

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİSSEPTİNİN KOYUNLARDA BAZI REPRODÜKTİF
PARAMETRELERE ETKİSİ**

MUHAMMED KÜRŞAD BİRDANE

**DOĞUM VE JİNEKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. HACI AHMET ÇELİK**

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından 09.VF.21 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No: 2012-005

2012-AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/06/2012



Prof. Dr. Mehmet GÜLER
Selçuk Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Mehmet UÇAR
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Raportör



Doç. Dr. Hacı Ahmet ÇELİK
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. İbrahim AYDIN
Selçuk Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi MUHAMMED KÜRŞAD BİRDANE'nin "Kisspeptinin Koyunlarda Bazı Reprodüktif Parametrelere Etkisi" başlıklı tezi 15./06/2012 günü saat 11:15.00 Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. İsmail BAYRAM
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bilim adamları, kisspeptin geninin varlığını ve steroidlerin geri bildirim mekanizmasında kayıp bağlantı olarak tanımladıkları kisspeptin sistemini 2000’li yılların başında tespit etmiştir. Bu keşif sonrasında kisspeptin sistemi ile ilgili, Pubmed’te taranan dergilerde 500’ün üzerinde bilimsel makalenin yapılması ve 2012 yılı içerisinde yapılmaya devam edilmesi, bu konunun güncelliğini koruduğunun ispatıdır. Kisspeptin ile diğer moleküler sistemler arasındaki bağlantı tam olarak çözülememiş, özellikle reproduksiyon alanındaki etkileri günümüzde araştırılmaya devam edilmektedir. Bu tezin yapılış amacı koyunlarda kisspeptin’in reproduktif parametreler ile preovulatör LH profiline olan etkilerinin tespit edilmesidir. Hem preovulatör LH profili hem de kisspeptin ile ilgili yapılan çalışmalarda, araştırma modeli olarak kullanılan koyun, bu çalışmada materyal olarak seçilmiştir.

Araştırmada yoğun kan alma zamanları sırasında beni yalnız bırakmayan Veteriner Hekim Mustafa Sayın ve İsmail Berker’e, İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim elemanları Yrd. Doç. Dr. Mustafa Kabu ve Arş. Gör. Durmuş Fatih Başer’e, Patoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Arş. Gör. Hasan Hüseyin Demirel’e, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Arş. Gör. Selahattin Konak’a, Dölerme ve Sun’i Tohumlama Anabilim Dalı öğretim elemanı Fatih Avdatek’e teşekkür ederim. Hormon analizleri sırasında desteğini esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanları Prof. Dr. Şevket Arıkan’a ve Arş. Gör. Dr. Özkan Şimşek’e içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Çizelgeler	vii
Şekiller	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Koyunların Östrüs Siklusu	2
1.1.1. Östrüs Siklusunun Dönemleri	4
1.1.1.1. Folliküler Dönem	4
1.1.1.2. Luteal Dönem	5
1.2. Koyunlarda Folliküler Gelişim Dalgası	6
1.3. Ovulasyon	8
1.4. Koyunlarda Mevsimsel Üreme	12
1.5. Koyunlarda Bazı Hormonların Reprodüksiyon Üzerine Etkileri	13
1.5.1. GnRH	13
1.5.1.1. GnRH'nin Salınımı	14
1.5.2. LH ve FSH	15
1.5.2.1. LH ve FSH'nin Salınımı	16
1.5.3. Progesteron	18
1.5.4. Östrojen	19
1.6. Koyunlarda Östrüs Senkronizasyonları	20
1.6.1. PGF _{2α} ile Senkronizasyon Metodu	21
1.6.2. Progestagenler ile Senkronizasyon Metodu	22
1.7. Kisspeptin	24
1.7.1. Kisspeptinin genel tanımı	24
1.7.2. Kisspeptinin Koyunlarda GnRH/LH Sekresyonu Üzerine Etkisi	26
1.7.3. Kisspeptinin Koyunlarda Pozitif ve Negatif Geri Bildirim Mekanizmasına Etkisi	29
1.7.4. Kisspeptinin Koyunlarda Mevsimsel Üremeye Etkisi	31
1.7.5. Kisspeptinin Koyunlarda Enerji Metabolizması ve Pubertaya Etkisi	33
2. GEREÇ VE YÖNTEM	35
2.1. Gereç	35
2.1.1. Hayvan Materyali	35
2.1.2. Kullanılan Kimyasal	35
2.1.2.1. Kisspeptin	35
2.1.2.2. PGF _{2α}	35
2.1.3. Araştırmada Kullanılan Cihazlar	36

2.2. Yöntem	37
2.2.1. Koyunların Bakım ve Beslenmesi	37
2.2.2. Grupların Oluşturulması ve Senkronizasyon Yöntemi	37
2.2.3. Kan Örneklerinin Toplanması	38
2.2.4. Gebelik Kontrolü	39
2.2.5. Hormon Düzeyinin Belirlenmesi	39
2.2.5.1. Plazma P ₄ Düzeyinin Belirlenmesi	39
2.2.5.2. Plazma E ₂ Düzeyinin Belirlenmesi	40
2.2.5.3. Plazma LH Düzeylerinin Belirlenmesi	41
2.2.6. İstatistiksel Analiz	43
3. BULGULAR	44
3.1. Grupların Reprodüktif Parametreleri	44
3.2. Grupların P ₄ Düzeyleri	45
3.3. Grupların E ₂ Düzeyleri	47
3.4. Grupların LH Düzeyleri	48
3.5. Grupların LH AUC Düzeyleri	50
3.6. Grupların Preovulatör LH Profili	51
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ	66
ÖZET	67
SUMMARY	68
KAYNAKLAR	69

SİMGELER ve KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
AUC	Area Under Curve
ARC:	Arkuat
CIDR	Controlled Internal Drug Release
E ₂	Östradiol
eCG	Kısrak Koryonik Gonadotropini
FGA	Fluorogeston Asetat
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GB	Geri Bildirim
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropini
Kiss 1	Kisspeptin Geni
Kiss1r	Kisspeptin Reseptörü
Kp	Kisspeptin
LH	Luteinleştirici Hormon
MAP	Medroksiprogesteron Asetat
mg	Miligram
MGA	Melengesterol Asetat
ml	Mililitre
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
ng	Nanogram
NGB	Negatif Geri Bildirim
P ₄	Progesteron
pg	Pikogram
PG	Progestagen
PGB:	Pozitif Geri Bildirim
PGF _{2α}	Prostaglandin F ₂ Alfa
POA:	Preoptik Bölge
VKS:	Vücut Kondisyon Skoru

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 3.1. Gruplarda östrüs, gebe kalma, kuzulama, fekundasyon, proliferasyon oranı ve gebelik süresi	44
Çizelge 3.2. Gruplarda -10, 0. gün, 24, 48, 72. saat ve 18, 21. gün P ₄ düzeyleri ve istatistiki önemi	45-46
Çizelge 3.3. Gruplarda 24, 48 ve 72. saatler ile 18. gün E ₂ düzeyleri ve istatistiki önemi	47
Çizelge 3.4. Gruplarda 24, 28, 32, 39, 40.5, 41, 44, 49, 50.5, 51, 55, 60, 64. saat LH düzeyleri ve istatistiki önemi	48-49
Çizelge 3.5. Gruplarda 24, 32, 39, 40.5, 41, 44, 49, 50.5, 51, 55, 60, 64. saat LH AUC düzeyleri istatistiki önemi	50-51
Çizelge 3.6. Gruplarda PO_LH-İlk, PO_LH-Pik, PO_LH-Son, PO_LH-Süre, PO_LH-Pik-ng değerleri ve istatistiki önemi	52

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 3.1. Gruplarda -10, 0. gün, 24, 48, 72. saat ve 18, 21. gün P ₄ Düzeyleri	46
Şekil 3.2. Gruplarda 24, 48 ve 72. saatler ile 18. gün E ₂ düzeyleri	47
Şekil 3.3. Gruplarda 24, 28, 32, 39, 40.5, 41, 44, 49, 50.5, 51, 55, 60, 64. saat LH düzeyleri	49
Şekil 3.4. Gruplarda 24, 32, 39, 40.5, 41, 44, 49, 50.5, 51, 55, 60, 64. saat LH AUC düzeyleri	51
Şekil 3.5. Gruplarda PO_LH-İlk, PO_LH-Pik, PO_LH-Son, PO_LH-Süre, PO_LH-Pik-ng değerleri	52

GİRİŞ

Koyunların et, süt, yapağı ve derisi ile ekonomik önem taşımalarına ve toplam hayvan varlığı içerisinde büyük bir yer tutmalarına rağmen, ülkemizdeki sayısı her geçen gün hızla azalmaya devam etmektedir. Türkiye istatistik kurumu verilerine göre koyun sayısı 1991 yılında 40 milyon başın üzerinde iken, 2010 yılı sonu itibariyle yaklaşık 22 milyon başa kadar gerilemiştir (TÜİK, 2010).

Yüksek döl verimi potansiyeli ile ülke ekonomisine önemli katkısı olan koyunculunun, hem yetiştirici hem de ülke ekonomisini kalkındırmak için yaygınlaştırılması önerilmesine rağmen, mevcut koyun sayısında verim yönünden yeterli bir ilerleme sağlanamamaktadır. Koyunlarda 6-7 aylık bir sürenin üreme açısından inaktif geçmesinden dolayı, koyunların yaşam süresi içerisinde elde edilecek reproduktif verimi arttırmaya yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda genel olarak anöstrüs döneminde ovaryum fonksiyonlarının uyarılması, seksüel siklusların senkronize edilmesi, gebelik ve ikizlik oranını arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Alaçam, 2001).

Koyunların reproduktif fonksiyonu mevsime bağlı olarak değişir ve bu fonksiyonun fizyolojik mekanizmasında melatonin ve gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) etkin bir rol oynar (Rosa ve Bryant, 2003; Simonneaux ve Ribelayga, 2003). Reprodüksiyon için hayati öneme sahip GnRH ile ilgili çok sayıda araştırma yapılsa da, GnRH, gonadal steroidler ve diğer periferel sinyaller arasında bulunan hücresel ve moleküler mekanizmaların işleyişi günümüzde halen daha tam olarak aydınlatılamamıştır (Caraty ve Franceschini, 2008; Chu ve ark., 2009; Wakabayashi ve ark., 2010). Reprodüksiyon ile ilgili, bu nöral sinyaller arasındaki etkileşim üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, 2003 yılında kisspeptin (Kp) adlı peptidin GnRH sekresyonunu kontrol etmedeki rolünün keşfedilmesi, reproduksiyon ve nöroendokrinoloji alanında yeni çalışmaların önünü açmıştır (Roa ve Tena-Sempere, 2007).

Reproduksiyon alanında ilk olarak pubertanın kontrolünde önemi belirlenen Kp'nin, başta luteinleştirici hormon (LH) ve azda olsa follikül uyarıcı hormon (FSH) salınımı artışına yol açtığı tespit edilmiştir (Smith, 2009; Clarke, 2011). Koyunlarda bir dizi Kp uygulamasının anöstrüs ve üreme döneminde preovulatör LH dalgasını tetiklemesi nedeniyle, başta ovulasyon senkronizasyonu olmak üzere reproduksiyon alanında başarılı bir şekilde kullanılabilceği ön görülmektedir (Caraty ve Franceschini, 2008).

1.1. Koyunların Östrüs Siklusu

Mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olan koyunların, ülkemizin de bulunduğu kuzey yarım kürede, gün ışığı süresinin kısa olduğu sonbahar ve kış aylarında seksüel aktivitesi harekete geçerken (üreme dönemi), gün ışığı süresinin uzun olduğu diğer mevsimlerde ise seksüel aktivitesi durağan hale (anöstrüs dönemi) geçmektedir (Gordon, 1997). Her ne kadar östrüs davranışları ve ovulasyon sadece üreme döneminde gözükse de, folliküler büyüme ve regresyon gibi aktiviteler, anöstrüs döneminde de meydana gelmeye devam etmektedir (Bartlewski ve ark., 2011).

