar kısa bir süre saklanması amacıyla çok çeşitli yıkama sıvıları kullanılmakta olup henüz ideal bir yıkama sıvısının keşfedilemediği bildirilmektedir(14,43,55,77).

Mc Donald(55) Embriyoların kazanılması ve saklanması kulla-nılan en iyi yıkama sıvısının homolog kan serumu olduğunu ileri sürmüştür.

Moore ve Rowson(59) Koyunlarda yaptıkları bir çalışmada medi-um olarak 1000 IU/ml penicillin içeren, filtre edilmiş steril koyun serumu kullandıklarını bildirmektedirler. Embriyo nakli çalışmalarında döllenmiş ovumların kazanılmasında çeşitli medium'lar kullanılmış ve bunların homo-log serum (% 10-20) veya sığır serum albümini (BSA, Bovin Serum Albu-min, 3 mg/ml) ya da ftal devredeki buzağı serumu (FCS, Fetal Calf Serum) gibi bir protein kaynağı ile zenginleştirilmiş ayarlı tuzlu solusyon içeren medium'lar olduğu bildirilmiştir(17,40,43,82). Protein ve enerji ie-ren maddelerin blastocyst oluşumuna kadar ki dönemde embriyo için gerek-li olmadığı ancak blastocyst devresinde ve kültivasyon esnasında zorunlu olduğu ve enerji sağlamak üzere medium'a glikoz veya mannoz katılabilece-ęi ne sürülmektedir(77). Protein kaynağı olarak serum kullanılacak ise, embriyolara zararlı faktörleri inaktive etmek için 56 C'de 30 dakika ısıya tutulması ve medium'a katılmadan önce 0.45 mikron çapında delikleri olan filtreden geçirilmesi gerektiği bildirilmiştir(17). Çoğu memelilerde intrase-ller sıvısının pH'sı 7.2-7.3 olduğundan embriyoların kazanılması ve kültive edilmesinde kullanılan medium'ların da buna göre ayarlanması ve pH'nın 7-8 arasında olması ancak en iyi sonuçların pH 7.2-7.6 arasında olduğunda alındığı, bu amaçla medium'larda pH indikatörü olarak 1-20 mg/lit oranın-da ilave edilen phenol red kullanıldığı yine medium'un osmolitesinin sodi-um chlorr konsantrasyonunun değiştirilmesi ile 250 mOsm/kg'dan 320 mOsm/kg'a kadar değiştirilebildiği ancak medium'un osmolitesinin 270-300 mOsm/kg arasında olduğunda daha iyi sonuçlar alındığı ayrıca medium'un hazırlanmasında gerekli esas madde suyun steril, bidistile, deiyonize olma-sı ve 0.2 mikron çapında delikleri olan filtreden geçirilmesi gerektiği bildi-rilmektedir(40,82). Antibiyotiklerin, medium'a taşıyıcı hayvanlara patogen etkenlerin naklinden sakınmak ve yıkama esnasında bakteriyel kontaminas-yonlardan embriyoları korumak amacıyla eklendiği, medium'un litresine

genellikle 50 mg streptomycin sulfate ve 100.000 IU potassium penicillin G ilave edildiği ancak diğer antibiyotikler ve antifungal ajanlarında sıklıkla kullanıldığı yine medium'u bakterilerden arındırmak için 0.45 mikron veya daha küçük porları olan bir filtreden geçirmek gerektiği sonucuna varılmıştır(10,14,40,63,82).

Bondurant(17) Antimikrobiale madde ve protein kaynağı eklenmeden önce PBS'in 0.3 çaplı delikleri olan filtreden geçirilmesi gerektiğini ileri sürmektedir. Filtre edilen medium'un, 3-4 gün içinde kullanılacak ise 5-8 C'de saklanabileceği, dondurularak ise birkaç ay muhafaza edilebileceği bildirilmiştir(63). Embriyoların kazanılması amacıyla kullanılan biyolojik medium'lar içerisinde en yaygın olarak kullanılanın % 5-20 oranında FCS veya % 1-3 oranında BSA ile zenginleştirilmiş Dulbecco'nun modifiye phosphate buffered saline (PBS) olduğu bildirilmiştir(14,40,45,46,48,82).

Tervit ve ark.(85) Ankara ve Saanen keçilerinde yaptıkları embriyo nakli çalışmalarında embriyoların uterusdan kazanılması için % 10'luk keçi serumu ile zenginleştirilmiş Dulbecco's PBS kullandıklarını bildirmektedirler. Elde edilen uterus yıkantılarının, alındıkları cam petri kutuları içinde değerlendirmeye kadar ısıyı ayarlanabilen etüvde veya ısıtma tablası üzerinde tutulduğu, 30 dakika kadar süren bu dinlenme sırasında embriyoların ağırlıkları nedeniyle dibe çöktükleri bildirilmiştir(46). Koyun ve keçi embriyolarının in vitro koşullarda bikarbonat veya fosfat buffer medium'unda 37 C'de 1-2 gün, yavaşça -4 C'ye kadar soğutulmak suretiyle 2-3 günden fazla bir süre kültive edilebileceği bu durumun sinkronize edilmemiş alıcıların, gelişmesi durdurulmuş embriyolara yetişmesine fırsat yarattığını yine koyun ve keçi embriyolarının, sığır embriyoları için kullanılan tekniğe benzer bir uygulama ile sıvı nitrojende derin dondurmaya tabi tutulabileceği bildirilmektedir(17).

2.6. Embriyoların Morfolojik ve İşlevsel Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Embriyo naklinde başarı oranının büyük ölçüde kazanılan embriyoların kalitesine bağlı olduğu bu nedenle kazanılan embriyoların değerlendirilmesi

dirilmesinin çok özenli bir şekilde yapılması gerektiği bildirilmektedir(3,39,82). Donorlardan elde edilen ve steril petri kutularına alınan uterus yıkantılarının stereo mikroskopta x10-x15 büyütmelemlerde kontrol edilerek embriyoların arandığı, mikroskopta saptanan embriyoların, mikropipet tutucusu veya ucuna tüberkülin şırıngası adapte edilmiş pastör pipetleri yardımıyla buldukları ortamdan derhal uzaklaştırılarak yine steril, küçük petri kutuları veya saat camları içinde taze Dulbecco's PBS'e aktarıldığı, bu aşamada medium'un daha yüksek oranda FCS veya BSA içermesi gerektiği, embriyoların tamamının toplandıktan sonra 40-200 büyütmelemlerde taze kültür medium'u içinde pastör pipeti ile hareket ettirilerek değerlendirildiği bildirilmektedir(43,45,46,48). Koyun ve keçi embriyolarının değerlendirilmesinde en pratik yolun morfolojik görünümüne göre yapılan değerlendirme olduğu ve değerlendirme esnasında embriyoların döllenmiş, fertil ve gelişmekte olup olmadıklarının araştırıldığı bildirilmiştir(3,48). Kazanılan embriyoların gelişme safhalarının, tohumlama ile kazanma zamanı arasındaki süreye bağlı olduğu, keçi embriyolarının gelişmesinin nispeten koyun embriyolarına benzediği ancak hergün için bir bölünmelik gecikme olabileceği ileri sürülmektedir(17,40). Embriyoların gelişme dönemlerinde pek çok farklılıkların olduğu ve bunların yaşam güçlerine göre sınıflandırılmasının büyük tecrübe gerektirdiği, morfolojik olarak yapılan değerlendirmede, normal embriyoların saptanmasında aşağıdaki özelliklerin; embriyoların normal büyüklükte ve daire (küre) şeklinde olmaları, blastomerlerin kesif, bir örnek ve zona pellucida içerisinde düzenli olmaları, sitoplazmanın granüllü veya düzensiz parçalı olmaması, zona pellucida'nın katlanmış veya buruşmuş olmaması, perivitellin sahanın boş, sınırlarının düzenli ve belirgin olması şeklinde sıralanabileceği bildirilmekte, bununla birlikte çekirdeksiz partiküller veya vakuoller içeren koyun embriyolarına sık rastlandığı ancak bunların varlığının embriyoların yaşamını ve gelişmesini etkilemediği bu nedenle bu tip embriyoların anormal değil atipik olarak isimlendirildiği yine özellikle keçi embriyolarında büyük vakuollerin bulunabildiği ve bunların da yaşamı ve gelişmeyi etkilemedikleri bildirilmektedir(14,63). Embriyoların yaşlarına göre uygun gelişim döneminde olmaları, genellikle erken dönemde tek bölünme gösteren embriyoların, normal olarak kabul edildiği ancak toplanan embriyoların değerlendirilmesi sırasında, birden fazla bölünme gösteren embriyolar çoğunlukta ise o zaman tek bölünme

gösteren embriyoların şüpheli olarak kabul edildiği ve bunların yaşama şanslarının fazla olmadığı söylenmektedir(17,63). Değerlendirme sırasında döllememiş ovumların kolaylıkla ayırt edilebildiği, fertil ve gelişmekte olan embriyoların ise bunlardan ayrı bir petri kutusu içine alındığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir(17,45). Bir hücreliden blastocyst safhasına kadar olan embriyoların uygun koşullarda transfer edildiklerinde gelişebildikleri ancak embriyoların çok erken ve çok ileri gelişim safhalarında başarı oranının düştüğü, en yüksek gebelik oranının 8 hücreliden blastocyst safhasına kadar olan embriyoların nakillerinden elde edildiği, ayrıca yaşlı embriyoların invitro uygulamalara karşı genç embriyolardan daha dayanıklı olduğu ileri sürülmektedir(40,48,63).

2.7. Embriyoların Nakli

Başarılı bir embriyo nakli için embriyonun gelişim dönemi ve alıcının genital organları arasında iyi bir sinkronizasyonun gerekli olduğu, sinkronizasyon farkı sığırlarda 24 saatten fazla, koyun ve keçilerde 48 saatten fazla olduğunda gebelik oranının azaldığı, optimal sonuçların alıcı ve verici arasında 12 saatlik sinkronizasyon farkı olduğunda alındığı bildirilmektedir(40,43,82). Alıcı olarak kullanılan küçük ruminant'larda embriyo naklinde yaygın olarak kullanılan yöntemin, lokal veya genel anestezi altındaki hayvana laparotomi uygulanarak, genital organların ensizyon hattından dışarı alınıp, 0.01-0.02 ml medium içinde pastör pipetine çekilen embriyonun, corpus luteum'a sahip ovarium tarafındaki oviduct'a, pipet fimbria ovarica'dan yaklaşık 2 cm kadar sokularak infundibulum içine ya da uterusu, utero-tubal noktanın 3-5 cm cranial'ine önceden ucu küt bir iğne ile uterus duvarı delindikten sonra pipet uterus lümenine sokularak verilmesi şeklinde olduğu bildirilmektedir(3,17,40,48,82). Son yıllarda koyun ve keçilerde alışılmış operatif yöntemler ile embriyo nakli uygulamalarında bir alternatif olarak laparoskopi tekniğinden de yararlanılabileceği, bu amaçla kazanılan embriyoların değerlendirilmesinden sonra fertil ve gelişmekte olanların alıcı hayvanlara laparotomi yapılmadan median hattın sağından ve solundan 4 cm uzaklıkta iki adet küçük delik açılarak laparoskop ile ovarium'da corpus luteum bulunan taraftaki cornu uteri'ye nakil edilebileceği, bu teknikte nakil yapılan 54 alıcı koyundan 22 tanesinde gebelik elde

edildiği bildirilmiştir(85).