Östrüs siklusu; hipotalamus'ta üretilen GnRH, hipofiz bezinden salgılanan FSH, LH ve oksitosin, antral folliküllerden salgılanan östradiol (E_2) ve inhibin, korpus luteum (CL)'dan salgılanan progesteron (P_4) ve oksitosin, uterus endometriyum'unda üretilen prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)'nın hiyerarşik bir düzen içerisinde hareket etmelerine bağlı olarak gerçekleşmektedir (Bearden ve Fuquay, 2000; Hafez, 2000; Pineda, 2003).

Dişi kuzular 6-9 aylık iken pubertaya ulaşır. Irk ve mevsime göre değişen östrüs siklus uzunluğu (14-21 gün) ortalama 17 gün sürmektedir. Siklusun ilk 12-14. günleri P_4 üretiminin gerçekleştiği luteal dönem, luteal P_4 üretiminin azaldığı siklusun son 3-4 günü ise, folliküler dönem olarak sınıflandırılmaktadır (Kalkan ve Horoz, 2001; Pineda, 2003).

Reproduktif siklus'un devamlılığında hayati önem taşıyan follikül gelişimi, steroidojenik aktivite, ovulasyon ve CL'un formasyonu için, FSH ve LH salınımının belli düzeylerde gerçekleşmesi gerekmektedir (Goodman ve Inskeep, 2006; Bartlewski ve ark., 2011). Gonadotropin salgı mekanizmasını düzenleyen bir takım iç ve dış faktörler bulunmaktadır. İç faktörlerin bazıları lokal üretilen aminoasitler, peptid ve protein yapıları hormonlar, ovarial steroidler, inhibin, aktivin ve follistatin gibi folliküler hormonlar, nörotransmitterler, nöromodülatörler ve uterus'ta üretilen hormonlardır. Dış faktörlerin bazıları ise fotoperiyodik sinyaller, erkek feromonları, bakım, besleme ve stres gibi faktörlerdir (Pineda, 2003; Senger, 2003; Ciechanowska ve ark., 2010; Christian ve Moenter, 2010; Bartlewski ve ark., 2011; Clarke, 2011; Sejian ve ark., 2011).

Gonadotropin salgılatıcı hormon, FSH ve LH'in sekresyonunu uyararak salınımlarını kontrol altında tutmaktadır. Follikül uyarıcı hormon ve LH ovaryumda bulunan spesifik hücreleri etkileyerek, siklusun dönemine göre folliküllerden E₂, CL'dan ise P₄ üretiminin gerçekleşmesinde etkin bir rol oynamaktadır (Senger, 2003; Goodman ve Inskeep, 2006).

Progesteron ve E₂, GnRH, LH ve FSH sekresyonu gerçekleştiren hücreler üzerine pozitif geri bildirim (PGB) ve negatif geri bildirim (NGB) sinyalleri oluşturarak östrüs siklusunun kontrol mekanizmasında önemli bir yer tutmaktadır (Senger, 2003). Sinir ve endokrin sistemin uyum içinde hareket etmesine bağlı olarak gerçekleşen bu sinyallerin gonadal, hipotalamus ve hipofiz fonksiyonların devamlılığı için gerekli olduğu belirtilmektedir (Harris ve ark., 1999; Christian ve ark., 2008).

Reproduktif siklusun büyük bölümünde ovaryumlardan salgılanan E₂ ve P₄, hipotalamus ve hipofiz üzerinde NGB'e yol açması GnRH, FSH ve LH salınımını belirli bir düzeyin altında tutmaktadır (O'Callaghan, 1999). Ancak geç folliküler dönemde folliküllerin E₂ üretim kapasitesindeki artış, dolaşımdaki E₂ düzeyinin yükselmesi, NGB'in PGB'e dönüşmesini sağlayarak, dolaşımda GnRH, LH ve FSH

artışını gerçekleştirecek uyarımlara yol açmaktadır (Foradori ve ark., 2005; Goodman ve Inskeep, 2006). Gonadotropin salgılatıcı hormon ve LH düzeylerinin ani bir şekilde artarak dolaşımında pik düzeye ulaşması neticesinde ise ovulasyon gerçekleşmektedir (Batailler ve ark., 2004; Christian ve ark., 2008).

1.1.1. Östrüs Siklusunun Dönemleri

Koyunların östrüs siklusu folliküler ve luteal olmak üzere 2 döneme ayrılmaktadır. Proöstrüs ve östrüs evreleri siklusun folliküler dönemini, metöstrüs ve diöstrüs evreleri ise luteal dönemini oluşturmaktadır. Folliküler dönem, CL'un regresyonu ile ovulasyon, luteal dönem ise ovulasyon ile CL'un regresyonuna kadar olan dönemi kapsamaktadır (Kalkan ve Horoz, 2001; Pineda, 2003).

1.1.1.1. Folliküler Dönem

Hızlı folliküler gelişimi ve E₂ düzeyi yükselmesinin görüldüğü evre olan proöstrüs, 2-3 gün kadar sürmektedir. Dolaşımında luteal regresyona bağlı olarak P₄ düzeyinin azalışı, folliküler büyümeye bağlı olarak ise E₂ düzeyinin artışı görülmektedir. Östrojen artışının sürekliliği, genital organlarda kan akımı artışına ve reproduktif organlarda bir takım değişikliklere neden olmaktadır (Kalkan ve Horoz, 2001; Pineda, 2003).

Östrüs koyunun çiftleşmeyi kabul ettiği evredir ve ortalama 26 saat (20-36 saat) sürmektedir. Östrüsün başlaması, P₄ düzeyinin düşmesi, LH ve FSH'nin salınım sıklığının artması ve folliküler E₂ üretiminin artışına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Üreme döneminin başında ve sonunda 3-6 saat kadar kısa süren östrüsler görülebilmektedir. Östrüs süresi, ovulasyon oranı yüksek olan ırklarda daha uzun sürer, yaş ve mevsime göre değişkenlik gösterebilmektedir (Pineda, 2003). Ayrıca koç feromeni etkisine göre de değişerek, sürekli koç ile temas halinde olan koyun,

belli aralıklarla temas içerisinde olan koyuna göre daha kısa süren östrüs davranışı gösterebilmektedir (Ekiz ve ark., 2009).

Koyunlarda genelde koyunun koça karşı pasif olması, vulva ödemi ve çaranın nadiren görülmesinden dolayı östrüs tespiti güçtür (Gordon, 1997). Vajinal mukusun elektriksel direnci östrüste 40 Ω 'dan düşük iken ovulasyon sonrasında yükselerek 40 Ω 'un üzerine çıkmaktadır. En önemli östrüs belirtisi koyunun koç altında durarak çiftleşmesidir (Gordon, 1997; Baby ve Bartlewski, 2011).

1.1.1.2. Luteal Dönem

Ovulasyon sonrası CL'un şekillenmeye başladığı evre olan metöstrüs evresi, 2-3 gün kadar sürmektedir. Luteinleştirici hormon'un etkisiyle granuloza ve teka hücrelerinin hızlı bir şekilde luteinize olması sonrasında P_4 üretme kapasitesinde artış meydana gelir (Kalkan ve Horoz, 2001; Pineda, 2003).

Östrüs siklusunun en uzun evresi olan diöstrüs ise 12-14 gün kadar sürer. Bu evrede CL'un büyüme ve regrese olma hızına göre dolaşımda düzeyi değişen P_4 hormonu diğer hormonlara göre daha baskındır. Korpus luteum'da aktif olarak P_4 üretimi, siklusun 3-5. günlerinde başlar ve ortalama 8. günde pik düzeye ulaşır (Kalkan ve Horoz, 2001; Pineda, 2003).

Ovulasyon sonrası 3-5 gün içerisinde artan P_4 düzeyi, $PGF_{2\alpha}$ 'nın erken salınımını baskılayarak luteal dönemin normal sürede devam etmesini sağlamaktadır. Salınan P_4 etkisiyle endometriyum bezlerinden, embriyonun uterusu tutunması ve beslenmesi için gerekli olan uterus sekresyonu gerçekleşmektedir. Gebelik şekillendikten sonra, gebeliğin 10. gününde embriyonal hücrelerden interferon tau (IFN- τ) salınımı başlar ve gebeliğin 12-14. gününde salınımının artış göstermesi ile gebeliğin maternal tanınması gerçekleşir. Gebeliğin maternal tanınması ile IFN- τ oksitosin reseptör ekspresyonunu ve $PGF_{2\alpha}$ salınımını baskılar. Gebelik

şekillenmemiş ise siklusun 12-13. günlerinde $PGF_{2\alpha}$ salınım sıklığının artması sonucunda, luteal regresyon hızına paralel olarak dolaşımdaki P_4 düzeyi düşer (Bazer ve ark., 1997; Spencer ve ark., 2004; Green ve ark., 2005).

1.2. Koyunlarda Folliküler Gelişim Dalgası

Kuzular doğduklarında ovaryumlarında yaklaşık 100-200 bin kadar follikül bulunmaktadır. Bu folliküller ovulasyon öncesinde büyüyerek sırasıyla primer, sekonder ve tersiyer (antral) follikül halini alır ve yaşam boyu çok az follikül ovule olurken pek çoğu sayılan gelişim dönemlerinde atresi olur (Evans, 2003).

Koyunlarda antral folliküller, belli aralıklarla bir birini takip eden folliküler gelişim dalgası ile büyümektedir. Küçük follikül (2-3 mm) havuzundan 1-3 adet follikülün açığa çıkması ve regresyon (anovulatör dalga) veya ovulasyon (ovulatör dalga) öncesi çapa (≥ 5 mm) kadar büyümesi folliküler gelişim dalgası olarak tanımlanmaktadır (Ginther ve ark., 1995; Bartlewski ve ark., 2000a; Driancourt, 2001; Duggavathi ve ark., 2004; Menchaca ve Rubianes, 2004a). Anöstrüs döneminde de folliküler dalganın açığa çıktığı, 1-4 adet küçük follikül'ün (2-3mm) regresyon veya ovulasyon öncesi çapa (≥ 5 mm) kadar büyüebilmekte ve her 3-5 günde bir küçük folliküler içererisinden bir veya daha fazla antral follikül büyüyerek ovulasyon veya regresyon öncesi çapa ulaşabilmektedir (Bartlewski ve ark., 1998; Bartlewski ve ark., 1999a; Evans ve ark., 2000; Baby ve Bartlewski, 2011).

Yeni bir folliküler dalganın açığa çıkması genel olarak bir önceki folliküler dalganın antral folliküllerinin aktif büyümesinin durması veya regrese olmasına bağlı olarak gerçekleşir (Bartlewski ve ark., 1999a; Evans ve ark., 2000; Toosi ve ark., 2010a). Her folliküler dalganın açığa çıkması için 3-4 günde bir FSH artışının gerçekleşmesi gerekmektedir (Ginther ve ark., 1995; Bartlewski ve ark., 1999b; Driancourt, 2001; Toosi ve ark., 2010b).

Döstrüs döneminde FSH ve LH'nin bazal düzeyde salınması, folliküler büyümenin devamlılığını sağlasa da, P₄ düzeyinin yüksek ve LH salınım sıklığının yetersiz olması nedeniyle follikülerin ovule olabilecek çapa ulaşması sınırlandırılmaktadır. Anöstrüs döneminde de folliküler dalga gelişiminin açığa çıkması için LH salınımının gerekli olduğu belirtilmektedir (Seekallu ve ark., 2010b). Folliküler dalga, gebelik dönemi boyunca da açığa çıkar ancak CL'un folliküler gelişimi baskılayıcı etkisinden dolayı folliküller en fazla 3-5 mm çapa kadar büyüebilmektedir (Driancourt ve ark., 2000).

Folliküler gelişimin erken evresinde preantral folliküllerin teka hücrelerinde LH, granuloza hücrelerinde ise FSH reseptörleri bulunmasına rağmen bu folliküllerin 1-2 mm çapa kadar büyümelerinin FSH ve LH'tan bağımsız bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Koyunlarda çapı 3.9 mm'ye ulaşan follikül'ün granuloza hücrelerinde de LH reseptör ekspresyonu gerçekleşmektedir (Logan ve ark., 2002). Folliküller 2-3 mm çapı geçebilmesi için daha çok FSH, en büyük çapa ve en son olgunluğa ulaşabilmesi için ise daha çok LH'a gereksinim duymaktadır. Progesteron düzeyinin düşük olduğu ve LH salınım sıklığının arttığı ilk ve son folliküler dalgada gelişen en büyük follikül'ün çapı, orta luteal dönemin folliküler dalgasında gelişen folliküllerin çaplarına göre daha büyük olduğu belirtilmektedir (Seekallu ve ark., 2010a).

Koyunlarda follikül gelişimi, FSH/LH'tan bağımsız (yavaş büyüme evresi) ve FSH/LH'a bağlı şekilde (hızlı büyüme evresi) iki dönemde gerçekleşir. Büyük follikül'ün yaşam süresi, maksimum çapa ulaştığı büyüme evresine, büyüme evresinin bitişi ve regresyon evresinin başladığı süreç olan statik evresine ve en küçük follikül çapının kaydedildiği regresyon evresine bağlı olarak değişmektedir. Koyunlarda dalga sayısı mevsim, ırk ve vücut kondüsyon skorundan etkilenebilir. Ancak açığa çıkacak olan folliküler gelişim dalga sayısını belirleyen mekanizma günümüzde halen daha tam olarak aydınlatılamamıştır (Vinoles ve ark., 2002; Seekallu ve ark., 2010b).

Üç adet folliküler gelişim dalga sayısı tespit edilen koyunlarda (ovulasyon 0.gün) 0, 6, 10. günlerde, dört adet folliküler gelişim dalga sayısı tespit edilen koyunlarda ise 0, 4, 8 ve 12. günlerde folliküler gelişim dalgası açığa çıkmakta ve folliküler dalga sayısı östrüs siklus uzunluğunu genelde değiştirmemektedir (Toosi ve ark., 2009, Seekallu ve ark., 2010b).

1.3. Ovulasyon

Östrüs siklusunun düzeni için belli aralıklarla ovulasyonun gerçekleşmesi gerekmektedir (Harris ve ark., 1999). Ovulasyon, follikül'ün patlayarak olgunlaşan oosit'in follikül'den dışarı atılması olarak tanımlanmaktadır (Pineda, 2003). Kuzularda ilk ovulasyonun 28-35 haftalık yaşlarda olduğu bildirilmektedir (Rawlings ve ark., 2003).

Ovulasyon zamana bağlı olarak, steroidler ve peptidlerin yer aldığı lokal faktörler ile preovulatör LH dalgası arasındaki dinamik bir etkileşimin sonucunda gerçekleşir. Folliküler dönemde dolaşımda E₂ düzeyinin artışı hipotalamus ve hipofiz bölgesine PGB yaparak, hem portal dolaşıma GnRH salınımı hem de gonadotropların GnRH'a cevap verme yeteneğini artırarak preovulatör LH dalgasının açığa çıkmasını sağlar. Preovulatör LH dalgasına paralel olarak LH düzeyi bazal düzeyin üzerine çıkarak pik düzeye ulaştıktan sonra dalga süresinin uzunluğuna göre tekrar bazal düzeye inmektedir (Moenter ve ark., 1990; Hamernik ve ark., 1995; Christian ve ark., 2010).

Preovulatör LH piki, ovulatör follikül'ün patlayarak oositin atılması ve CL'un oluşması gibi bir dizi olayların meydana gelmesi için gereken yapısal ve biyokimyasal mekanizmaları harekete geçirmekte ve ovulatör follikül'ün teka ve granuloza hücrelerinde bir takım değişikliklere neden olmaktadır (Acosta ve ark., 2004; Siddiqui ve ark., 2010). Preovulatör LH piki; üremenin devam edebilmesi için hayati öneme sahiptir. Oositin maturasyonu, kumulus ekspansiyonu, follikül duvarının yırtılması ve oositin dışarı atılmasını sağlayan pek çok genin ve LH

sinyallerini oosite taşıyan büyüme faktörlerinin aktivasyonunu uyarır (Ndiaye ve ark., 2005; Li ve ark., 2009; Christian ve Moenter, 2010, Zamah ve ark., 2010).

Preovulatör follikül'ün ovule olabilmesi için yeteri düzeyde LH ve FSH reseptörlerini taşıması gerekmektedir. Folliküller büyüdükçe E₂ üretim kapasitesinin artmasına paralel olarak, folliküler hücrelerde LH ve FSH reseptör ekspresyon artışı gerçekleşir. Östrüs siklusunun bu safhasında dolaşımdaki E₂ artışı, GnRH'ın ani salınımına yol açarak, ovulasyon için zorunlu olan FSH ve LH artışını uyarır (Christian ve Moenter, 2010). Üreme dönemi başlangıcında P₄'un yetersiz düzeyde olmasına bağlı olarak, ilk ovulasyon östrüs davranışlarından yoksun bir şekilde gerçekleşebilmektedir. Üreme döneminde gerçekleşen son CL'un regresyonundan sonra GnRH ve LH salınım sıklığı artmazken, anöstrüs döneminden üreme dönemine geçiş periyodunda hipofizer aktivite artarak GnRH ve LH salınım sıklığında artış görülmektedir. Bunun sonucunda ovulasyon için gerekli uyarımlar aktif hale gelmektedir. Bu nedenle anöstrüs döneminde LH salınım sıklığının azalmasına bağlı olarak, preovulatör E₂ artışı, östrüs davranışları ve ovulasyon gerçekleşmemektedir (Pineda, 2003).

Ovulasyon sürecindeki preovulatör folliküllerde 3 önemli değişiklik meydana gelir. Bunlar; oositin stoplazmik ve nükleer olgunlaşması, granuloza hücre katı arasında kumulus hücre bağlantılarının tahribatı ve dış folliküler duvarın incilmesi ve yırtılması şeklinde sıralanmaktadır (Hafez, 2000). Folliküller prostaglandin ovaryum kontraksiyon artışını sağlayarak follikül duvarı ile bazal laminayı eriten proteolitik enzimlerin salınımı ve tekal fibroblastların proliferasyonunu uyarmaktadır (Hafez ve ark., 2000; Li Q ve ark., 2009).

Folliküler gelişim ve ovulasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için ovaryum'da fonksiyonel bir dolaşım ağına gereksinim duyulmaktadır. Preovulatör follikül'ün teka tabakasında kılcıl damar ağları gelişerek granuloza tabakasına kadar ulaşır. Böylece besinler ve hormonlar kılcıl damar ağları sayesinde diffüzyon yolu ile granuloza hücrelerine taşınır. Preovulatör follikül'ün gelişimi için gerekli olan

hormonal ve biyokimyasal ihtiyaçlarının çoğalmasi nedeniyle teka tabakasinda kan akışı da artar (Acosta ve ark., 2004).

Kan akışının ovulatör follikül'ün apeksinde azalırken tabanında artması follikül'ün patlamasına kolaylık sağlamaktadır. Ovulasyon anı yaklaştıkça hem follikül içi basıncın artması hem follikül duvarındaki bağ dokunun iyice bozulması follikül'ün patlamasına yol açmakta ve oositin atılmasıyla ovulasyon gerçekleşmektedir (Goodman ve Inskeep, 2006).

Koyunlarda ovulasyon, spontan olarak şekillenmekte ve çoklu ovulasyonlar görülebilmektedir. Koyunlarda ovulasyon oranı ırk, beslenme, yaş, mevsim ve hormon uygulamalarına göre değişebilmektedir (Scaramuzzi ve ark., 1983; Lincoln, 1992, Gibbons ve ark., 1999; Vinales ve ark., 1999). Preovulatör LH piki, ovulasyon zamanını düzenleyen en önemli etkenler arasında yer almaktadır. Koyunlarda ovulasyon, LH pikinden yaklaşık 10 saat sonra gerçekleşmektedir (Kalkan ve Horoz, 2001; Yıldız ve ark., 2003; Contreras-Solis ve ark., 2009a).

Olgunluğa ulaşarak ovule olacak follikül sayısını belirleyen faktörler halen günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak follikül büyüme faktörleri, inhibin, aktivin ve follistatin gibi pek çok lokal peptid hormonların birbirleri ile etkileşimi, başta follikülerin FSH ve LH'a olan duyarlılığı olmak üzere ovulasyon için gerekli pek çok faktörü etkilemektedir (Campbell ve ark., 1999).

Koyunlarda ovulasyon oranını etkileyen spesifik genler belirlenmiştir. Bu genleri taşıyan koyunların dolaşımdaki FSH ve LH düzeyleri, genleri taşımayan koyunlara göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (McNatty ve ark., 1987; Bartlewski, 1999a). Oositler tarafından ekspresyonu gerçekleştirilen GDF9, BMP15 ve ALK6 isimli büyüme faktörlerinin genlerinde gerçekleşen mutasyonların ırklar arasındaki ovulasyon oranlarını belirlediği düşünülmektedir (McNatty ve ark., 2007; Javanmard ve ark., 2011; Scaramuzzi ve ark., 2011).

Ovulasyon oranı yüksek olan koyunların, genelde plazma FSH ve LH düzeylerinin yüksek, steroid düzeylerinin ise düşük olduğu ve E₂'ün oluşturduğu NGB ve PGB sinyallerine karşı daha az duyarlı oldukları belirtilmektedir (Hamadeh ve ark., 1989; Ben Said ve ark., 2007). Bu koyunların bazal LH düzeyleri ve LH salınım sıklığı diğer koyunlara göre daha yüksek düzeyde olduğu bildirilmektedir (Rhind, 1986; Atkinson ve ark., 1989). Bununla beraber E₂ düzeyi, büyüyen follikül sayısı ile bağlantılı olduğundan, yüksek ovulasyon oranına sahip ırkların preovulatör LH piki öncesi E₂ düzeyi, diğer ırklara göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Cahill ve ark., 1981). Bu ırkların E₂ düzeyinin yüksek olmasına rağmen, luteal regresyon hızının düşük olmasına bağlı olarak preovulatör LH dalgası biraz daha geç başlamaktadır (Bindon ve ark., 1979). Preovulatör LH piki sonrası P₄ düzeyi diğer ırklara göre daha erken yükselmekte ve erken yükselen P₄ düzeyi sayesinde ayrıca gebe kalma oranını ve embriyo gelişimi pozitif yönde etkilenmektedir (Fair ve ark., 2007).

Ovulasyon oranı düşük ırklarda her siklusta 1-3 adet follikül ovule olurken, ovulasyon oranı yüksek ırklarda çoğunlukla 3 veya daha fazla follikül ovule olabilmekte ve ovulasyonlar arasında yaklaşık iki saatlik bir zaman dilimi bulunmaktadır (Bartlewski ve ark., 1999a; Kalkan ve Horoz, 2001). Koyunlarda ovulatör folliküller son folliküler gelişim dalgadan köken alsa da, yüksek ovulasyona sahip ırklarda ovulatör folliküller sondan bir önceki folliküler dalgadan da köken alabilmekte, follikül çapını koruyabilmekte ve son folliküler dalgadaki ovulatör folliküllerin arasına katılabilmektedir (Bartlewski ve ark., 1999a; Gibbons ve ark., 1999). Bu koyunların hem folliküler büyüme evresinin daha kısa olduğu hem de folliküller'in ulaşabileceği maksimum çapın daha küçük olduğu belirtilmektedir (Toosi ve ark., 2010a).