Qin ve Shu-li(69) koyunlarda kazanılan embriyoların alıcılara naklinde yaygın olarak kullanılan laparotomi tekniğinin zaman kaybına yol açtığı gibi post-operatif dönemde sıklıkla yapışmalara ve enfeksiyona neden olduğunu, embriyo naklinin daha basit bir teknikle yapılabileceğini, bu yöntemle göre tuberculum pubicum'un yanında kasık bölgesindeki operasyon bölgesinin dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra bir elle deri gerdirilip, dişi hayvanları kısırlaştırmada kullanılan özel operasyon bıçağı ile 1.2-1.5 cm uzunluğunda bir ensizyon yapıldığını, cornu uteri ve ovarium'ların işaret parmağı veya ucu kıvrık bir pens ile dışarıya alınıp, embriyoların oviduct ya da cornu uteri'ye transfer edildiğini daha sonra genital organların dikkatlice abdominal boşluğa itildiğini, ensizyon hattının kendi kendine kapanabildiğini, bütün bu işlemlerin 3-5 dakika kadar sürdüğünü, bu teknikte yaptıkları 60 embriyo naklinde gebelik oranının yaygın metotla elde edilen sonuçlara yakın olduğunu ve post-operatif dönemde yapışma oranının (% 9.1) yaygın metotla göre (% 27.78) çok daha az olduğunu bildirmektedirler. Alıcılarda embriyoların nakil edileceği reproduktif organın bölümünün embriyoların yaşına göre tayin edildiği, koyun ve keçilerde östrusun başlamasından sonraki 3-4. günde kazanılan embriyoların (8 yada daha fazla blastomerli) uterusu transfer edilmesi gerektiği ancak keçilerde 4.günden önce kazanılan embriyoların (2 veya 8 blastomerli) oviduct'a transfer edilmesinin daha uygun olduğu bildirilmiştir(14,43). Uygun yere transfer edildiğinde embriyoların yaşam oranının 2 günlük olanlarda % 50, 3 günlük ve daha yaşlı embriyolarda % 70 olduğu, buna göre uterusu yapılan nakillerde embriyoların gelişme oranının oviduct'a yapılanlara göre daha yüksek olduğu ileri sürülmektedir(17,59,60,82). Birden fazla yavru yapan ırklarda alıcıların reproduktif organlarının kapasitesine bağlı olarak 2 veya daha fazla embriyo transfer edilebildiği ancak tekli doğum yapan ırklarda alıcılara ikiden fazla embriyo nakledildiğinde perinatal yavru ölümleri oranının yüksek olduğu bildirilmiştir(45).

Bessoudo ve ark.(16) Ankara keçilerinde birer, ikişer ve üçer adet embriyo transferi yaptıkları alıcılarda gebelik oranlarını karşılaştırdıklarını ve en yüksek gebelik oranını tek embriyo nakledilen alıcılarda elde

ettiklerini ileri sürmektedirler.

Kiessling ve ark.(45) Sütçü keçiler üzerinde yaptıkları çalışmada gebe kalan alıcıların oranının transfer edilen embriyo gruplarına göre % 43-63 arasında değiştiğini, gebe kalan alıcılarda yavru olarak gelişen embriyoların oranının da % 56-76 arasında olduğunu ve bu sonuçlara göre en iyi embriyo/alıcı oranının 2 olduğunu bildirmişlerdir(40,63,82,84,85). Taşıyıcı hayvanlarda embriyoların yaşama oranlarının erken gebelik teşhisi ile tespit edildiği ve bu oranın genellikle doğumla sonuçlanan gerçek gebelik oranından daha yüksek olduğu belirtilmiştir(82).

Walker ve ark.(85) Embriyo nakli işlemi uyguladıkları 54 alıcı koyuna, nakilden yaklaşık 30 gün sonra laparoskopik muayene yaparak 22 tanesinde gebeliğin oluştuğunu (% 41) ve bunların 16 tanesinin doğurduğunu (% 30) tespit ettiklerini ileri sürmüşlerdir.

2.8. Taşıyıcıların Bakımı

Embriyo naklinden sonra taşıyıcı hayvanlara, normal gebe hayvanlara gösterilen bakım ve beslenme koşulları dışında özel bir bakımın gerekli olmadığı ve nakilden sonra ilk izleyen östrusta alıcıların östrus gösterip göstermediklerinin kontrolünün gebeliğin tanısı için yararlı olacağı bildirilmiştir(3,17,46,48). Ayrıca koyun ve keçilerde gebeliğin erken tanısı için Radio-Immuno Assay (RIA), ultrason, vaginal biyopsi, radiografi ve rektal abdominal palpasyon tekniklerinin uygulandığı ve bu teknikler yardımıyla nakilleri izleyen 18-60. günler arasında gebeliğin saptanabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır(12,24,30,44,46,70). Keçilerde RIA metodu ile erken gebelik teşhisi için örneklerin (plasma veya süt) çiftleşmeden sonraki 21-23. günlerde alınması önerilmektedir(12). Rektal abdominal palpasyon tekniği ile tecrübeli bir operatör 65-70 günlük gebeliği % 100 doğrulukla saptayabilir(30).

Richardson(70) koyunlarda 66 günlük gebeliği radiografi ile % 78 doğrulukla 70 günlük gebelikte, çoğul gebeliği % 22 doğrulukla saptadıklarını ileri sürmektedirler.

Walker ve ark.(85) laparoskopik teknikle embriyo nakli yaptıkları taşıyıcı koyunlarda gebelik teşhisini de nakilden 30 gün sonra laparoskopik muayene ile yaptıklarını ve 54 koyundan 22 tanesinde gebeliğin şekillendiğinin tespit edildiğini bildirmektedirler.

Alaçam ve ark.(5) koyunlarda ultrases dalgaları ile 30-60 günlük gebeliği % 41.2, 60-90 günlük gebeliği % 54.5 doğruluk ile saptadıklarını buna karşılık Dinç ve Güler(28) koyunlarda gebeliği aynı teknikle, gebeliğin 35, 60, 75, 90, 105 ve 120. günlerinde sırasıyla % 14, % 33, % 56, % 77, % 95 ve % 100 oranında doğru tespit ettiklerini ileri sürmektedirler. Çeşitli araştırmacılar bugüne kadar koyun ve keçilerde uyguladıkları embriyo nakli tekniği ile % 40-80 oranında gebelik elde ettiklerini bildirmektedirler(8,39,45,58,59,60,85).

Maurer(54) Verici ve taşıyıcılar arasındaki sinkronizasyon farkının embriyoların yaşam oranları üzerine etkisini araştırdığını, alıcı ve verici arasında -48, -24, 0 ve +24 saat sinkronizasyon farkı bulunduğu 5-8 günlük embriyoların yaşam oranlarını sırasıyla % 37.1, % 38.8, % 28.2, % 16.7 olarak tespit ettiklerini ileri sürmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışma Haziran 1989 - Eylül 1989 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Bilim Dalı'nda 19 adet Ankara keçisi üzerinde yürütüldü. Hayvanlar arasında bir örnekliliği sağlamak için bütün hayvanlar 1986 doğumlu olanlar arasından seçildi, materyalin gelişme ve kondüsyonları arasında önemli bir fark yoktu. Canlı ağırlıkları ortalama 28 ± 1.34 kg olup daha önce en az bir kez gebe kalıp, normal doğum yapmışlardı. Çalışma sırasında doğal aşım amacıyla kullanılmak üzere yaşları 2-3 arasında değişen, aşım yapabilen fertil 2 adet Ankara ve 1 adet Kıl tekesi olmak üzere toplam 3 adet teke kullanıldı.

Materyal olarak kullanılan hayvanlar çalışmanın başlamasından yaklaşık 8 ay kadar önce temin edilerek çevreye uyumları sağlanmaya çalışıldı. Bu dönemde ayrıca hayvanlara sistemik muayeneler uygulanarak fertilitelerini olumsuz yönde etkileyecek herhangi bir enfeksiyöz hastalığın bulunup bulunmadığı araştırıldı. Bu arada koruyucu amaçla düzenli parazitler mücadele uygulanmaya başlandı. Hayvanlara özel bir ısı ve ışık rejimi uygulanmadı. Keçiler çalışmaya başlanmadan önce ve çalışma boyunca kapalı bokslarda tutulup, günün belirli saatlerinde meraya çıkarıldılar. Mera dönüşü hayvan başına 300-500 g. arasında değişen konsantre koyun yemi verildi. Kış aylarında AD₃E vitamin ile takviye edildiler.

3.2. Metod

Çalışmada kullanılan hayvanlar 9 adet verici, 10 adet de taşıyıcı olarak kullanılmak üzere 2 gruba ayrıldı. Çalışmaya başlamadan önce bütün hayvanların anöstrusta olduğu gözlemlendi.

3.2.1. Östrus Sinkronizasyonu

Kullanılan malzeme ve ilaçlar:

- Vaginal tampon: VERAMIX (Upjohn) (Medroxyprogesteron acetate)
- Gebe kısrağ serumu (PMSG): INTERGONAN (Vemie Veterinar Chemie GmbH) (Her flakonda 1000 IU Pregnant mare serum gonadotropin).

Keçiler 9 adet verici ve 10 adet taşıyıcı olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Anöstrus dönemindeki hayvanlarda her seferinde 1 adet verici ve 1 adet taşıyıcı hayvan sinkronizasyon işlemine (-24 saat) tabi tutuldular. Vaginal tampon uygulaması: Herbiri 60 mg medroxyprogesteron acetate emdirilmiş süngerler şeklindeki vaginal tamponlar özel spekulumları ile vaginaya yerleştirildiler. Bu işlemden önce keçilerin vulva ve perineal bölgesi antiseptik solüsyon ile yıkanarak temizlendi. Tamponlar yerleştirilmeden önce üzerine koruyucu antiseptikli bir pomad sürülerek boru şeklindeki özel yapılmış spekulumlarına konuldu. Bir yardımcı tarafından hayvanın arka kısmı yukarıya doğru kaldırılıp, hayvan bu şekilde tespit edildikten sonra vulva dudakları açılarak spekulum vaginaya uygulandı. Spekulumun pistonuna basınç yapılarak tampon vaginanın cranial'ine bırakıldıktan sonra spekulum dikkatlice dışarıya alındı. Uygulama sırasında tamponlara bağlı naylon iplerin vulva dudaklarının dışında kalması sağlandı. Uygulamadan sonraki günlerde bu ipler gözlenerek tamponların düşüp düşmediği kontrol edildi. Tamponlar vaginada 18 gün süre ile tutuldular. Bu sürenin sonunda vulva dudaklarından sarkan iplerinden çekilerek dışarı alındılar. Tamponların çıkarılmasından 24 saat önce alıcı keçilere 500 IU PMSG adale içi uygulandı. Alıcı ve verici keçilerde östrus, uygulamanın bitiminden başlanarak 6

saat ara ile keçiler arasında arama tekeleri katılarak saptandı.

3.2.2. Süperovulasyon Çalışmaları

Kullanılan İlaçlar

1- Gebe kısırak serumu (PMSG): INTERGONAN (Vemie Veterinar Chemie GmbH) (Her flakonda 1000 IU Pregnant mare serum gonadotrophin)

2- Chorionic gonadotropin (LH): PREGNYL (Organon) (Her ampulde 500 IU Chorionic gonadotrophin)

Süperovulasyon için hormonal tedavi, 9 adet Ankara keçisine uygulandı. Bu amaçla östrus siklusları vaginal tampon ile sinkronize edilen keçilere tamponların çıkarılmasından bir gün önce PMSG hormonu 1200 IU dozda adale içi tek bir enjeksiyon şeklinde uygulandı. Vaginal tamponların çıkarılmasından sonraki saatlerde östrus gösteren keçilere tohumlamayı takiben 1000 IU dozda LH hormonu enjeksiyonu yapılarak ovulasyon garanti altına alınmaya çalışıldı. Tedavi sonrası elde edilen süperovulasyon sonuçları, cerrahi olarak uterusun yıkanması sırasında ovarium'lardaki corpus luteum ve folliküler tek tek sayılarak saptandı. Süperovulasyon için uygulanan gonadotropinler ve dozları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Süperovulasyon için uygulanan gonadotropinler ve dozları.

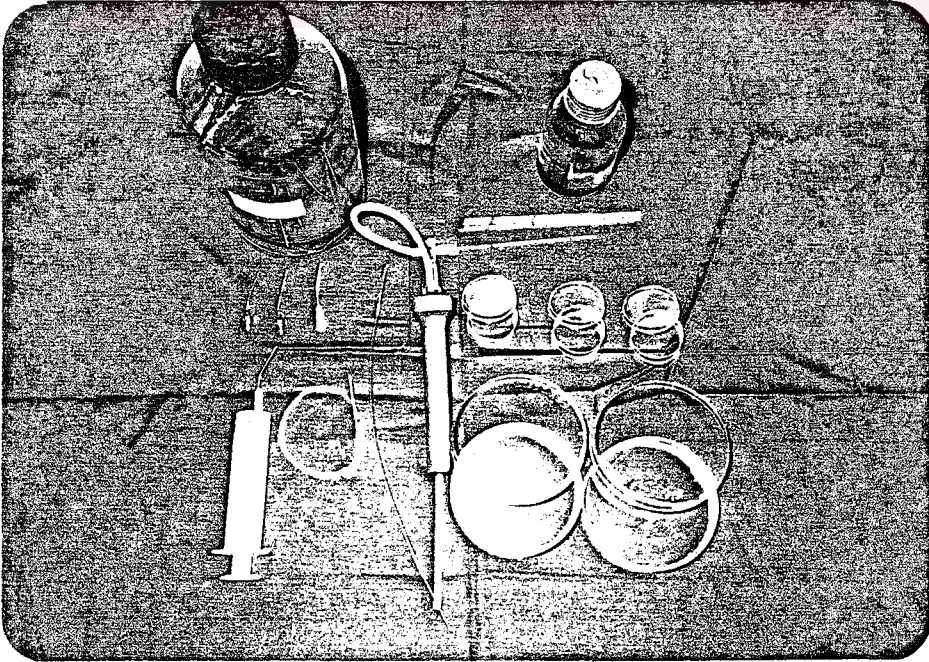
İrk	N	Sinkronizasyon için uygulanan progesteron	GONADOTROPİN'LER	
			Folliküler gelişme için PMSG	Ovulasyon için HCG
Ankara keçisi	9	MAP (18 gün boyunca)	Vaginal süngerlerin çıkarılmasından 24 saat önce 1200 IU	Tohumlamayı takiben 1000 IU

3.2.3. Tohumlama Çalışmaları

Verici olarak seçilen ve süperovulasyon tedavisi yapılan keçilerin tohumlanmasında libidosu ve fertilitesi kontrol edilmiş 2 adet Ankara tekesi ve bir adet Kıl tekesi kullanıldı. Tohumlama doğal aşım yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla sinkronizasyon tedavisinin bitiminden başlanarak östrus gösteren keçiler östrusları sona erene kadar 12 saat ara ile kapalı bir boksta teke ile birlikte tabi tohumlamaya bırakıldılar.

3.2.4. Embriyoların Kazanılması ve Değerlendirilmesi

Kullanılan malzeme: Stereo-mikroskop (10x-40x), etüv (37 C), sıcak tabla (37 C), cam petri kutuları (9 cm çaplı), küçük plastik petri kutuları (3 cm çaplı), plastik ve cam enjektörler (10,20 ml), ucu kütleştirilmiş 12 gauge'lik enjektör iğnesi, polietilen yıkama boruları (20 cm uzunluğunda, ucuna infiltrasyon iğnesi adapte edilmiş), mikropipet, mikropipet tutucusu, cellulose acetate (Millipore) filtre (0.45 mikron) kullanıldı (Resim 1).



Resim 1: Embriyoların kazanılması ve değerlendirilmesinde kullanılan malzeme.

Embriyoların kazanılması ve değerlendirilmesi işlemlerinde uterusun yıkanması ve embriyoların kısa süre saklanması için yararlanılan BSA ile zenginleştirilmiş Dulbecco'nun modifiye phosphate buffer saline (PBS) yıkama sıvısının bileşimi Tablo 2'de verilmiştir.

Yıkama sıvısı hazırlandıktan sonra 0.45 mikron çapında delikleri olan Cellulose acetate (Millipore) filtreden süzülerek sterilize edildi. Kullanılincaya kadar -20 C'de saklandı. Stok solusyon olarak hazırlanan ve saklanan yıkama sıvısına BSA, uterus yıkaması işleminde kullanılmadan kısa bir süre önce katıldı. Embriyoların kazanılması işlemi anöstrus dönemindeki 9 adet keçi üzerine yapıldı. Bu amaçla süperovulasyon tedavisi uygulanan ve tohumlama yapılan keçilerde, tohumlamayı takip eden 5-6. günlerde laparotomi yapılarak cornu uteri'ler yıkandı. Uterus yıkaması yapılacak keçiye Rompun 0.05 mg/kg dozda adale içi yapılarak genel sedasyon sağlandıktan sonra Resim 2'de görüldüğü şekilde yatırılıp, tespit edilerek operasyona hazırlandı. Lokal infiltrasyon anestezisi uygulanmasını takiben median çizgi üzerinde memelerin hemen önünden başlanarak yaklaşık 10 cm büyüklüğünde bir ensizyon yapıldı.

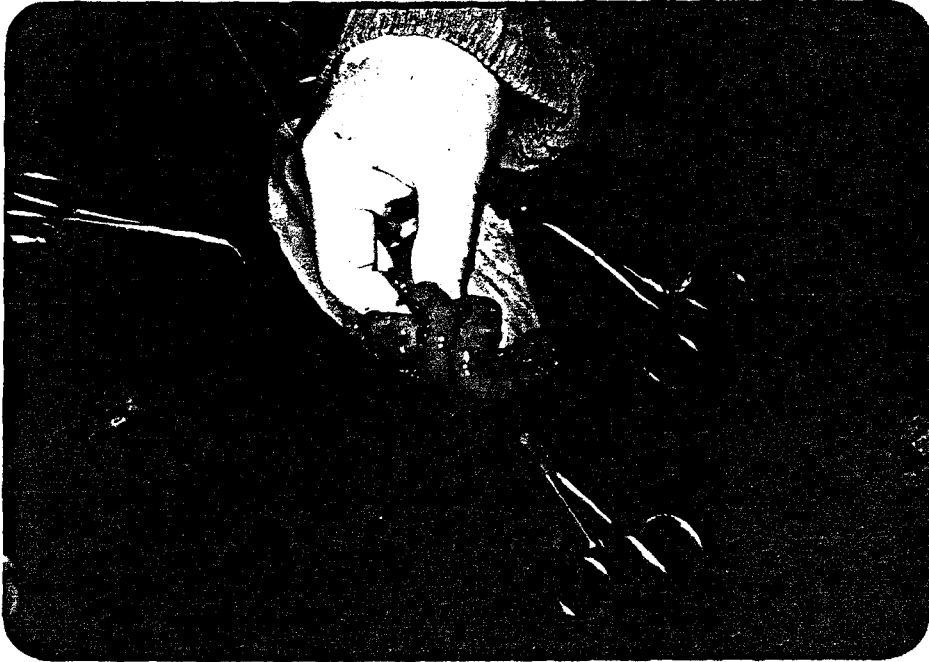
Tablo 2: Dulbecco'nun modifiye phosphate buffer saline (PBS) yıkama sıvısı

Yıkama sıvısının içerdiği kimyasal maddeler	Miktarı mg/lt
NaCl	8000
KCl	200
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1150
MgCl ₂ .6H ₂ O	100
KH ₂ PO ₄	200
CaCl ₂	100
BSA (Bovine Serum Albumin)	20000
Glucose	1000
Gentamycin	1 ml
Phenol red	1 ml



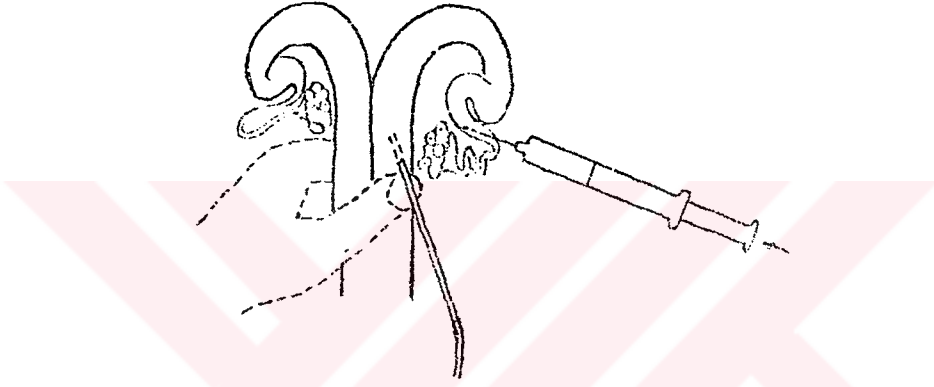
Resim 2: Embrioların laparotomi ile kazanılması sırasında hayvanların yatış şekli.

Uterus karın boşluğunda bulunup ensizyon hattından dışarı dikkatlice alındıktan sonra ovarium'lar üzerindeki follikül ve corpus luteum'lar tek tek sayılarak hayvanların süperovulasyon tedavisine verdikleri cevaplar saptandı (Resim 3).