1.4. Koyunlarda Mevsimsel Üreme

Canlılarda çok sayıda türün reproduktif fonksiyonu mevsime göre değişkenlik göstermektedir. Mevsimsel üremenin kontrol mekanizması halen bilimsel güncelliğini korumaktadır. Gün ışığı alım süresi olan fotoperiyot'un, kısa olduğu mevsimlerde pineal bezden melatonin salınımının artması ve fotoperiyot'un uzun olduğu mevsimlerde ise melatonin salınımının azalması, mevsime bağlı üremenin kontrol mekanizmasında önemli bir yer tutmaktadır (Simonneaux ve Ribelayga, 2003; Rosa ve Bryant, 2003).

Koyunlarda melatonin karanlıkta salgılandığından dolayı fotoperiyot'un kısalmasına bağlı olarak dolaşımda melatonin düzeyi artar. Fotoperiyot'un kısalması sonucunda melatonin seviyesinin FSH/LH'ı uyuracak düzeye çıkması ile reproduktif aktivite uyarılarak, anöstrüs döneminden üreme dönemine geçiş gerçekleşir (Goodman ve Inskeep, 2006; Goodman ve ark., 2010). Ancak hangi hücrelerin melatonin reseptörleri taşıdığı ve bu hücrelerin mevsime bağlı olarak nasıl değiştiklerinin tam olarak anlaşılabilmesi, bu mekanizmanın tam olarak aydınlatılmasını zorlaştırmaktadır (Revel ve ark., 2007; Clarke ve ark., 2009a). Yıl içerisindeki fotoperiyotik bilgiler retinal fotoreseptörler tarafından algılanılarak suprakiazmatik nükleus, paraventrikulus nükleus ve superior servikal ganglion tarafından pineal beze nöral sinyaller olarak iletilerek burada endokrin sinyallere dönüşerek melatonin sekresyonu düzenlenmektedir (Simonneaux ve Ribelayga, 2003).

Koyunlarda E_2 'ün LH salınım sıklığına olan etkisinin hipotalamus, hipofiz ve ovaryal ekseninde meydana gelen mevsimsel değişikliklerdeki en kritik nokta olduğu belirtilmektedir. Hipotalamus'un retrokiazmatik bölgesinde lokalize olan dopaminerjik nöronlar, E_2 'ün NGB'ne aracılık ederek mevsimsel üremede anahtar rol oynamaktadır. Östradiol'ün anöstrüs döneminde dopaminerjik nöronları uyarırken, üreme döneminde uyarmaması sonucunda, üreme döneminde E_2 'ün LH salınımlarına yönelik uzun süren NGB etkisi kaybolmaktadır (Clarke ve ark., 2009a; Smith ve Clarke, 2010).

1.5. Koyunlarda Bazı Hormonların Reprodüksiyon Üzerine Etkileri

1.5.1. GnRH

Hipotalamusta üretilen GnRH, hipofizin gonadotrop hücrelerinden FSH ve LH salınımını düzenlemektedir. Memelilerde seksüel maturasyon ve üremeden sorumlu ana düzenleyici hormon olan GnRH'nin sekresyonunu yapan nöronların aktivasyonu sonucu puberta başlamaktadır (Clarke, 2011). Bu işlevini gonadotroplarda mevcut olan G proteinlere kenetli GnRH reseptörlerine bağlanarak yerine getirir (Senger, 2003, Ciechanowska ve ark., 2010; Clarke, 2011). Gonadotropin salgılatıcı hormon hem follikülerde hem de plazmada, eş zamanlı olarak LH ve östradiol artışına yol açmaktadır (Acosta ve ark., 2004).

Memelilerde GnRH-I ve GnRH-II olmak üzere iki çeşit GnRH gen ekspresyonu görülmektedir. Çoğunlukla hipotalamusta ekspresyonu gerçekleşen GnRH-I peptidi gonadotropin fonksiyonlarını düzenlerken, GnRH-II daha çok beynin dışındaki bölgelerde ekspresyonu gerçekleşmektedir (Ramakrishnappa ve ark., 2005).

Gonadotropin salgılatıcı hormon nöronlarında, gonadotropin salınımında rol oynayan E_2 reseptör alfa ($ER\alpha$) ve P_4 reseptör (PR) ekspresyonlarının gerçekleşmemesinden dolayı sex steroidleri ve GnRH sekresyonu arasındaki sinyalizasyon mekanizmasında farklı nöronların aracılık ettiği düşünülmektedir. Koyunlarda $ER\alpha$ reseptörü bulunan hücrelerde, potansiyel nörotransmitterler arasında başlıca GABA, glutamat, nörokinin B, dinorfin ve Kp yer almaktadır (Clarke ve ark., 2009b; Smith ve Clarke, 2010).

1.5.1.1. GnRH'in Salınımı

Gonadotropin salgılatıcı hormon salınımı, steroidlere bağımlı ve bağımsız olmak üzere 2 şekilde gerçekleşmektedir. Anöstrüs döneminde E₂'ün NGB etkisiyle GnRH sekresyonunu inhibe etmesi steroidlere bağımlı, ovariectomi sonrasında LH düzeyinin beklenmedik bir şekilde düşük olması ise steroidlerden bağımsız olarak salınımının gerçekleştiğini göstermektedir (Goodman ve ark., 2010).

Gonadotropin salgılatıcı hormon ve dolayısı ile LH, tonik ve preovulatör olmak üzere iki şekilde salınmaktadır. Tonik merkez, beynin ARC ve ventromedial nükleus, preovulatör merkezi ise POA, suprakiazmatik nükleus ve anterior hipotalamik bölgelerde bulunan nöronlar tarafından kontrol edilmektedir. Tonik merkez bazal düzeyde GnRH salınımını, preovulatör merkez ise preovulatör GnRH salınımını kontrol etmektedir (Martin ve ark., 1987; Senger, 2003; Goodman ve Inskeep, 2006).

Belirli zaman aralıklarında oluşan salınım sıklığı (pulsasyon frekansı) ve salınım sırasındaki GnRH/LH düzeyindeki artış (amplitüd) nöral aktivitenin derecesine göre değişkenlik göstermektedir (Karsch ve ark., 1997; Al-Gubory ve ark., 2003). Dolaşımında E₂ artışının hipotalamus üzerine pozitif etki yapması, belirli zaman diliminde gerçekleşen GnRH salınım sıklığında ve düzeyinde artışa yol açarak preovulatör GnRH/LH salınımına neden olmaktadır (Christian ve Moenter, 2010).

Koyunlarda hem P₄ hem de E₂'ün, NGB etkisine bağlı olarak östrüs siklusunun çoğu döneminde GnRH salınımını baskılamaktadır. Genel olarak P₄, LH salınım sıklığını, E₂ ise düzeyini düşürerek negatif etki oluşturmaktadır (Foradori ve ark., 2005). Tonik GnRH salınımları, orta luteal dönemde düşük sıklıkta, luteolizis sonrasında ise yüksek sıklıkta gerçekleşmektedir. Preovulatör merkez, PGB oluşuncaya kadar bazal düzeyde GnRH salınımı gerçekleştirirken, PGB oluşunca, büyük miktarda GnRH salınımı gerçekleştirerek preovulatör LH pikine yol açmaktadır. Bu dönemde GnRH düzeyi artarak bazal düzeyin 20-40 katına kadar

yükselmektedir. Luteal dönemde günde 6 GnRH salınımı görülürken, preovulatör dönemde salınım sayısı artarak günde 24 salınımına kadar çıkabilmektedir (Moenter ve ark., 1991; Goodman ve Inskeep, 2006).

Progesteron hem tonik hem de preovulatör merkez üzerine negatif etki gösterse de, tonik merkez P₄'un negatif etkisine daha duyarlı iken preovulatör merkez E₂'ün pozitif bildirimlerine daha duyarlıdır. Progesteron direkt olarak hipotalamusta E₂'e yanıt veren hücrelerin aktivitesini durdurarak preovulatör GnRH ve LH artışını engelleyebilmektedir (Richter ve ark., 2005). Üreme döneminde P₄, GnRH salınım sıklığını baskılayan en önemli hormondur. Anöstrüs dönemine geçiş sırasında GnRH salınım sıklığını kontrol etmede E₂, P₄'e göre daha etkin rol oynamaktadır (Senger, 2003; Goodman ve Inskeep, 2006).

Gonadotropin salgılatıcı hormon salınım sıklığı, LH ve FSH salınımını düzenlemektedir. Düşük GnRH salınım sıklığı FSH salınımını uyarırken yüksek salınım sıklığı ise LH salınımını uyarmaktadır (Molter-Gerard ve ark., 1999). Her ne kadar LH artışı GnRH salınımları ile paralellik gösterse de, FSH kısmi olarak GnRH salınımını ile paralellik göstermektedir. Luteal ve anöstrüs döneminde LH'tan farklı olarak FSH'ın pulsatil tarzda salınmaması, GnRH'ın FSH ve LH sekresyonunu farklı bir şekilde düzenlendiğini göstermektedir. Folliküler dönemde, GnRH salınım sıklığının azalması FSH düzeyini ve aktivitesini arttırarak folliküler gelişmeyi uyarırken, preovulatör dönemde GnRH salınım sıklığının artması hem FSH hem de LH salınımı için tetikleyici bir etki oluşturmaktadır (Wallace ve ark., 1986; Clarke ve ark. 1986; Goodman ve Inskeep, 2006).

1.5.2. LH ve FSH

Koyunlarda LH'ın moleküler ağırlığı yaklaşık 30,000 dalton, FSH ise yaklaşık 32,000 dalton ağırlığındadır. Luteinleştirici hormon ve FSH glikoprotein yapılıdır ve % 13 ile %25 oranında karbonhidrat içermektedirler. Canlılarda FSH ve LH, α ve β alt sınıflara ayrılmaktadır. Alfa alt sınıfı diğer glikoprotein hormonlar ile benzer

özellik gösterirken, β alt sınıfı her hormon için farklı yapıda bulunarak biyolojik aktivite için belirleyici rol oynamaktadır. Adenohipofiz'de bulunan hücreler bazofilik ve asidofilik olarak ayırt edilmektedir. Bazofilik hücreler tarafından üretilen FSH ve LH, aynı gonadotrop hücreler içerisinde bulunabilir (Pineda, 2003; Andersson, 2008).

Folikül uyarıcı hormon ve E_2 birlikte granuloza hücrelerinde LH reseptörlerinin oluşmasını uyarmaktadır. Folikül uyarıcı hormon tek başına ovaryumdan E_2 sekresyonunu tetikleyemediğinden E_2 üretimi için LH'nin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır (Bearden ve Fuguay, 2000; Goodman ve Inskeep, 2006).

Luteal dönemde E_2 yükselişi görülür ancak bu dönemde P_4 düzeyinin yüksek olmasına bağlı olarak E_2 'ün hipotalamus üzerine yapacağı PGB sinyali oluşmaz (Christian ve ark., 2008; Christian ve Moenter, 2010). Preovulatör LH dalgasının başlamasına yakın bir zamanda uygulanan P_4 'ün, LH artışını ve pikini engellemesi, preovulatör LH dalgasının başlaması için, P_4 düzeyinin NGB oluşturmayacak düzeyin altına düşmesi gerektiğini göstermektedir (Harris ve ark., 1999).

Ayrıca preovulatör dönemden bir gün önce yetersiz LH salgınım sıklığına maruz bırakılan koyunların, preovulatör dönemde ki E_2 düzeyi ve fertil oosit sayısının düşük olduğu tespit edilmiş ve bu nedenle ovulasyon öncesi oosit olgunlaşmasının son aşamasını başlatmak için, preovulatör LH ve FSH artışının gerekli olduğu bildirilmiştir (Oussaid ve ark., 1999).