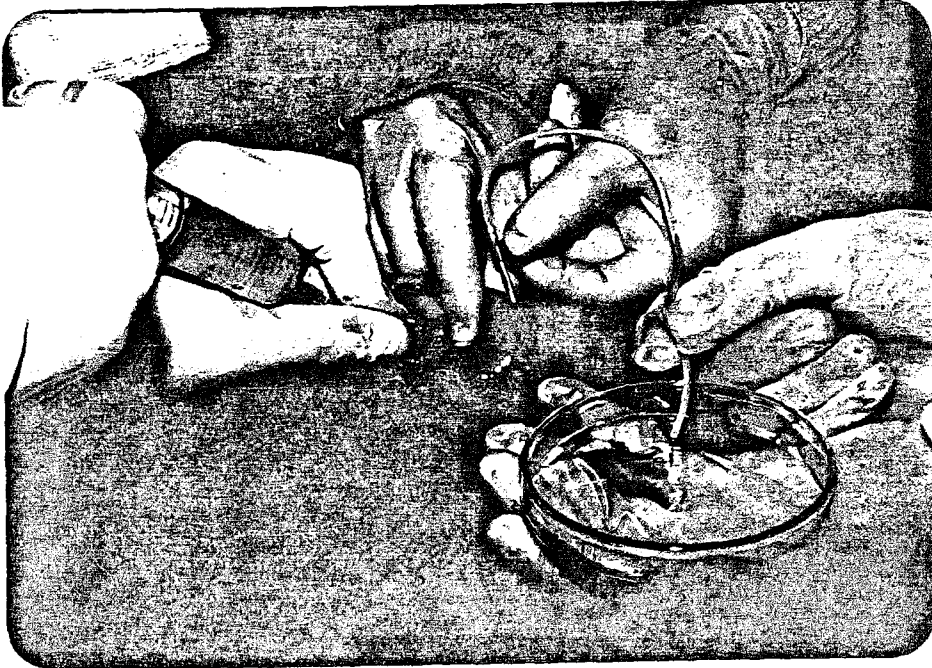


Resim 3: Uterus yıkaması amacıyla cornu uteri'lerin ensizyon hattından dışarı alınması ve süperovulasyon bulguları.

Embriyoların kazanılması için uterusun yıkanmasına başlanmadan önce baş ve işaret parmağı ile bifurcatio uteri'ye basınç uygulanarak uterus lümenine verilecek medium'un vaginaya ve diğer cornu uteri'ye geçmesi engellendi(Şekil 1). Daha sonra ucu kütleştirilmiş bir enjektör iğnesi ile uterus duvarı utero-tubal birleşme yerinden delinerek 20 ml medium buradan yavaş yavaş uterus lümenine verildi (Resim 4). Cornu uteri iyice dolup uterus duvarı gerildikten sonra arka kısmına polietilen boru adapte edilmiş kalın, ucu sivri bir infiltrasyon iğnesi ile bifurcatio uteri'den uterus lümenine girildi ve cornu uteri'ye uygulanan özenli masaj hareketleri ile medium'un kanülden geçerek petri kutularında toplanması sağlandı (Resim 5).



Şekil 1: Uterus yıkaması sırasında bifurcatio uteri'ye baş ve işaret parmağı ile basınç uygulanması ve medium'un uterus lümenine verilmesi.



Resim 4: Uterus yıkaması işleminde medium'un utero-tubal noktadan uterus lümenine verilmesi



Resim 5: Cornu uteri'lere yapılan masaj ile medium'un kanülden geçirilerek petri kutusuna akıtılması.

Bütün bu işlemler diğer cornu uteri'de de tekrar edildikten sonra içerisine bir miktar antibiyotik verilen uterus yerine konulup karın boşluğu kapatıldı. Verici hayvanlardan elde edilerek, steril petri kutularına alınan uterus yıkantıları sıcak tabla üzerinde yaklaşık 30 dakika kadar bekletilerek embriyoların dibe çökmesi sağlandı. Daha sonra uterus yıkantıları stereo mikroskopta, 10x-40x büyütmelerde kontrol edilerek embriyolar arandı (Resim 6). Mikroskopta saptanan embriyolar, mikropipet tutucusu ucuna adapte edilmiş mikropipet yardımıyla buldukları ortamdan derhal uzaklaştırılarak yine steril, içinde 2 ml taze medium bulunan küçük petri kutularına (3 cm çaplı) aktarıldı.



Resim 6: Embriyoların stereo mikroskopta aranması ve değerlendirilmesi.

Toplanan embriyolar stereo mikroskopta 10x-40x büyütmelerde morfolojik görünümüne göre Normal (N) ve Dejenere (D) olmak üzere değerlendirildiler. Trophoblast'ları ve iç hücre kümeleri kesif, zona pellucida içerisinde düzenli, sitoplazması homojen, granüllü veya düzensiz parçalı olmayan embriyolar normal olarak nitelendirildi. Trophoblast'ları ve hücre içi kümeleri aynı ölçüde farklılaşma ve gelişme göstermeyen, sitoplazması granüllü veya düzensiz ve belirgin olmayan, katlanmış, buruşmuş, yırtılmış ve normal yuvarlak yapısını yitirmiş olan embriyolar dejenere olarak nitelendirildi.

3.2.5. Embriyoların Taşıyıcı Hayvanlara Nakli

Kullanılan malzeme:

Operasyon aletleri, medium, mikropipet tutucusu ve pastör pipetleri.

Embriyo nakli uygulaması anöstrus dönemindeki toplam 5 adet Ankara keçisine yapıldı. Değerlendirme sonucunda normal olarak nitelenen embriyolar nakil için kullanıldı. Verici hayvanlardan kazanılan embriyolar kısa bir süre içinde değerlendirilerek (yaklaşık 60 dakika içinde) taşıyıcı hayvanlara nakil edildiler. Taşıyıcı olarak kullanılacak keçi, Rompun ile (0.05 mg/kg dozda adale içi) genel sedasyon sağlandıktan sonra yatırılıp, dört ayağından tespit edildikten sonra operasyon bölgesinin traş ve dezenfeksiyonu yapıldı (Resim 2). Daha sonra bölgeye lokal infiltrasyon anestezisi uygulandıktan sonra median hat üzerinde ve memelerin hemen önünden başlanarak yapılan ufak bir ensizyon ile laparotomi uygulandı. Uterus ve ovarium'lar özenle ensizyon hattından dışarı çıkarılıp ovulasyonların şekillenip şekillenmediği kontrol edilerek corpus luteum bulunan ovarium tarafındaki cornu uteri saptandı. Nakledilecek embriyo 0.02 ml medium içinde pastör pipetine çekildikten sonra, nakil yapılacak cornu uteri önce küt bir iğne ile delinip, pipetin ucu buradan uterusu sokuldu ve embriyo cornu uteri'nin cranial'ine doğru uterus lümenine verildi (Resim 7). Nakil yapılan cornu uteri'deki deliğe kısa bir süre hafifçe basınç yapılarak oluşabilecek bir kanama önlenirken bir yandan da küçük bir ihtimal de olsa embriyo pastör pipetinde kalabileceğinden, nakilde kullanılan pastör pipeti mikroskop altında incelenerek embriyonun uterusu verilip verilmediği kontrol edildi. Uterus özenle karın boşluğundaki yerine yerleştirildikten sonra laparotomi yarası kapatıldı.

3.2.6. Taşıyıcıların Bakımı

Anöstrus döneminde embriyo nakli yapılan taşıyıcı 5 adet Ankara keçisi operasyonu izleyen günlerde dikişler alınana kadar ayrı bir boksta tutuldular. Laparotomi dikişleri operasyonu takip eden 7.günde alındı. Operasyonu izleyen 16-24. günler arasında teke katılarak taşıyıcı keçilerin östrus gösterip göstermedikleri gebeliğin saptanması yönünden araştırıldı. Östrus göstermeyen hayvanlarda gebeliğin 70-90. günlerinde rektal abdominal palpasyon tekniği uygulanarak gebelik sonuçları saptandı. Gebelik süre-

since taşıyıcı hayvanlara özel bir bakım ve beslenme uygulanmadı.



Resim 7: Embriyonun taşıyıcı hayvana nakli

4. B U L G U L A R

Bu çalışmada kullanılan hayvanların gerçek anöstrus döneminde olup olmadıklarını araştırmak amacıyla hormon uygulamalarına başlanmadan önce hayvanların arasına teke katılarak anöstrusta oldukları klinik olarak belirlendi.

4.1. Sinkronizasyon

Anöstrus döneminde MAP içeren vaginal sünger uygulanan Ankara keçilerinde östruslar vericilerde uygulamanın bitiminden sonraki 36-72. saatler, alıcılarda ise uygulamanın bitiminden sonraki 48-72. saatler arasında görüldü. Elde edilen sinkronizasyon bulguları ile verici ve alıcılar arasındaki sinkronizasyon farkı ortalaması Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3: Sinkronizasyon sonuçları ve sinkronizasyon farkı ortalaması

Hormon uygulanan hayvanlar	N	Östrus gösterenlerin sayısı	Östrusun görüldüğü saat	Östrus oranı %	Sinkronizasyon farkı (saat)
Vericiler	9	7	36-72	77	4.11
Alıcılar	10	9	48-72	90	

Sünger uygulanan 19 hayvandan yalnızca 5 keçide suprasyon şekillendiği görüldü ve süngeri düşen hayvana rastlanmadı.

4.2. Süperovulasyon

Anöstrus döneminde MAP içeren vaginal sünger uygulanarak östrusları sinkronize edilen 9 adet Ankara keçisine süngerlerin çıkarılmasından 24 saat önce adale içi 1200 IU dozda PMSG yapılarak süperovulasyon uygulandı. Bu tedavi sonucu oluşan değişiklikler, uterus yıkaması sırasında ovarium'lardaki fonksiyonel yapılar tek tek sayılarak saptandı (Resim 8).



Resim 8: Süperovulasyon şekillenmiş ovarium.

Elde edilen süperovulasyon bulguları tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Süperovulasyon bulguları.

N	Süperovulasyon için uygulanan hormon	C.L. sayısı ortalaması	Folikül sayısı ortalaması	Süperovulasyonun başarı oranı (%)
9	PMSG	8.88	5.22	88.8

4.3. Tohumlama Bulguları

Süperovulasyon tedavisi uygulanan, embriyo elde edilecek keçilere doğal tohumlama uygulandı. Tohumlama ile sağlanan fekondasyon oranı % 33.3 olarak saptandı.

4.4. Embriyoların Toplanması ve Değerlendirilmesi

Doğal tohumlama ile tohumlanan 9 adet verici Ankara keçisine östrusu izleyen 6.günde yapılan uterus yıkaması ile elde edilebilen embriyolar ve değerlendirme özellikleri tablo 5’de verilmiştir.

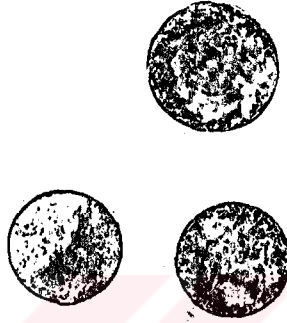
Tablo 5: Elde edilen embriyo sayısı ve değerlendirme bulguları.

Uterus yıkaması yapılan keçi sayısı	Kazanılan ovum sayısı	Kazanılan embriyo sayısı	Transfer edilebilir embriyo sayısı
9	30	15	15

Elde edilen embriyolardan normal olarak değerlendirilen bir embriyo ile döllenmemiş ve dejenere ovumlar resim 9 ve 10’da verilmiştir.



Resim 9: Normal gelişmiş, 6 günlük canlı bir keçi embriyosu.(63 x)



Resim 10: Döllenenmemiş ve dejenere olmuş ovumlar.(63 x)

4.5. Embriyo Nakli Bulguları

Anöstrus dönemindeki 5 Ankara keçisinin her birine 2 adet embriyo nakil edildi. Nakil işleminden sonra 3 taşıyıcı hayvanda gebelik saptandı ve bunlardan 5 adet yavru elde edildi ancak sezeryan ile alınan 2 yavru doğumdan kısa bir süre sonra öldü. Nakil sonucu elde edilen bulgular tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6: Nakil Bulguları.

Nakil yapılan alıcı sayısı	Nakil edilen embriyo sayısı	Gebe kalan alıcı sayısı	Elde edilen yavru sayısı	Başarı oranı (%)
5	10	3	5	60

Transfer çalışmalarında taşıyıcı olarak kullanılan Ankara keçileri ile elde edilen oğlaklar resim 11’de sunulmuştur.



Resim 11: Taşıyıcı Ankara keçileri ve elde edilen oğlaklar.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Embriyo nakli, günümüzde genetik ilerlemenin en hızlı şekilde sağlanması için başta inek olmak üzere koyun, keçi, kısırak, kedi, köpek gibi evcil hayvanlar ile nesli tükenmekte olan yabani hayvanlarda ve medical tıpta yaygın olarak uygulanmaktadır(48,53). Koyun ve keçilerde embriyo nakli yöntemi bugün için öncelikle cerrahi yöntemle gerçekleştirilmektedir(3,14,40,46,48,82). Bizim yapmış olduğumuz embriyo nakli çalışmasında da cerrahi teknikten yararlanılmıştır. Embriyo nakli çalışmalarında kullanılacak taşıyıcı ve verici hayvanların seçiminin, naklin başarısını büyük ölçüde etkilediği, bu nedenle yapısal veya görülebilir bir bozukluğu olmayan en az bir kez doğum yapmış, siklusları düzenli, uygun yaştaki hayvanların seçilmesi gerektiği bildirilmektedir(3,46). Sunulan bu çalışmada da taşıyıcı ve verici hayvanların seçiminde bu noktalara özen gösterilmiş, çalışma materyalinin sınırlı sayıda olması nedeniyle bütün keçilere östrus sinkronizasyonu uygulanmıştır. Koyun ve keçilerde östrus sinkronizasyonu hem aşım sezonunda hem de anöstrus döneminde kullanılabilen progestagenler ile sağlanabilmiştir(3,35,46,47). Östrusu geciktirip, ovulasyonu bloke ederek etki eden progestagenler, verici ve taşıyıcı hayvanlarda ovariyel aktiviteyi uyarmak amacıyla oral, deri altı implant, kas içi enjeksiyon veya vaginal tamponlar şeklinde uygulanmaktadır(7,26,46,48,55,66). Bununla birlikte gerektiğinde yetiştirici tarafından da uygulanabilen ve keçilerde 17-22 gün süreyle vaginada bırakılan vaginal süngerlerin bu amaçla kullanılmalarının kolay, pratik ve etkili olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmektedir(1,19,32,63,81). Bizde çalışmamızda hem başarılı sonuçlar alınması hem

de uygulama ve kontrol kolaylığı nedeniyle 60 mg medroxyprogesteron acetate içeren vaginal süngerleri 19 adet Tiftik keçisine 18 gün boyunca uyguladık.

Kılıçoğlu ve ark.(46) ile Güler(35) deneme sırasında vaginal süngerlerin az sayıda da olsa kaybolduğunu ayrıca süngerlerin vaginadan çıkarılması sırasında birkaç hayvanın vaginasında hafif bir suprasyon tespit ettiklerini ancak bunun birkaç gün içerisinde tedavisiz iyileştiğini ve bu durumun fertilitayı olumsuz yönde etkilemediğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamız sırasında sünger uygulanan 19 hayvandan hiçbirinde süngerler kendiliğinden düşmemiş sadece 5 tanesinde çıkarılma sırasında hafif bir suprasyon tespit edilmiş ancak bunlar bir hafta içerisinde kendiliğinden, tedavisiz iyileşmiştir. Anöstrus dönemindeki koyun ve keçilerde progesteron uygulamasının bitiminden 48 saat önce veya son progesteron tedavisinin yapıldığı gün PMSG'nin 250-750 IU kas içi kullanılması ayrıca sürüye koç veya teke katılması, ısı ve ışık ayarlamaları yapılması ve kesif yemle beslenme uygulanmasının östrus sinkronizasyonu ve fertilizasyon oranlarını artırdığı bildirilmektedir(14,20,33,36,50). Çalışmamızda ise alıcı hayvanlara progesteron tedavisinin bitiminden 24 saat önce 500 IU PMSG hormonu adale içi uygulanmış ancak belirtilen diğer uygulamalardan yararlanılmamıştır. Anöstrustaki koyun ve keçilere MAP içeren vaginal sünger uygulanarak yapılan çalışmalarda, tedavinin bitiminden sonraki 2-6 gün içerisinde sinkronize östrusların görüldüğü bildirilmektedir(3,18,84). Bizim yaptığımız çalışmada ise östruslar, tedavinin bitiminden sonraki 36-72. saatler arasında görülerek yapılan çalışmalarla uyum sağladığı gözlenmiştir.

Folikül stimulan hormon veya kısarak serum gonadotropini enjeksiyonları ile koyun ve keçilerde hem anöstrus döneminde hem de aşım mevsiminde ovarium'larda çok sayıda follikül geliştirilebilmekte ve ovulasyonlar sağlanabilmektedir(40,43,48,61). Seksüel siklusları hormonal tedavi ile sinkronize edilen koyun ve keçilere süperovulasyon için, progestagen uygulamalarının bitiminden 24 saat önce PMSG'nin 1200-1500 IU arasındaki dozları uygulanmaktadır(17,22,76,84). Çalışmamızda bu amaçla 1200 IU dozda PMSG'yi, vaginal süngerlerin çıkarılmasından 24 saat önce uyguladık. Bir kısım araştırmacılar ise süperovulasyon tedavisini takiben, gelişen

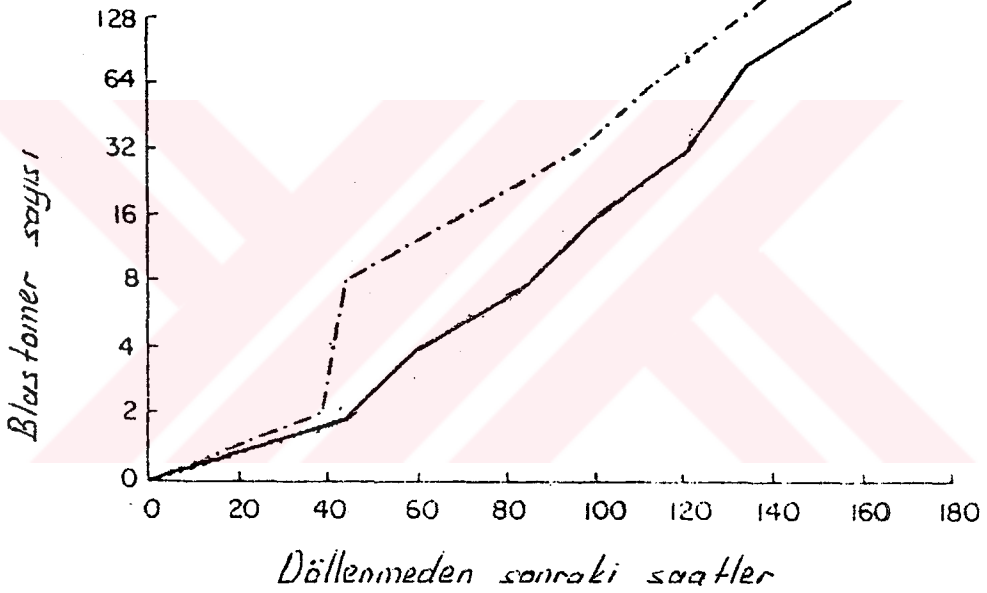
folliküllerdeki ovulasyon şansını artırmak için hayvanların östrus gösterdiği günlerde luteinize edici hormon verilmesinin gerekli olduğunu ileri sürmektedirler(6,14,55,63,82). Çalışmamızda bizde vaginal tamponların çıkarılmasından sonraki saatlerde östrus gösteren keçilere tohumlamadan hemen sonra 1000 IU dozda LH enjeksiyonu yaparak ovulasyonları garanti altına almaya çalıştık.

Embriyo nakli çalışmalarında verici olarak kullanılacak koyun ve keçilere, daha önceden fertilité kontrolü yapılmış koç ve tekeler ile doğal aşım yaptırılabilceği veya vaginal yolla sun'i tohumlama uygulanabileceği ya da operatif olarak spermanın doğrudan cornu uteri'lere verilebileceği bildirilmektedir(8,17,46,48,85). Tohumlama metodu olarak doğal aşım seçilmiş ise östrusun başlamasından itibaren seksüel istek bitene kadar 12 saat ara ile aşım yaptırılması gerektiği ileri sürülmektedir(17,74).

Davis ve ark.(27) süperovulasyon tedavisini takiben doğal tohumlama uyguladıkları koyunlarda fertilizasyon oranını % 88 olarak saptadıklarını buna karşılık Riddel ve ark.(76) bu oranı % 13.5 olarak tespit ettiklerini bildirmektedirler. Çalışmamızda ise embriyo elde edilecek verici keçilere doğal tohumlama uyguladık ve tohumlama ile sağlanan fekondasyon oranını % 33.3 olarak saptadık. Koyun ve keçilerde döllenmiş ovumların 4.günde uterusu ulaştıkları bildirilmektedir(8,14). Buna bağlı olarak embriyolar 3.güne kadar oviduct'un, 4.günden itibaren uterusun yıkanması ile elde edilebilmektedirler(3,17,82). Araştırmacıların çoğu embriyoları, uterustan 4-7.günler arasında yaptıkları uterus yıkaması ile elde ettiklerini bildirmektedirler(7,27,54,86). Küçük ruminant'larda uterus yıkaması, birbirinden pek az farklı birkaç teknik kullanılarak cerrahi metotla yapılmaktadır(8,40,82). Bizde bu çalışmamızda 9 adet verici Ankara keçisine östrusu izleyen 6.günde laparotomi yaparak ve cornu uteri'leri ayrı ayrı yıkayarak embriyoları kazanmaya çalıştık.