1.5.2.1. LH ve FSH'un Salınımı

Siklus boyunca tonik LH sekresyonunun pulsatil tarzda olması, ovaryal steroidogenesis, preovulatör LH artışı ve CL'un formasyonu için gerekli olduğu belirtilmektedir (Quintal-Franco ve ark., 1999). Tonik ve preovulatör LH sekresyonu hipotalamus'ta bulunan farklı nöronlar tarafından kontrol edilmektedir. Tonik LH ve FSH düzeyleri

çoğunlukla steroidlerin NGB ve PGB etkisi ile kontrol edilmektedir. Luteinleştirici hormon reproduktif siklus boyunca belli aralıklarla salınımı gerçekleştiğinden LH'nin tonik düzeyi değişkenlik göstermektedir (Senger, 2003; Goodman ve Inskeep, 2006).

Östrüs başlangıcından yaklaşık 10-14 saat sonra preovulatör LH dalgası başlamaktadır (Meikle ve ark., 2001; Menegatos ve ark., 2003). Preovulatör LH ve FSH'nin 6-12 saat sürelik bir artışı sonucunda ovulasyon uyarılmaktadır. Preovulatör LH dalgasının başlaması, LH salınım sıklığı ve düzeyinin artması ile gerçekleşmektedir (Martin ve ark., 1987). Progesteron ve E₂ birbirleri ile uyum içerisinde LH pulzasyon kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Pulsatil LH salınımı luteal dönemde P₄ düzeyi ile ters orantılıdır (Seekallu ve ark., 2009).

Anöstrüs döneminde 8-12 saatte bir, üreme döneminde 3-4 saatte bir LH salınımı gerçekleşirken, preovulatör dönemde her 20 dk'da bir LH salınımı gerçekleşmektedir. Preovulatör dönemde LH ani bir artış gösterip bazal düzeyin 30 ile 100 katına kadar yükselebilmektedir (O'Callaghan, 1999; Menegatos ve ark., 2003; Seekallu ve ark., 2009).

Foliküler dönemde, preovulatör LH artışından bir gün önce FSH, bazal düzeye kadar düşmektedir. Genelde FSH artışı ile preovulatör LH artışı ve azalışı paraleldir ve pik yaptıktan 8-12 saat sonra tekrar bazal düzeye inmektedir. Ancak LH'tan farklı olarak FSH düzeyi, preovulatör LH pikinden 20-28 saat sonra ikinci bir pik yapmaktadır (Toosi ve ark., 2009).

Koç etkisi, stres ve beslenme gibi faktörler LH salınım sıklığını ve LH düzeyini etkileyebilmektedir. Koçlar ile görsel ya da direkt temasın LH salınım sıklığını ve LH düzeyini etkilediği (Rosa ve Bryant., 2002; Yıldız ve ark., 2003, Delgadillo ve ark., 2009), çeşitli stres faktörlerinin pulsatil LH salınımını azalttığı, preovulatör LH dalgasını engellediği, E₂'ün LH dalgası üzerindeki PGB mekanizmasını bozduğu ve hipofizin GnRH'a olan duyarlılığını azaltarak LH

salınımını etkileyebildiği belirtilmektedir (Macfarlane ve ark., 2000; Breen ve ark., 2004; Breen ve ark., 2005; Oakley ve ark., 2009; Pierce ve ark., 2009a, 2009b).

1.5.3. Progesteron

Luteal ve gebelik döneminin baskın hormonu olan P₄'un salınımı, CL, placentada ve adrenal bezden gerçekleşmektedir. Siklik koyunlarda en önemli P₄ kaynağı CL'un luteal hücreleridir. Koyunlarda progesteron gebeliğin ilk iki ayında CL, daha sonraki dönemlerde ise plasentadan salgılanmaktadır (Kalkan ve Horoz, 2001; Pineda, 2003).

Gebeliğin devam etmesi ve embriyo gelişimi için P₄'a mutlaka gereksinim duyulmaktadır. Progesteron endometriyum'da salgı yapan bezlerin aktivitesini artırarak ve miyometriyum'un motilitesini de engelleyerek, hem implantasyon için uygun ortamın oluşmasını hem de gebeliğin devamlılığını sağlamaktadır (Quintal-Franco ve ark., 1999).

Progesteron beyinde bulunan, östrüs davranışlarını, GnRH/LH artışını ve pikini, follikülerde E₂ artışını sağlayan merkezler için önem arz etmektedir (Caraty ve Skinner, 1999). Düşük düzeyde P₄, E₂ ile birlikte östrüs davranışlarını uyarırken, yüksek düzeyi ise hem östrüsü hem de preovulatör LH dalgasını engellemektedir. Progesteron düzeyinin yükselmesi, tonik GnRH'ın salınım sıklığını düşürmektedir (Alecozay ve ark., 1988; Senger, 2003).

Progesteron düzeyleri, mevsim, beslenme, ırk ve ovulasyon sayısına göre değişkenlik gösterebilmektedir. Östrüs boyunca ve diöstrusun ilk 3 günü plazma P₄ düzeyi 1 ng/ml düzeyinin altında, luteal dönemde ve gebelikte ise 1 ng/ml'nin üzerinde bulunmaktadır (Alaçam ve ark., 2009). Gebe olan koyunların CL çapı, gebe olmayanlara kıyasla daha büyük olduğu, ovulasyon veya fötüs sayısındaki artışın plazma P₄ düzeyini yükselttiği belirtilmektedir (Kalkan ve ark., 1996; Bartlewski ve ark., 1999b; Shabankareh ve ark., 2009; Gür ve ark., 2011).

Gebeliğin 60. gününden itibaren plasentadan salgılanan P_4 'un artmasına bağlı olarak P_4 düzeyi 20 ng/ml ye kadar yükselebilmektedir. Bununla beraber üreme dönemine kıyasla anöstrüs döneminde, plazma P_4 düzeyleri neredeyse ölçülemeyecek kadar düşük düzeylerde bulunmaktadır (Andersson, 2008; Alaçam ve ark., 2009).

1.5.4. Östrojen

Östrojenler içerisinde E_2 , östron (E_1) ve östriol (E_3), aktif östrojenler arasında yer almaktadır. Ovaryumlarda östradiol'ün üretimi diğer östrojenlere kıyasla daha yüksek düzeylerde gerçekleşmektedir. Tüm aktif östrojenlerin üretimi andronejik prekürsörler tarafından gerçekleştirilmektedir. Folliküller'in teka interna ve granuloza hücrelerinde üretilen E_2 'e, FSH ve LH pozitif, inhibin ise negatif etki oluşturarak dolaşımdaki E_2 düzeyini koordineli olarak düzenlemektedir (Pineda, 2003, Andersson, 2008).

Folliküler dönemde, E_2 sekresyonunun artması preovulatör follikül'ün olgunlaşma hızının artmasını ve hem granuloza hem de teka hücrelerinde LH reseptör sayısının çoğalmasını sağlamaktadır. Preovulatör follikül'ün granuloza ve teka hücrelerinde bulunan LH reseptör sayısı, LH'a verilen cevabı belirlemektedir. Teka hücrelerinde LH kendi reseptörlerine bağlanarak, kolesterol'ün androjene dönüşmesini uyarmakta ve androjen granuloza hücrelerine geçiş yaparak burada FSH'm etkisiyle E_2 'e dönüşmektedir. Bir kısım E_2 antral folliküler sıvıda birikirken, büyük bir kısmı ise teka tabakasından dolaşıma karışmaktadır (Pineda, 2003).

Hipotalamus üzerine negatif ve pozitif etki yaparak FSH ve LH salınımını düzenleyen E_2 , başta medio bazal hipotalamus olmak üzere, merkezi sinir sisteme etki ederek östrüs davranışlarını başlatmaktadır. Negatif etkisi hipotalamus'un tonik merkezi üzerine, pozitif etkisi ise preovulatör merkez üzerine olduğu belirtilmektedir (Caraty ve ark., 1998; Goodman ve Inskeep, 2006).

Östradiol hipofizde GnRH reseptör sayısını arttırarak, hipofizin GnRH'a olan cevap verme yeteneğini arttırdığı veya LH β ve FSH β mRNA ekspresyon düzeyini düşürdüğü belirtilmektedir (Molter-Gerard ve ark., 2000).

Üreme dönemi boyunca E₂'ün LH salınım miktarını baskıladığı ancak LH salınım sıklığını etkilemediği, anöstrüs döneminde ise LH salınım sıklığını baskılayan güçlü bir inhibitör olduğu belirtilmektedir (Goodman ve ark., 2010). Folliküler dönemde E₂ düzeyinin yükselmesine bağlı olarak PGB gerçekleşirken anöstrüs döneminde E₂ yükselişi görülmemektedir. Ancak E₂'ün hipotalamus üzerindeki kısa süreli etkisi PGB yol açarak preovulator LH artışına neden olurken, uzun süreli etkisi NGB neden olarak LH artışını engellemektedir (Goodman ve Inskoop, 2006).

Östrojen, meme bezinin ve kanalının gelişmesini uyarmakta ve seksüel özelliklerin fiziksel gelişiminde rol oynamaktadır. Ayrıca büyüme hormonunu uyarıp VKS artışına yol açarak anabolik etki de göstermektedir. Pek çok türde E₂ luteolitik etki gösterip CL regresyonuna yol açarken, domuzda luteotropik etki göstererek CL'nin devamlılığını sağlamaktadır (Kalkan ve Horoz, 2001; Pineda, 2003).

1.6. Koyunlarda Östrüs Senkronizasyonları

Küçük ruminantlarda reproduksiyonun kontrolü için son 30 yıldır çok sayıda yöntem denendiği ve günümüzde bu yöntemlerin geliştirilmeye çalışıldığı belirtilmektedir (Titi ve ark., 2010). Bu süre içerisinde östrüs ve ovulasyonu uyarmak amacı ile çeşitli hormon uygulamaları, ışık kontrolü ve özellikle geçiş periyodunda koç feromonlerinin etkisinden yararlanan çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Hawken ve ark., 2008; Abecia ve ark., 2011).

Hormonal uygulamalar, östrüs ve ovulasyon senkronizasyonu, suni tohumlama, çoklu ovulasyonlar, embriyo transferleri, sürüde bir örneğin sağlanması ve işçi maliyetini azaltmak için gerçekleştirilmektedir (Contreras-Solis ve ark., 2009a). Koyunların yıl içerisinde doğal olarak östrüs sikluslarında meydana gelen hormonal değişiklikler esas alınarak, P₄, PGF_{2α}, GnRH, eCG, melatonin uygulamaları ile reproduksiyonun kontrolü gerçekleştirilmektedir (Abecia ve ark., 2011).

1.6.1. PGF_{2α} ile Senkronizasyon Metodu

Üreme döneminde PGF_{2α}, östrüs senkronizasyonu ve ovulasyon'un uyarılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Koyunlarda PGF_{2α}, ovulasyonu takip eden 3. ve 13. günler arasında luteolizise neden olarak folliküler döneme geçiş ve ovulasyona neden olabilmektedir (Rubianes ve ark., 2003, Contreras-Solis ve ark., 2009b). Bu nedenle çok erken ve çok geç luteal dönemde PGF_{2α}'ya karşı duyarsız olan CL'nin PGF_{2α}'ya cevap vermesini garanti altına almak için PGF_{2α} 7-11 gün ara ile uygulanmaktadır (Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005; Contreras-Solis ve ark., 2009b). Korpus luteum varlığında etkili olan prostaglandinler, luteal yapının bulunmadığı anöstrüs döneminde senkronizasyon amacı ile tek başına kullanılması tercih edilmemektedir (Abecia ve ark., 2011).

Koyunlarda östrüs senkronizasyonu GnRH ve tek doz PGF_{2α} uygulaması ile de gerçekleştirilmektedir. Gonadotropin salgılatıcı hormon uygulamasına bağlı olarak LH artışı, mevcut olan dominant follikül'ün luteinleşmesine ya da ovulasyonuna yol açmaktadır. Böylece gonadotropin salgılatıcı hormon uygulamasını takip eden 5-7 günler içerisinde PGF_{2α} uygulamasına cevap verebilecek CL'un oluşma şansı artmakta ve PGF_{2α} uygulaması ile yeni bir folliküler dalga açığa çıkarak östrüsler senkronize hale gelmektedir (Martemucci ve D'Alessandro, 2010; Titi ve ark., 2010).