Embriyoların kazanılması ve nakile kadar kısa bir süre saklanması için çok çeşitli yıkama sıvıları kullanılmakta olup bu amaçla kullanılan biyolojik medium'lar içerisinde en yaygın olarak kullanılanın % 1-3 oranında BSA ile zenginleştirilmiş Dulbecco'nun modifie phosphate buffered sali-

ne (PBS) olduğu bildirilmektedir(14,40,45). Bizde çalışmamızda embriyoların kazanılması ve kısa bir süre saklanması en uygun medium olan Dulbecco'nun modifiye phosphate buffered saline'i kullandık. Kazanılan embriyoların gelişme safhalarının, tohumlama ile kazanılma zamanı arasındaki süreye bağlı olduğu, keçi embriyolarının gelişmesinin koyun embriyolarına göre bir günlük gecikme gösterebileceği bildirilmektedir(17,40). Koyun ve keçilerde döllenmeden sonraki saatlerde embriyoların blastomer sayıları grafik 1'de verilmiştir.



Grafik 1: Koyun ve keçi embriyolarının fertilizasyondan sonraki saatlerde blastomer sayıları. Koyun (---), Keçi (—)(10).

Kazanılan embriyolar zona pellucida'larının durumuna, blastomerlerinin şekline ve sayısına, hücre içi kümelerin şekil ve dağılımına ve genel görünümüne göre normal ve dejenere olarak değerlendirilmektedir(14,63). Embriyoların yaşlarına göre uygun gelişim döneminde olmaları gerektiği, birden fazla bölünme gösteren embriyolar çoğunlukta iken daha az bölünme gösteren embriyoların yaşama şanslarının pek fazla olmadığı ancak özellikle keçi embriyolarında büyük vakuollerin varlığının yaşam ve gelişmeyi etkilemediği bildirilmektedir(17,63). Bizim çalışmamızda ise elde edilen 45 ovumun 30 tanesinin döllenmemiş ve dejenere olduğu, 15 tanesi-

nin ise dölllenmiş ve gelişmekte olduğu belirlenmiş ve buna bağlı olarak 30 ovum dejenere, 15 embriyo ise normal olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucu nakil edilebilecek nitelikte olan embriyoların, taşıyıcı olarak kullanılacak koyun ve keçilere nakli laparoskopi tekniğinden yararlanılarak yapılabilirse de bugün için yaygın olarak operatif yöntem uygulanmaktadır(3,40,85). Sunulan çalışmada ise embriyolar östrüstan sonraki 6.günde kazanılmış ve taşıyıcı hayvanların uteruslarına nakledilmiştir. Araştırmacılar verici ve taşıyıcı hayvanların genital organları arasındaki sinkronizasyon farkının başarıyı büyük ölçüde etkilediğini ve küçük ruminant'larda bu farkın 48 saatten fazla olması halinde gebelik oranının önemli ölçüde düştüğünü bildirmektedirler(40,43,82). Çalışmamızda ise verici ve taşıyıcı hayvanlar arasında iyi bir sinkronizasyon sağlanmıştır.

Kiessling ve ark.(45) tekli doğum yapan ırklarda taşıyıcı hayvanlara ikiden fazla embriyo nakledildiğinde erken embriyonik ölüm oranının yüksek olduğunu bildirmektedirler. Çalışmamız sırasında her taşıyıcı hayvana herbiri 0.2 ml medium içinde ikişer adet embriyo nakledildi.

Kılıçoğlu ve ark.(46,47) anöstrus döneminde 60 mg MAP içeren vaginal sünger uyguladıkları koyunların % 71.42'sinde, yine aynı tedaviyi uyguladıkları sütçü keçilerin % 96'sında östrusu saptadıklarını bildirmektedirler. Biz bu çalışmamızda ise sinkronizasyon oranını % 83.5 olarak saptadık. Elde edilen sinkronizasyon oranı Ainsworth ve ark.(1), Beck ve ark.(15) ve Özkoca(65)'nin bulgularından daha düşük, Güler(35) ile Kılıçoğlu ve ark.(47)'nin bulgularıyla benzerdir.

Nakil çalışmalarında kullanılacak taşıyıcı ve verici hayvanlar arasındaki sinkronizasyon farkının \pm 24 saati geçmemesi gerektiği, bu sürenin \pm 12 saat olmasının ideal olarak kabul edildiği bildirilmektedir(3,46,54,73). Bu çalışmada ise verici ve taşıyıcılar arasındaki sinkronizasyon farkı 4.11 saat olarak saptanmıştır. Bu bulguyu embriyo nakli uygulamaları için başarılı olarak nitelendirmekteyiz.

Meinecke-Tillman ve Wassmuth(57) PMSG uyguladıkları koyunlarda süperovulasyonun başarı oranının % 90.9, ortalama ovulasyon sayısı-

nın 5 olduğunu, Kılıçoğlu ve ark.(46) bu oranların çalışmalarında % 100 ve 3.0 olduğunu bildirmektedirler. Bizim çalışmamızda ise süperovulasyon yaptırdığımız hayvanlardan elde ettiğimiz başarı oranı % 89, ortalama ovulasyon sayısı ise 8.9'dur.

Elde edilen % 33.3'lük fertilizasyon oranının Riddel ve ark.(71)'nin bulgularından yüksek, Kılıçoğlu ve ark.(46) ile Moore ve ark.(60)'nin bulgularından düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, Bearden ve Fuguy(14), Hafez(40) ile Sugie ve ark.(82)'nin çalışmalarında da belirtildiği gibi süperovulasyon uygulanan koyun ve keçilerde spermatozoitlerin cervix uteri'den geçişlerinin yavaşlamasına ve gonadotropinlerin meydana getirdiği oocyte bozulmalarına bağlı olduğu kanısındayız.

Yapılan çalışmalarda elde edilen embriyoların genellikle ovarium'larda bulunan corpus luteum'ların % 40-80'i kadar olduğu bildirilmektedir(48,82). Bu çalışmamızda ise embriyo kazanma oranı % 56 olarak saptanmıştır. Bulduğumuz bu sonucun yapılan diğer çalışmalara kıyasla biraz düşük olduğunu gözledik. Bu durumu, deneyim eksikliğine ve uterusun yıkanması sırasında bifurcatio uteri'ye yetersiz basınç uygulanması sonucu medium'un bir kısmının geriye doğru kaçmasına bağlamaktayız.

Çeşitli araştırmacılar bugüne kadar koyun ve keçilerde uyguladıkları embriyo nakli tekniği ile % 40-80 oranında gebelik elde ettiklerini ve gebe kalan taşıyıcılarda yavru olarak gelişen embriyo oranının % 56-76 arasında değişebildiğini saptamışlardır(8,39,45,58). Bizim yaptığımız bu çalışmada ise 5 taşıyıcı hayvana nakil yapılmış, 3 tanesinde gebelik sağlanmış (% 60) ve 5 canlı yavru elde edilmiştir. Ancak sezeryan ile alınan ikiz yavrular doğumdan kısa bir süre sonra ölmüşlerdir. Elde edilen bu gebelik oranı Kılıçoğlu ve ark.(48), Walker ve ark.(85) ve Hancock ve Hovel(39)'in bulgularıyla uyumludur.

Taşıyıcı hayvanlarda nakil sonucu gebeliğin oluşup oluşmadığı östrus kontrolü, RIA, ultrason, vaginal biyopsi, radiografi ve abdominal palpasyon teknikleri ile nakilleri izleyen 18-60. günler arasında saptanabilmektedir(12,24,30,70). Alaçam ve ark.(5) koyunlarda ultrason tekniği ile

30-60 günlük gebeliği % 41.2, 60-90 günlük gebeliği % 54.5 doğrulukla saptadıklarını buna karşılık Dinç ve Güler(28) aynı teknikle, gebeliğin 35, 60, 75, 90, 105 ve 120. günlerinde sırasıyla % 14, % 33, % 56, % 77, % 95 ve % 100 oranında doğru tespit ettiklerini ileri sürmektedirler. Sunulan çalışmada taşıyıcı hayvanlar nakilleri izleyen 16-24. günlerde teke muayenesine tabi tutulmuş, nakil yapılan 5 keçiden hiçbiri tekrar östrus göstermemiştir. Gebelikleri kesin olarak saptamak amacıyla nakilleri izleyen 70-90. günlerde abdominal palpasyon tekniği kullanılarak gebelikler saptanmıştır. Nakil yapılan keçilerde diğerlerinden farklı bakım ve beslenme koşulları uygulanmamış ve operasyonu izleyen 30 gün boyunca ayrı bölmede tutulmuşlar daha sonra diğer hayvanların yanına katılmışlardır.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz bulgular ile aynı amaçla bugüne kadar yapılan pek çok çalışmanın ışığı altında daha geniş bir materyal ile uygulanacak embriyo nakli tekniklerinin genetik potansiyeli çok iyi dişilerin gen birikimlerinden azami düzeyde faydalanmayı sağlayabileceği ve kısa sürede istenilen genotipte hayvanların elde edilebileceği bir teknik olması, Türk tiftiğinin kalitesinin ve hayvan başına düşen verimin kısa sürede artırılabilmesi, bu sayede ülke ekonomisine katkıda bulunulacağı, bu nedenle diğer hayvan türlerinde olduğu gibi koyun ve keçi yetiştiriciliği programlarında da önemli bir yöntem olacağı diğer yandan da bu tür çalışmaların in vitro fertilizasyon (IVF), mikromanipulasyon, cinsiyet tayini ve nükleer transplantasyon çalışmalarına basamak teşkil edeceği kanısındayız.

6. Ö Z E T

Bu çalışmada anöstrus döneminde bulunan 19 adet Ankara keçisine MAP içeren vaginal süngerler, PMSG ve HCG hormonları uygulanıp sinkronizasyon, süperovulasyon ve uterus yıkaması yapılarak verici hayvanlardan kazanılan embriyoların taşıyıcılara nakli ile bu işlemler sonucu oluşan gebelik ve doğum oranlarının araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 9 adet verici, 10 adet taşıyıcı olarak kullanılmak üzere hayvanlar 2 gruba ayrıldı, tohumlama için ise 2 adet Ankara, 1 adet Kıl tekesi kullanıldı. Sinkronizasyon amacıyla anöstrustaki hayvanlara 18 gün boyunca 60 mg MAP içeren vaginal süngerler uygulandı. Östruslar süngerlerin çıkarılmasından sonraki 36-72. saatler arasında görüldü ve sinkronizasyon oranı % 83.5 olarak saptandı. Süperovulasyon için 9 adet Ankara keçisine progestagen tedavisinin bitiminden 24 saat önce 1200 IU adale içi PMSG enjekte edilip, çiftleşmeyi takiben her hayvana 1000 IU LH kas içi yolla verildi. Elde edilen sonuçlara göre süperovulasyonun başarı oranı % 89, ortalama ovulasyon sayısı ise 8.9 olarak saptandı.