Prostaglandin yöntemi ile gerçekleştirilen östrüs senkronizasyonu sonrasında, bazı araştırmacılar uygulama sonu östrüs aralığını 31.6 ± 2.3 ile 64.1 ± 2.30 saat, östrüs oranını % 33.3 ile % 100, gebelik oranını % 22.6 ile % 92.9, uygulama sonu preovulatör LH artışını 33.5 ± 5.6 ile 62.7 ± 2.3 saatte, preovulatör LH pikini $33.5 \pm$

5.6 ile 62.7 ± 2.3 saatte, LH pik düzeyini 18.6 ± 2.7 ile 103.5 ± 20 ng/ml aralığında tespit etmişlerdir (Acritopoulou ve Haresign, 1980; Loubser ve Van Niekerk, 1981; Deaver ve ark., 1986; Keisler ve ark., 1989; Oyediji ve ark., 1990; Beck ve ark., 1996; Dobson ve ark., 1997; Rubianes ve ark., 1997; Godfrey ve ark., 1999; Souza ve ark., 1999; Picazo ve ark., 2000; Menchaca ve ark., 2004b; Ataman ve Aköz, 2005; Alnimer ve ark., 2005; Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005; Ataman ve Aköz, 2006; Ocak, 2007; Gonzalez-Añover ve ark., 2007; Ali ve ark., 2009; Contreras-Solis ve ark., 2009b; Martemucci ve D'Alessandro, 2010; Salem ve ark., 2010; Yavuzer ve ark., 2010; Fierro ve ark., 2011; Olivera-Muzante ve ark., 2011a; Olivera-Muzante ve ark., 2011b; Letelier ve ark., 2011).

1.6.2. Progestagenler ile Senkronizasyon Metodu

Koyunlarda senkronizasyon amacı ile progestagenler (PG)'den olan fluorogeston asetat (FGA) 20-40 mg, medroksiprogesteron asetat (MAP) 60 mg dozunda poliüretan süngerler aracılığı ile vaginal yolla, melengestrol asetat (MGA) ise oral olarak günlük 0.25 mg dozunda rasyonuna ilave edilerek östrüslerinin baskılanması sağlanılmaktadır (Türk ve ark., 2008; Letelier ve ark., 2009; Emsen ve ark., 2011). Ayrıca 1.5 mg sentetik P₄ (norgestomet) içeren implant deri altı yolla, 300 mg doğal P₄ içeren silikon elastomer olan CIDR vaginal yolla kullanılmaktadır (Awel ve ark., 2009; Letelier ve ark., 2009a). Sünger ve CIDR, vaginal yolla uzun süreli (12-14 gün) veya kısa süreli (5-7 gün) uygulanmaktadır. Progestagenler veya P₄'ün uygulama boyunca hipotalamus üzerindeki negatif etkisinden faydalanılarak LH artışı, östrüs ve ovulasyon olaylarının baskılanması, uygulama sonrasında ise hipotalamus üzerindeki negatif etkinin kaybolarak preovulatör olayların uyarılması amaçlanmaktadır (Abecia ve ark., 2011).

Koyunlarda PG ile yapılan senkronizasyonlarda östrüs, ovulasyon ve gebelik oranlarını arttırmak için, uygulamanın son günlerinde eCG, PGF_{2α} veya preovulatör dönemde GnRH uygulamaları gerçekleştirilmektedir (Türk ve ark., 2008; Karaca ve ark., 2009; Özyurtlu ve ark., 2010). Östrüs aktivitesini başarılı bir şekilde uyarmak

için PG anöstrüs döneminde kullanılması zorunlu iken üreme döneminde kullanımı isteğe bağlıdır.

Son yıllarda P₄ uygulamalarının PGF_{2α} uygulamalarına kıyasla preovulatör follikül kalitesi, luteal fonksiyon ve erken embriyonun yaşama yeteneği üzerinde daha olumsuz etkilerinin olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır (Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005; Berlinguer ve ark., 2007). Hem PG'nin bu olumsuz etkileri hem de PGF_{2α} ile senkronizasyonun kabul edilebilir düzeylerde reproduktif verim elde edilebilmesi, PGF_{2α}'nın senkronizasyon amacı ile PG'lere alternatif olarak kullanılabileceği vurgulanmaktadır (Abecia ve ark., 2011).

Progesteron veya PG yöntemi ile gerçekleştirelen östrüs senkronizasyonu sonrasında bazı araştırmacılar, uygulama sonu östrüs aralığını 21.8 ± 1.2 ile 60.5 ± 6.2 saat, östrüs oranını %58 ile %98, gebelik oranı % 20 ile % 98, uygulama sonu preovulatör LH artışını 19.0 ± 1.3 ile 58 saatte, preovulatör LH pikini 36.6 ± 1.5 ile 66. saatte, LH pik düzeyini 17.7 ± 4.1 ile 126 ± 5 ng/ml aralığında tespit etmişlerdir (Walker ve ark., 1989a; Batista-Arteaga ve ark., 1998; Husein ve ark., 1998; Fukui ve ark., 1999; Godfrey ve ark., 1999; Vinales ve ark., 2001; Husein ve Kridli, 2002; Kohno ve ark., 2005; Dogan ve Nur, 2006; Güngör ve ark., 2007; Ocak, 2007; Reyna ve ark., 2007; Husein ve Ababneh, 2008; Türk ve ark., 2008, Ali ve ark., 2009; Fukui ve ark., 2010; Martemucci ve D'Alessandro, 2010; Özyurtlu ve ark., 2010; Kaşıkçı ve ark., 2011; Letelier ve ark., 2011).

1.7. Kisspeptin

1.7.1. Kisspeptinin Genel Tanımı

Kisspeptinler, ilk olarak 1996 yılında keşfedilen ve metastaz süpresör geni olarak tanımlanan Kiss-1 gen ürünleridir (Lee ve ark., 1996). Bu gen tarafından kodlanan 145 amino asit yapısına sahip prekürsör protein, çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar sonucunda C-terminal bölgelerinde Arg-Phe-NH₂ motifine sahip, 54, 14, 13, 10 amino asit uzunluğunda çeşitli aktif Kp formlarına dönüşmektedir (Greives ve ark., 2007; Hameed ve ark., 2011). Bu formlar enerji metabolizması ve reproduksiyon ile yakından ilişkili olan ve C-terminallerinde ortak arginin-fenilalanin motifine sahip olan RF-amid peptid hormon ailesi içerisinde yer almaktadır (Kauffman ve ark., 2007; Dardente ve ark., 2008; Clarke ve ark., 2009a; Clarkson ve ark., 2010).

Bağlandıkları reseptörleri ilk olarak kanser alanındaki çalışmalar sırasında 2001 yılında keşfedilmiş ve önceleri G proteinlerine kenetli reseptör-54 (GPR54) olarak ifade edilirken, günümüzde Kp reseptörü (Kiss1r) olarak tanımlanmaktadır (De Roux, 2001; Gottsch ve ark., 2006; Kirby ve ark., 2010). Kisspeptin reseptöründeki mutasyonun, idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm hastalığına yol açtığı tespit edilmesi, Kp, Kiss1 ve Kiss1r sisteminin, reproduktif endokrinoloji alanındaki diğer etkilerinin araştırılmasına öncülük etmiştir (De Roux, 2001; Tena-Sempere, 2010). Kisspeptin reseptörünün tahribatı sonucunda normal cinsiyet gelişiminin gerçekleşmeyerek pubertanın başlamadığı, hipotalamik GnRH nöronlarında normal düzeylerde GnRH sentez edilse de LH/FSH sekresyonlarının gerçekleşmediği ve hipofizer gonadotropik hücrelerin dışarıdan verilen GnRH'a karşı tepkisiz kaldığı vurgulanmaktadır (Meczekalski ve ark., 2011).

Aktif peptid özelliğindeki en büyük Kp formu Kp-54, kanser ile ilgili çalışmalarda tespit edilmiş ve tümör invazyonunu baskılamasından dolayı metastaz olarak adlandırılmıştır (Hori ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001). En küçük Kp formu olan Kp-10'nun reseptör aktivasyonu için yeterli C-terminal amino asit

uzunluğuna sahip olduğu, bu amino asit yapısının diğer Kp formlarının tamamında ortak olarak bulunduğu belirtilmektedir (Roseweir ve Millar, 2009).

Bu dört Kp peptidlerinin reseptöre bağlanma ve intrasellüler aktiviteleri benzer olsa da, Kp54 formunun yarılanma ömrü ve LH'ı arttırma süresi diğer küçük formlara göre daha etkili olduğu belirtilmektedir (Mikkelsen ve ark., 2009).

Beynin GnRH salınımını kontrol eden bölgelerde Kiss-1 mRNA'larının ekspresyonu gerçekleşmektedir (Estrada ve ark., 2006). Koyunda Kiss-1 mRNA ekspresyonu yapan hücreler en yoğun olarak beynin GnRH nöronlarında, preoptik (POA) ve arkuat nükleus (ARC) bölgelerine lokalize olduğu belirtilmektedir (Franceschini ve ark., 2006; Pompolo ve ark., 2006; Lehman ve ark., 2010). Gonadotropin sekresyonu üzerindeki uyarıcı etkileri, Kp antagonistleri veya Kp antiserumu ile bloke edilmesi, Kp'nin GnRH salınımını tetikleyerek gonadotropin artışına yol açtığıın birer göstergesidir (Roseweir ve ark., 2009, Pineda ve ark., 2010; Rişvanlı ve ark., 2010).

Kisspeptin'in hipofizdeki rolü henüz daha anlaşılamamıştır. Kisspeptin'in hipofizin ön lobunda uyarıcı bir rol aldığı düşünülse de Kp uygulaması sonucunda oluşan hipofizer Kp sinyallerinin gonadotropin salınımı için yeterli düzeyde olmadığı belirtilmektedir. Bununla beraber hipofiz içerisindeki oluşan Kp sinyallerinin hipotalamusla birlikte gonadotropin fonksiyonlarını düzenlediği varsayılmaktadır (Richard ve ark., 2009; Hameed ve ark., 2011).

Kisspeptin, Kiss-1 ve Kiss1r sisteminin hipotalamus, hipofiz ve gonadal eksen üzerindeki merkezi etkilerinin yanında, kardiyo vaskular kontrol, sinaptik iletim, plasantasyon, enerji metabolizması ve kanser bilimi alanlarında da etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Arai ve ark., 2005; Hiden ve ark., 2007; Mead ve ark., 2007; Hill ve ark., 2008; Makri ve ark., 2008; Silvestre ve ark., 2008; Torricelli ve ark., 2008; Fu ve van den Pol., 2010; Sawyer ve ark., 2011).

Kisspeptin'in ovaryum düzeyinde etkilerinin olabileceği öngörülerek, rat ovaryumlarında tüm östrüs siklus boyunca Kiss-1 ve Kiss1r mRNA varlığı tespit edilmiştir. Sonuçta ovaryum Kiss-1 mRNA konsantrasyonu çarpıcı bir şekilde sadece preovulatr döneme arttığı belirlenmiştir (Castellano ve ark., 2006).

1.7.2. Kisspeptinin Koyunlarda GnRH/LH Sekresyonu Üzerine Etkisi

Koyunlarda GnRH salınımından sorumlu nöronlar, başta sex steroidlerinin geri bildirim (GB) etkileri olmak üzere fotoperiyot, metabolik sinyaller ve stresinde yer aldığı pek çok faktör tarafından etkilenmektedir (Campbell, 2007).

Kisspeptin'in hızlı ve güçlü bir şekilde GnRH nöronlarını uyararak gonadotropin salınımına neden olduğu bildirilmektedir (Han ve ark., 2005; Messenger ve ark., 2005). Kisspeptin ekspresyonu gerçekleştiren hücrelerin GnRH nöronları ile etkileşim içerisinde oldukları ve GnRH nöronların neredeyse tamamına yakınının Kiss1r mRNA ekspresyonu gerçekleştiği belirtilmektedir (Smith, 2009; Smith ve ark., 2011).