Vericiler doğal aşım yöntemi ile tohumlandılar ve fekondasyon oranı da % 33.3 olarak saptandı. Embriyolar östrusu izleyen 6.günde verici hayvanlara laparotomi yapılarak cornu uteri'lerin ayrı ayrı 20 ml Dulbecco's PBS ile yıkanması sonucu elde edilip stereo mikroskop ile uterus yıkantılarında saptanan embriyolar morfolojik görünümüne göre değerlendirildiler. 9 adet verici hayvanda yapılan uterus yıkaması sonucu 15 emb-

riyo, 30 adet ovum elde edildi. Değerlendirmede, elde edilen 15 embriyonun nakil edilebilir nitelikte olduğuna karar verilerek, bunların 10 tanesi her taşıyıcıya 2 adet olmak üzere 5 taşıyıcı hayvana cerrahi yöntem ile nakil yapıldı. Nakil sonucunda 3 taşıyıcıda gebelik elde edildi, 5 canlı yavru alındı ancak sezeryan yapılan bir taşıyıcı hayvanın ikiz yavruları doğumdan kısa bir süre sonra öldüler.



7. S U M M A R Y

In this study, the object was to work on embryo transfer technique in 19 anestrus Angora goats which were treated with vaginal sponges MAP for synchronization of estrus and with PMSG and HCG for superovulation. The embryos were recovered by flushing of the uterus and by transferring them to the recipient goats the pregnancy and parturition rates of the goats were investigated.

The goats used in this study were divided into two groups, one containing 9 donors and the other 10 recipients and these goats were inseminated by two Angora and one domestic bucks. For the synchronization of estrus the anestrus goats were treated with 60 mg MAP containing vaginal sponges for 18 days. The heats occurred 36-72 hours after the removal of the sponges and the percentage of the synchronization was estimated % 83.5. For superovulation, the donors were treated with 1200 IU PMSG (I.M.) 24 hours before the end of progestagen treatment. After mating each doe was treated with 1000 IU LH (I.M.) According to the results, the percentage of superovulation was % 89 and approximate number of ovulations were 8.9.

The donors were mated naturally and the percentage of fecundation was found as % 33.3. The embryos were recovered on the 6th day following estrus. The recovery of the embryos were carried out by washing the uterine horns with PBS after laparotomy operation. The embryos which

were detected by a stereoscopic microscope were evaluated morphologically. 15 embryos and 30 ova were collected after the uterus flushing of 9 donors. These 15 embryos were found to be transferable. 10 of them were transferred to 5 recipients as 2 embryos/donor. 3 of the recipients were pregnant after transfer and 5 alive kids born. The twins of one of the recipients which had a cesarean section died in a short period.



8. KAYNAKLAR

- 1- Ainsworth,L., Shrestha,J.N.B. (1983): Effect of type of intravaginal progestagen treatment on estrous response and reproductive performance of ewes. *Theriogenology.*, 19(6):869-875.
- 2- Akınlosotu,B.A., Verma,O.P. (1983): Detection of ovulation in goats by blood prostaglandins concentrations. *Am.J.Vet.Res.*, 44(7):1339-1343.
- 3- Alaçam,E. (1983): Evcil hayvanlarda embrio nakli. *U.Ü.Vet.Fak.Derg.* 2(2):15-20.
- 4- Alaçam,E., Tekeli,T., Gökçay,Y. (1986): Sütçü ineklerde gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) enjeksiyonu ile gebelik oranlarının yükseltilmesi üzerinde çalışma. *Selçuk Üniv.Vet.Fak.Derg.* 2(1):27-35.
- 5- Alaçam,E., Deveci,H., Arvas,H., Timurkan,H. (1982): Koyunlarda ultrases ve vaginal biyopsi yöntemleriyle gebelik tanısı çalışmaları. *F.Ü.-Vet.Fak.Derg.*, 7, 1-2, 49-58.
- 6- Allen,R.L., Bondioli,K.R., Wright,R.W. (1982): Induction of estrus and superovulation in seasonally anestrous ewes. *Theriogenology*, 17 (1):74.

- 7- Anderson,L.L. (1969): Sexual behavior and controlling mechanism in domestic birds and mammals. p.541-568 Ed.H.H. Cole and P.T.Cupps. In "Reproduction In Domestic Animals." Academic Press, New York.
- 8- Anderson,G.B. (1977): Reproduction in the ewe and the goat. Ch.11, 285-314. Ed.H.H. Cole and P.T.Cupps. In: "Reproduction In Domestic Animals." Academic Press, New York.
- 9- Arthur,G.H., Noakes,D.E., Pearson,H. (1985): Artificial control of cyclic reproductive activitiy. p.28-35. Ed.Bailliere Tindall. In: "Veterinary Reproduction and Obstetrics." W.B.Saunders Co., Philadelphia.
- 10- Austin,C.R. (1969): Fertilization and development of the egg. p.355-384. Ed.H.H.Cole and P.T.Cupps. In: "Reproduction In Domestic Animals." Academic Press, New York.
- 11- Barry,D.M., Van Niekerk,C.H., Coetzer,W.A., Robertson,M.S. (1988): Superovulatory response and time of ovulation in sheep treated with FSH-p or PMSG followed by GnRH or HCG. *Theriogenology.*, 29(1): 217.
- 12- Bearden,H.J., Fuguay,J.W. (1984): Pregnancy diagnosis. In: *Applied Animal Reproduction.* Virginia. 288-290.
- 13- Bearden,H.J., Fuguay,J.W. (1984): Insemination of the ewe and doe. In: *Applied Animal Reproduction.*, Virginia. 53-76.
- 14- Bearden,H.J., Fuguay,J.W. (1984): Altering reproductive processes. In: *Applied Animal Reproduction.* Virginia. 227-241.
- 15- Beck,N.F.G. et al. (1987): *Animal Prod.* 44:251-254.
- 16- Bessoudo,E., Davies,L., Coonrod,S., Kramer,D.C. (1988): Commercial embryo transfer in Australian angora goats. *Theriogenology.*, 29(1): 222.

- 17- Bondurant,R.H. (1986): Embryo transfer in sheep and goats. p.63-66. Ed.D.A. Morrow. In: "Current Therapy in Theriogenology." W.B.Saunders Co., Philadelphia.
- 18- Brander,G.C., Pugh,D.M., Bywater,R.J. (1982): The hormones II: control of reproductive function. p.181-197. Ed.Bailliere Tindall In: "Veterinary Applied Pharmacology Therapeutics." London.
- 19- Britt,J.H., Roche,J.F. (1980): Induction and synchronization of ovulation. p.547-594. Ed.E.S.E. Hafez. In: "Reproduction In Farm Animals" Lea and Febiger., Philadelphia.
- 20- Britt,J.H. (1987): Induction and synchronization of ovulation. Ch.25, 507-516. Ed.E.S.E. Hafez. In: "Reproduction In Farm Animals." Lea and Febiger., Philadelphia.
- 21- Buckrell,B.C. (1987): Management of reproduction of sheep. Can.-Vet.J., 28 (6):374-377.
- 22- Cameron,A.W.N., Batty,K.M., Trounson,A.O. (1988): Time of ovulation in goats (*Capra hircus*) induced to superovulate with PMSG. J.Rep.Fert. 83, 747-752.
- 23- Carpenter,R.H., Spitzer,J.C. (1981): Response of anestrous ewes to norgestomet and PMSG. Theriogenology., 15 (4):389-393.
- 24- Catchpole,H.R. (1969): Hormonal mechanisms during pregnancy and parturition. p.415-440. Ed.H.H. Cole and P.T.Cupps. In: "Reproduction In Domestic Animals" Academic Press, New York.
- 25- Croker,K.P. et al. (1982): Induction of ovulation and cyclic activity in anestrous ewes with testosterone treated wethers and ewes. Theriogenology., 17 (3):349-354.

- 26- Cupps,P.T., Anderson,L.L., Cole,H.H. (1969): The estrous cycle. p.217-250. Ed.H.H. Cole and P.T.Cupps In: "Reproduction In Domestic Animals." Academic Press, New York.
- 27- Davis,C.I., Correa,S.J. (1984): Induction of superovulation and embryo transfer in ewes. *Animal Breeding Abst.* 7248.
- 28- Dinç,A., Güler,M. (1988): Koyunlarda ultrases ile gebelik tanısı üzerinde çalışmalar. *S.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 4 (1):65-71.
- 29- Echternkamp,S.E. (1982): Influence of breed and season on ovarian and pituitary response in progestagen. PMSG treated ewes. *Theriogenology.*, 18 (1):95-106.
- 30- Ensminger,M.E. (1983): Breeding sheep. *Animal Science.* Ch.31, 627-631. The interstate, Printers x Publishers, Inc. Danville, Illinois.
- 31- Faure,A.S., Boshoff,D.A., Burger,F.J.L. (1983): The effect of whole and halved intravaginal sponges combined with either subcutaneous or intravenous administration of PMSG on synchronization of the estrous cycle of Karakul ewes. *Anim.Breed.Abst.* 1784.
- 32- Fitzgerald,J.A. et al. (1985): A seven-day synchorinaziton method for ewes using medroxyprogesterone acetate (MAP) and prostaglandin F_{2α}. *J.Anim.Sci.*, 61 (2):466-469.
- 33- Gayerie,E. et al. (1980): Pituitary and ovarian activity before and after PMSG in "Ile De France" ewes after autumn (A) and Spring (S) lambing. 9 th International Congress on Animal Reproduction. A.I. Vol. IV Symposia (1 to 5), 152-156, 16-20 June/Spain-Madrid.
- 34- Gustafsson,B.K. et al. (1980): Diphenylethylene derivates for induced of estrus and LH release in sheep and cattle. 9 th International Congress on Animal Reproduction. A.I.Vol. IV Symposia (1 to 5), 148-151, 16-20 June/Spain-Madrid.

- 35- Güler,M. (1988): Anöstrustaki koyunlarda ovariel aktivitenin medroxy-progesteron asetat (MAP) ve GnRH uygulamaları ile uyarılması üzerinde çalışma, Doktora tezi, A.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- 36- Hackett,A.J., Wolynetz,M.S. (1982): Effect of PMSG on the reproductive performance of totally confined ewes bred at synchronized estrus. *Theriogenology.*, 17 (2): 215-221.
- 37- Hafez,E.S.E. (1987): Reproductive cycles. Ch. 6, 107-129. Ed.E.S.E. Hafez. In: "Reproduction In Farm Animals." Lea and Febiger., Philadelphia.
- 38- Hafez,E.S.E., Jainudeen,M.R. (1987): Sheep and goats. Ch.14, 315-323. Ed.E.S.E. Hafez. In: "Reproduction In Farm Animals". Lea and Febiger., Philadelphia.
- 39- Hafez,E.S.E. (1987): Embryo transfer, IVF and genetic engineering. Ch.27, 528-568. Ed.E.S.E. Hafez. In: "Reproduction In Farm Animals." Lea and Febiger., Philadelphia.
- 40- Hanckok,J.L., Hovell,G.J.R. (1961): Transfer of sheep ova. *J.Rep.Fert.* 2, 295-306.
- 41- Hulet,C.V., Shelton,M. (1980): Sheep and goats. p.346-357. Ed.E.S.E. Hafez. In: "Reproduction In Farm Animals." Lea and Febiger., Philadelphia.
- 42- İleri,İ.K. (1985): Koyunlarda bir $PGF_2 \alpha$ analogu olan Tiaprost (ILIREN) ile östrus sinkronizasyonu ve sun'i tohumlama çalışmaları. *İ.Ü.-Vet.Fak.Derg.* 11 (1):15-30.
- 43- İleri,İ.K., Sayın,T. (1986): Sığırlarda embrio transfer çalışmaları. *İ.Ü.-Vet.Fak.Derg.* 12 (1):25-35.

- 44- Jainudeen,M.R., Hafez,E.S.E. (1980): Pregnancy diagnosis. p.560-568. Ed.E.S.E. Hafez, In: "Reproduction In Farm Animals." Lea and Febiger., Philadelphia.
- 45- Kiessling,A.A., Hughes,W.H., Blankevort,M.R. (1986): Superovulation and embryo transfer in the dairy goat. JAVMA, 188, 8:829-832.
- 46- Kılıçoğlu,Ç., Alaçam,E., İzgür,H., Aşkın,Y., Özsar,S., Arif,Ş. (1984): Koyunlarda embrio nakli üzerinde çalışmalar. Doğa Bilim Derg., 8 (3): 257-270.
- 47- Kılıçoğlu,Ç., Alaçam,E., İzgür,H., Aşkın,Y., Özsar,S., Arif,Ş. (1985): Sütçü keçilerde dinoprost tromethamine (PG) ve medroxyprogesteron acetate (MAP) ile östrus sinkronizasyonu. A.Ü.Vet.Fak.Derg. 32 (1): 187-199.
- 48- Kılıçoğlu,Ç., Alaçam,E. (1985): Embrio nakli. Veteriner Doğum Bilgisi ve Üreme Organlarının Hastalıkları. A.Ü.Vet.Fak. Yayını: 403, 49-53.
- 49- Kinsler,A.R. et al. (1983): Ovarian responses of seasonally anestrous ewes administered progesterone, PMS, HCG and (or) GnRH. Theriogenology., 19 (3): 449-464.
- 50- Lammıng,G.E. et al. (1979): Pharmacological control of reproduction cycles. Vet.Rec. 104:156-160.
- 51- Lumb,V.W., Jones,E.W. (1973): Xylazine (Rompun) In: "Veterinary Anesthesia." p.189-190. Lea and Febiger.,Philadelphia.
- 52- Mac Donnell,H.F., Crowley,J.P. (1978): The effect of progesterone impregnated sponges on fertility in anoestrus ewes. Vet.Sci.Com., 2, 115-130.

- 53- Mapletoft, R.J. (1986): Embryo transfer and genetic engineering (Introduction). p.51-53. Ed. D.A. Morrow. In: "Current Therapy in Theriogenology." W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- 54- Maurer, R.R. (1988): Embryo splitting and transfer in sheep. *Theriogenology*, 29 (1): 276.
- 55- Mc Donald, L.E. (1975): Comparative fertilization rates. p.293-303. Ed. Lea and Febiger. In: "Veterinary Endocrinology and Reproduction." Philadelphia.
- 56- Mc Natty, K.P. et al. (1982): Induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrous ewes with exogenous GnRH. *J.Rep.Fert.*, 64, 93-96.
- 57- Meinecke-Tillman, S., Wassmuth, R. (1977): Sonderdruck aus Zeitschrift für Tierzucht und Züchtungsbiologie Bd. 94 (1977/78), H. 3/4, S. 209-216.
- 58- Meinecke-Tillman, S., Meinecke, B. (1984): Embryo transfer in sheep-methods and applications. *Animal Breeding Abst.* 5854.
- 59- Moore, N.W. et al. (1960): Egg transfer in sheep. Factors affecting the survival and development of transferred eggs. *J.Rep.Fertil.* I, 332-349.
- 60- Moore, N.W., Shelton, J.N. (1962): The application of the technique of egg transfer to sheep breeding. *Aust.J.Agric.Res.* 13, 718-724.
- 61- Moore, N.W., Shelton, J.N. (1964): Effect of degree of synchronization between donor and recipient, age of egg and site of transfer on the survival of transferred eggs. *J.Rep.Fert.* 7, 145-152.
- 62- Moor, R.M., Rowson, L.E.A. (1966): The corpus luteum of the sheep: Effect of the removal of embryos on luteal function. *J.Endocrin.* 34, 497-502.

- 63- Moore,N.W. (1982): Egg transfer in the sheep and goat. p. 119-133. Ed.Cyrrill E.Adams In: "Mammalian Egg Transfer." Florida.
- 64- Oldham,C.M. et al. (1980): The influence of progesterone or PGA priming on the ovarian function of seasonally anovular ewes induced to ovulate by their reintroduction to rams, teasing. 9 th International Congress on Animal Reproduction. A.I.Vol. IV. Symposia (1 to 5), 157-160, 16-20 June/Spain-Madrid.
- 65- Özkoca,A. (1968): Tohumlama mevsiminde estrus'un düzenlenmesi bakımından koyunlara progesteron'un intra muscular ve intra vaginal olarak uygulanmasından elde edilen sonuçlar. Lalahan Zootekni Araştırma Ens. Derg., 8 (1-2):29-34.
- 66- Özsar,S., Güven,B. (1987): Control of ovarian function in the Angora during transition period from anestrus to estrus: artificial insemination and fertility control. Doğa Tu.J.Vet.Sci., 11 (2):155-162.
- 67- Pashen,R. (1988): Embryo transfer: Applications implications for the future. California Vet. 42 (3):11-13.
- 68- Popovski,K., Maric,S., Kozarevski,N. (1984): Synchronization of oestrus outside the breeding season using the Chrono-Gest method. Animal Breeding Abst. 4028.
- 69- Qin-G., Shu-Li,N. (1980): A simplified method of embryo transfer in sheep. 9.th International Congress on Animal Reproduction. A.I.Vol. V.Symposia (6 to 9), 543-547, 16-20 June/Spain-Madrid.
- 70- Richardson,C. (1972): Pregnancy diagnosis in the ewe. Vet.Rec.90, 264-275.
- 71- Riddel,G., Wolfe.D.F., Stringfellow,D.A. (1988): Superovulation of sheep during the spring and summer in the southeastern starter. Theriogenology., 29 (1):297.

- 72- Robertson,H.A. (1977): Reproduction in the ewe and the goat. Ch.18, 475-498. Ed.H.H. Cole and P.T.Cupps. In: "Reproduction In Domestic Animals." Academic Press, New York.
- 73- Salgado,R., Donaldson,L.E. (1984): The effect of intravaginal progesterone on pregnancy rates in cows receiving embryo transfers. *Theriogenology*, 21, 258.
- 74- Sevinç,A., Ilgaz,B. (1982): Ankara keçilerinde kızgınlık, kızgınlık siklusu süreleri ve en uygun tohumlama zamanı. *Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü Derg.*, 22 (1-4): 62-69.
- 75- Slyter,A.L. et al. (1986): Use of controlled photoperiod to induce out-of season breeding in ewes. *Theriogenology.*, 25 (4):609-616.
- 76- Smidt,D., Ellendorf,F. (1969): Zyklische Sexualfunction weiblicher Ziegen. In: *Fortpflanzungs-biologie landwirtschaftlicher Nutztiere.* BLV Verlag gesellschaft München Basel Wien. 158.
- 77- Smidt,D., Ellendorf,F. (1969): Eitransplantation. In: *Fortpflanzungs biologie landwirtschaftlicher Nutztiere.* 244-256. BLV Verlaggesellschaft mbH, München.
- 78- Smith,C.L. (1984): Dose effect of follicle stimulating hormone for superovulation of crossbred targhee ewes, *Theriogenology*, 21, 262.
- 79- Smith,M.C. (1986): The reproductive anatomy and physiology of the female goat. p.577-581. Ed.D.A. Morrow, In: "Current Therapy in Theriogenology." W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- 80- Smith,M.C. (1986): Synchronization of estrus and the use of implants and vaginal sponges. p.582-589. Ed.Morrow, In: "Current Therapy in Theriogenology" W.B. Saunders Co., Philadelphia.

- 81- Stancic, B. (1983): The induction of oestrus and conception rate in Tsigai ewes treated with different hormonal preparations during and outside the breeding season. *Anim. Breed. Abst.* 4036.
- 82- Sugie, T., Seidel, G.E., Hafez, E.S.E. (1980): Embryo transfer. p.569-594. Ed E.S.E. Hafez, In: "Reproduction in Farm Animals." Lea and Febiger., Philadelphia.
- 83- Tervit, H.R. et al. (1974): Application of the egg transfer technique in cattle and sheep. *Proc. NZ. Soc. Anim. Prod.* 34, 56-60.
- 84- Tervit, H.R. et al. (1984): Embryo transfer in Angora and Saanen Goats. *Theriogenology.*, 21:1,269.
- 85- Walker, S.K. et al. (1985): Laparoscopic technique for the transfer of embryos in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 62(3): 105-106.
- 86- Wang, G., MA.B., Wang, J., Qian, J., Zhang, Y. (1988): Embryo freezing and transfer in milk goats. *Theriogenology.*, 29(1): 322.
- 87- Zanwar, S.G., Desphande, B.R. (1984): Response to superovulation in exotic merino polwarth ewes, *Theriogenology.*, 21,277.

9. T E Ő E K K Ü R

Doktora çalışmamın her aşamasında byk yardımlarını grdgm, değerli bilgi ve önerilerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof.Dr.Adem Őennver'e, çalışmalarım sırasında bana yol gösteren yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, Sayın Doç.Dr.İ.Kamuran İleri'ye ayrıca Arş.Gör.Serhat Pabuççuoğlu ile Bilim Dalı'mızda görevli arkadaşlarımın yardımlarından dolayı saygı ve minnettarlık duygularımı arzetmeyi borç bilirim.

10. Ö Z G E Ç M İ Ş

1961 yılında İstanbul'un Beşiktaş ilçesinde doğdum. İlk, Orta ve Lise öğrenimimi İstanbul'da tamamladım.

1985 yılında İ.Ü.Veteriner Fakültesi'nden mezun oldum. Aynı yılın Ağustos ayında İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne doktora öğrencisi olarak kayıt oldum. Kasım ayında da İ.Ü.Veteriner Fakültesi Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Bilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen bu görevi sürdürmekteyim.