Kisspeptin, GnRH nöronları üzerindeki Kiss1r'ne bağlanarak GnRH salınımını tetiklemekte ve LH ve FSH düzeylerinde artışa yol açmaktadır. Ancak LH salınımını FSH'a oranla daha fazla etkilemektedir (Dungan ve ark., 2006). Kisspeptin ve Kiss1r etkileşiminin tespiti için yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar sırasında Kp'nin hipotalamusta GnRH salınımını tetiklediği belirlenmiştir (Seminara ve Kaiser, 2005).

İnsan, kısırak, inek, koyun, keçi, rat gibi türlerde hem intraserebral hem de periferik Kp uygulamaları plazma LH ile FSH düzeylerinde artışa yol açmaktadır (Caraty ve ark., 2007; Dhillon ve ark., 2007; Kadokawa ve ark., 2008; Magee ve ark., 2009; Thompson ve ark., 2009; Hashizume ve ark., 2010).

Hipotalamusta GnRH nöronları tarafından ekspresyonu gerçekleştirilen Kiss1r'nin, pubertanın başlaması ve LH/FSH sekresyonu için zorunlu olduğu bildirilmektedir. Kisspeptin'in Kiss1r üzerine olan etkilerinin araştırılması aşamasında, Kp uygulamasından önce GnRH ve Kp antagonistlerinin, Kp'nin gonadotropin salgılatıcı etkisini bloke etmesi Kp'nin Kiss1r aracılığı ile LH/FSH salınımına yol açtığını ispatlamaktadır (Richard ve ark., 2009; Millar ve ark., 2010).

Kisspeptin antagonistinin, Kp'nin GnRH nöronlarının uyarma oranını ve GnRH salınımını düşürdüğü ancak bazal LH sekresyon düzeyinin değiştirmedığı belirlenmiştir. Bu yüzden Kp her ne kadar LH salınım sıklığını düzenleyip LH sekresyonunu etkilese de, bazal LH düzeyinin Kp'den bağımsız bir mekanizma tarafından kontrol edildiği ileri sürülmektedir (Millar ve ark., 2010).

Bazı canlılarda Kp'nin direkt olarak adeno hipofiz gonadotropinleri uyurarak LH ve FSH salınımını uyardıkları tespit edilse de koyunlarda Kp'nin hipofize direkt etkisi tam olarak ortaya konulamamıştır (Smith ve ark., 2008a). Kisspeptinin ineklerde (Kadokawa ve ark., 2008) ve ratlarda (Gutierrez-Pascual ve ark., 2007) büyüme ve prolaktin hormon sekresyonunu uyardığı bildirilmiş ancak koyunda ne büyüme ne de prolaktin hormonu artışı tespit edilmiştir (Smith ve ark., 2009a).

Koyunlarda GnRH salgılayan hücrelerinin % 90 ± 5 'inin Kiss1r mRNA ekspresyonu gerçekleştirdiği ve östrüs siklusunun folliküler döneminde ARC ve POA bölgelerinde Kiss1 mRNA ekspresyon artışının gerçekleştiği bildirilmektedir (Smith ve ark., 2009b; Smith ve ark., 2011). Koyunlarda ARC'ta bulunan Kp populasyonu sayısal olarak POA'dakilere göre daha çok olduğu ve östrüs siklusunun dönemlerine bağlı olarak ARC Kp hücre sayılarının değiştiği, preovulatör LH pikine neden olan geçici PGB'in, Kp hücrelerinin aktivasyonundan ve ARC Kiss1 ekspresyon artışından hemen önce gerçekleştiği belirtilmektedir (Clarke ve ark., 2009b; Smith, 2009; Smith ve Clarke, 2010).

Kisspeptin-10'nun intraserebral yolla uygulanması, serebrospinal sıvıdaki GnRH düzeyinde artışa neden olmaktadır (Messenger ve ark., 2005). Koyunlarda ARC bölgesinde Kp-10 formunun tespit edildiği ancak bu bölgede daha uzun aminoasit dizilimine sahip diğer Kp formlarının tespit edilemediği belirtilmektedir (Clarke, 2011).

Anöstrüs döneminde, intra venöz yolla bir dizi Kp uygulamalarını takiben bazal düzeyde olan GnRH/LH'nin, ani bir şekilde yükseldiği ve sonrasında da ovulasyonun gerçekleştiği bildirilmektedir (Caraty ve ark., 2007). Anöstrüs döneminde E₂'ün NGB etkisi ile LH sekresyonu baskılanırken Kp uygulaması sonrasında bu etkinin ortadan kalkarak ovulasyonun gerçekleştiği belirtilmektedir (Clarke, 2009b).

Koyunlarda Kp uygulamaları, üreme ve anöstrüs dönemlerinde yol açtığı LH salınım düzeyleri arasında farklılık bulunduğu, anöstrüs dönemde LH'nin Kp'ye olan duyarlılığın daha yüksek olduğu ve normal östrüs siklusunun luteal evresinde uygulanan Kp sonrasında görülen LH artış düzeyinin, geç folliküler dönemdeki LH artışına göre daha düşük olduğu bildirilmektedir (Smith ve ark., 2009a; Smith ve ark., 2011).

Kisspeptin uygulama zamanı iyi ayarlanılarak kullanılması sonucunda ovulasyonun gerçekleşebileceği, ovulasyon senkronizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabilmesi, suni tohumlama veya in vitro fertilizasyon programları gibi reproduktif programların etkinliğinin geliştirilmesine yönelik araştırmalarda kullanılmaya aday olabileceği belirtilmektedir (Caraty ve ark., 2010).

1.7.3. Kisspeptinin Koyunlarda Pozitif ve Negatif Geri Bildirim Mekanizmasına Etkisi

Gonadotropin salgılatıcı hormon hücrelerinde, ER α reseptörlerinin bulunmaması nedeniyle ovaryumlar ile GnRH hücreleri arasındaki GB döngüsünde, ER α reseptör ekspresyonu gerçekleştiren hücrelerin görevli olması gerektiği vurgulanmaktadır (Caraty ve ark., 1998). Kisspeptin hücrelerinin GnRH hücrelerine doğrudan sinaptik giriş yapması ve Kp'nin güçlü bir GnRH sekresyonu uyarıcısı olmasından dolayı Kp'nin, E₂'ün GB sinyallerini GnRH hücrelerine iletmede görevli olma ihtimalini arttırmaktadır (Kinoshita ve ark., 2005; Messenger ve ark., 2005). Koyunlarda POA ve ARC bölgelerindeki Kiss1 mRNA ekspresyonlarının sex steroidlerine göre değişmesi, ayrıca POA ve ARC Kp hücrelerinin NGB ve PGB aracılık etmesi, bu bölgedeki Kp hücrelerinin GB sinyallerine aracılık ederek GnRH'nin salınımını etkileyebileceğini düşündürmektedir (Franceschini ve ark., 2006; Smith ve ark., 2009b).

Östradiol'ün, POA'da ER α ekspresyonu gerçekleştirebilen Kp hücrelerini doğrudan yada dolaylı olarak etkilediği ve bu hücrelerin GnRH hücreleri ile temas içerisinde oldukları belirtilmektedir (Clarke, 2011). Hem preovulatör LH piki zamanından hemen önce, POA bölgesindeki Kiss1 mRNA ekspresyonunda artışın olması hem de E₂ uygulamaları sonucunda Kiss1 mRNA ve peptid ekspresyonunda artışın tespit edilmesi, bu bölgenin E₂'ün PGB'e aracılık ettiğini göstermektedir (Smith ve ark., 2008b; Smith ve ark., 2009a). Ancak koyun ARC bölgesinde bulunan hemen hemen tüm Kp hücreleri ER α ekspresyonu gerçekleştirirken, POA Kp hücrelerinin ancak %50'sinin ER α ekspresyonu gerçekleştirdiği belirtilmektedir (Smith ve ark., 2007).

Geç folliküler dönemde artan E₂ düzeyinin PGB mekanizması sayesinde ARC Kp hücrelerini tetiklediği ve bu hücrelerde Kp düzeyinin arttığı bildirilmektedir (Estrada ve ark., 2006). Ovariectomi sonrasında Kp hücre sayısındaki artışın ve ovariectomi yapılan koyunlara 2 hafta kadar uzun süren E₂ uygulamalarına bağlı olarak aktif ARC Kp hücre sayılarında düşüşe yol açması bu bölgenin E₂'ün NGB

sinyallerine aracılık ettiğini göstermektedir (Smith ve ark., 2008b; Smith, 2009). Ayrıca ARC Kp hücrelerinin büyük bir bölümünün P₄ reseptör ekspresyonu da gerçekleştirdiği belirtilmektedir (Smith ve ark., 2008b).

Gonadotropin salgılatıcı hormon hücreleri beyin, nörotransmitterler ve nöropeptidlerin dahil olduğu geniş bir sistem tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle Kp hücrelerinin GnRH hücrelerini etkileyen diğer nöropeptidlerin ekspresyonlarını gerçekleştirebileceği düşünülmektedir (Christian ve Moenter, 2010). Koyunlarda ARC Kp hücrelerinin tamamına yakını dinofrin ve nörokinin B nöropeptidlerin üretimi gerçekleştirebilmektedir (Goodman ve ark., 2007).

Kisspeptin, nörokinin B ve dinofrin hücreleri birlikte KNDy hücreleri olarak tanımlanmakta ve GnRH/LH salınımını etkilemektedir (Cheng ve ark., 2010). Koyunlarda dinofrin reproduktif fonksiyonları baskılamakta, nörokinin B ise reproduktif fonksiyonları hem uyararak hem de baskılayarak mevsime bağlı üremede rol oynamaktadır. Nörokinin B nöronlarının çoğunun ER α , dinofrin hücrelerinin hem P₄ hem de ER α reseptör ekspresyonlarını gerçekleştirdiği ve PGB ile NGB'in kontrolünde önemli rollerinin olduğu belirtilmektedir (Foradori ve ark., 2002; Goodman ve ark., 2004; Franceschini ve ark., 2006; Clarke, 2011). Progesteron, dinofrin hücreleri aracılığıyla, ARC bölgesinde bulunan hücrelerine NGB sinyalizasyonunu gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Goodman ve ark., 2011).

Östrüs siklusunun luteal döneminde ARC'ta Kp ekspresyonlarında düşüş meydana geldiği ve KNDy hücrelerinin bu dönemde birbirleri ile etkileşim içerisinde olarak NGB sinyallerini GnRH hücrelerine iletmede görevli oldukları belirtilmektedir (Smith, 2009; Clarke, 2011). Ayrıca KNDy hücreleri hipotalamusun mediobasal GnRH hücre gruplarını etkileyerek de NGB sinyalizasyonunda rol oynamaktadırlar (Goodman ve ark., 2004).

Bundan dolayı Kp ve bu hücreler birlikte hareket ederek E₂ ve P₄ düzeylerine bağlı olarak hem NGB hem de PGB'in kontrolünde rol oynadıkları, GnRH

sekresyonunun ana düzenleyicisi oldukları ve bu nedenle reproduksiyonun işleyişini etkiledikleri düşünülmektedir (Goodman ve ark., 2007).

1.7.4. Kisspeptinin Koyunlarda Mevsimsel Üremeye Etkisi

Koyunlarda basal hipotalamusun premammillary nükleusunda bulunan melatonin, mevsime bağlı üremenin kontrolünde önemli bir yer tutmaktadır. Ancak bu hormonal sinyalin nasıl GnRH sekresyonuna dönüştüğü günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır (Goodman ve ark., 2010). Kisspeptin hücrelerinin bu hormonal sinyallerin GnRH'a dönüşüm mekanizmasında etkin bir rol alabilecekleri düşünülmektedir (Clarke ve ark., 2009b).

Beynin ARC bölgesinde ER α ekspresyonu yapan nöronların A15 nükleusu ile etkileşim içerisinde olarak, Kp hücrelerinin E₂ sinyallerini dopaminerjik nöronlara ilettiği, birlikte mevsimsel üremede önemli görevler aldıkları ve A15 nöronlarının Kp nöronlarını inhibe ederek GnRH salınım sıklığını baskıladığı düşünülmektedir (Clarke ve ark., 2009b, Goodman ve ark., 2010).

Ölümşüzleştirilmiş hücre dizilerinde melatonin'in Kiss1 ekspresyonunu düzenlediği tespit edilmiş ancak Kp hücrelerinin melatonin reseptör ekspresyonu gerçekleştirip gerçekleştirmediği henüz bilinmemektedir (Gingerich ve ark., 2009).

Mevsime göre ARC'ta bulunan Kp hücrelerinin, E₂'e olan duyarlılıklarında değişmelerin olduğu ve bu sayede Kp'nin mevsimsel üremede etkin bir rol alabileceği vurgulanmaktadır (Smith, 2009a). Anöstrüs döneminde E₂'ün hem Kiss1 mRNA hem de Kp proteini baskıladığı ve Kiss1 ve Kp hücre sayılarında görülen bu çarpıcı düşüşün anöstrüs döneminde görülen reproduktif aktivitenin azalması ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir (Smith ve Clarke, 2010). Ancak bu düşüşün steroidlerin GB sinyallerine göre gerçekleştiği ileri sürülse de, anöstrüs döneminde, ovariectomi yapılarak E₂ implant uygulanan koyunlarda, ARC Kp hücrelerinin

azalması, üreme döneminin başlangıcında, gonodal GB yokluğunda bile ARC Kiss1 mRNA ekspresyonunun arttığının tespit edilmesi nedeniyle, Kp hücrelerinin steroidlerden bağımsız farklı bir mekanizma ile mevsimsel üremede rol aldığını düşündürmektedir (Smith ve ark. 2007; Wagner ve ark. 2008).

Koyunlar üzerinde fotoperiyod'un üreme dönemi ve anöstrüs döneminde etkinliğinin araştırılması için yapılan çalışmada, 8 saat aydınlık 16 saat karanlık ortamda bulunan koyunlarda ARC'taki Kiss1 mRNA ekspresyonunun, daha uzun süre fotoperiyoda maruz kalan koyunlara kıyasla 3 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Wagner ve ark., 2008).

Anöstrüs ve üreme döneminde E₂'ün kronik etkisi hem POA'nın bütün bölgelerini hem de kaudal ARC dışında kalan bütün ARC bölgesini etkilediği tespit edilmiştir. Mevsime göre POA bölgesi Kp hücre aktivasyonunda çarpıcı bir değişiklik olmazken, üreme döneminde orta ve kaudal ARC Kp hücre aktivitesi, anöstrüs dönemine göre daha yoğun tespit edilmiştir. Bununla beraber üreme döneminde mediobazal hipotalamus bölgesindeki GnRH nöronları ile etkileşim içerisinde Kp sayısı üreme döneminde 2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Smith ve ark., 2008b; Clarke ve ark., 2009b).

Preovulatr dönemde kaudal ARC'ta Kiss1 ekspresyon artışının görülmesi aynı hücrelerin hem PGB hem de NGB'de farklı roller aldıklarının birer göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ancak her ne kadar kaudal ARC bölgesindeki Kp hücreleri mevsimsel üreme ile yakından bağlantılı olsa da, mevsimsel üremede rolleri olan nöron topluluklarının sinyalizasyonunda hem POA hem de ARC bölgelerindeki Kp nöronlarının, GnRH nöronlarının kontrolü için gerekli oldukları da belirtilmektedir (Smith ve ark., 2008c; Clarke ve ark., 2009b).

Koyunlarda anöstrüs döneminde E₂'ün, ARC Kiss1 mRNA ve Kp artışı üzerindeki inhibitör etkisinin üreme dönemine kıyasla daha kuvvetli olması, üreme dönemine geçerken Kp mRNA ekspresyonu artışının gerçekleşmesi ve Kp

uygulamalarının anöstrüsta olan koyunların ovulasyonunu uyarması Kp'nin, mevsime bağlı üremenin düzenlenmesinde önemli rol oynadığının güçlü birer göstergesi olarak kabul edilmektedir (Smith ve ark., 2008b).

1.7.5. Kisspeptinin Koyunlarda Enerji Metabolizması ve Pubertaya Etkisi

Fertilitenin devam edebilmesi için belli bir enerjiye ihtiyaç duyulduğu, yetersiz enerji sonucu hipotalamus, hipofiz ve gonadal eksen üzerindeki sinyalizasyonun yavaşladığı belirtilmektedir (Fu ve van den Pol, 2010).

Örneğin enerji homeostazisini düzenleyen ve vücut yağ dokusu hakkında hipotalamusa bilgi veren leptin yetersizliğinin, hipogonadotropik hipogonadizme neden olarak pubertanın başlamasını engellediği, dolaşımda düşük leptin düzeyi sonucunda görülen reproduktif bozuklukların leptin takviyesi sonucunda normale döndüğü bildirilmektedir. Ayrıca puberta öncesi leptin uygulamaları sonucunda puberta başlama zamanını hızlandırdığıda belirtilmektedir (Backholer ve ark., 2010a).

Hipotalamus'un GnRH nöronlarında leptin reseptör ekspresyonu gerçekleşmediği bildirilmektedir. Ancak ARC'ta bulunan Kiss1 mRNA ekspresyonu gerçekleştiren hücrelerin yaklaşık yarısında leptin reseptör mRNA'sı, tespit edilmiştir (Castellano ve ark., 2009; Meczekalski ve ark., 2011; Hameed ve ark., 2011). Koyunlarda ARC ve POA Kp hücrelerinin leptin reseptör ekspresyonlarında da rol oynadıkları belirtilip VKS'nin aşırı düşmesine bağlı olarak reproduktif fonksiyonların durduğu ancak leptin uygulaması sonucunda, muhtemelen Kp hücrelerin aktif hale geldiği ve böylece reproduktif fonksiyonların tekrar başladığı tahmin edilmektedir (Henry ve ark., 2001; Clarke, 2011).

Kisspeptin nöronlarının GnRH nöronlarına metabolik sinyallerin aktarımında görevli olabilecekleri varsayılmaktadır (Roa ve ark., 2008; Castellano ve ark., 2009).

Yüksek düzeyde P₄ ve E₂ reseptör ekspresyonu gerçekleştiren Kp hücreleri, daha düşük düzeyde ekspresyon gerçekleştiren nöropeptid Y ve proopiomelanokortin hücreleri ile birlikte hareket ederek beslenme ve enerji durumuna göre sex steroidlerinin düzenlenmesinde görev alabilecekleri düşünülmektedir (Backholer ve ark., 2010b, Fu ve van den Pol, 2010, Clarke, 2011).

Yukarıda belirtilen etkilerinin ışığında, Kp sisteminin fertilitiyi etkileyebileceği anlaşılmaktadır. Ancak Kp'in gebelik, fekdasyon, proliferasyon oranı gibi reproduktif parametrelere olan etkinlikleri henüz araştırılmamış olup, farklı yöntem ile senkronize edilen hayvanlarda, preovulatör LH profili üzerine olan etkisini belirlemeye yönelik yapılan araştırmalar yetersizdir.

Sunulan tez projesinde, Kp'nin reproduktif parametreler ile ovulasyon için elzem olan preovulatör LH düzeylerine olan etkisini araştırarak, Kp'nin başta senkronizasyon çalışmaları olmak üzere reproduksiyon alanında kullanılabilirliğinin tespit edilmesi amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

2.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan, 4-6 yaşlı 60 baş Pırlak ırkı koyun kullanıldı. Araştırmaya Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (AKUHAYDEK, 15.09.2009, 63-09 nolu çalışma) tarafından onay verilmesiyle başlandı.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal

2.1.2.1. Kisspeptin

Çalışmada “Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂” dizilimine sahip, HPLC analizine göre % 99.2 saflıkta, net peptid içeriği % 82.7, moleküler ağırlığı 1302.4 olan Kp-10 (Kisspeptin-10 / Metastin (45-54) amide human, PolyPeptide; Fransa Kat. No: SC1389) kullanıldı.

2.1.2.2. PGF_{2a}

Araştırmada sulu çözeltisinin 1 ml'si 250 µg cloprostenol'e eşdeğer olan 263 µg cloprostenol sodyum ve bakterisid olarak klorokresol içeren sentetik prostaglandin analogu (Estrumate[®], Intervet/Schering-Plough, Almanya) kullanıldı.

2.1.3 Araştırmada kullanılan Cihazlar

- Ultrasonografi cihazları (SLE 301MF, Medelkom, Finlandiya; Falco Vet., Pie Medical, Hollanda)
- Santrifüj cihazı (NF-200, Nüve[®], Türkiye)
- Derin dondurucu (UCF 400 S, Uğur[®], Türkiye)
- 5-50 µl, 20-100 µl, 100-1000 µl ve 25 µl'lik otomatik pipetler (Eppendorf[®], Almanya)
- Hassas tartı (TP-214 Denver Instrument[®], Almanya)
- Vorteks karıştırıcı (Falc[®], İtalya)
- 500 µl ayarlı elektronik pipet (Eppendorf[®], Almanya)
- Horizontal Çalkalayıcı (SL 350, Nüve[®], Türkiye)
- İnkubatör (FN 500, Nüve[®], Türkiye)
- RIA ölçümü için gama sayacı (Mini-Assay 6.20, Mini-Instruments LTD, İngiltere)
- Otomatik mikroyıkama cihazı (ELx50, BioTek Amerika Birleşik Devletleri)
- ELISA cihazı (Thermo Scientific Multiscan FC, Finlandiya)
- Hormon hesaplama programı (AssayZap V3, Biosoft, İngiltere)

2.2. Yöntem

2.2.1.Koyunların Bakım ve Beslenmesi

Koyunların bakım beslenmesi Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin yürüttüğü bakım ve beslenme şartları altında gerçekleştirildi. Araştırma koyunları sürüden ayrı bölmelere konuldu. Koçlar ile ayrı yerlerde tutularak birbirleri ile teması engellendi. Koyun başına sabah ve akşam 500'er gr olmak üzere günlük 1 kg konsantre yem karması ile sabah ve akşam 750'şer gr olmak üzere 1.5 kg kuru yonca verildi. Su ihtiyaçları kesintisiz sağlandı.

2.2.2.Grupların Oluşturulması ve Senkronizasyon Yöntemi

Sürü içerisinde 60 adet koyun (40-50 kg) tartılarak, Grup 1 (n=20), Grup 2 (n=20), Grup 3 (n=20) olacak şekilde, benzer vücut ağırlığı ortalamasına sahip (45 kg) gruplara ayrıldı.

Kan örneklerinin toplanmasındaki zamanlama düzeninden dolayı Grup 1: n=10, Grup 2: n=10, Grup 3: n=10 olacak şekilde 60 adet koyun, birer hafta ara ile üreme döneminde senkronize edildi.

Östrüs senkronizasyonu için 10 gün ara ile $PGF_{2\alpha}$ analogu olan cloprestenol (Estrumate,[®] Intervet/Schering-Plough) 250 µg/koyun dozunda kas içi uygulandı.

Kp-10 uygulaması öncesi koyunların canlı ağırlıkları tekrar belirlendi ve vücut ağırlıklarına göre Kp-10 enjeksiyonu yapıldı.

Grup 1 (n=20): İkinci $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu sonrası 40. saatte damar içi Kp-10 (1µl/kg) uygulandı.

Grup 2 (n=20): İkinci PGF_{2α} enjeksiyonu sonrası iki kez; 40 ve 50. saatte damar içi Kp-10 (1µl/kg) dozunda damar içi verildi.

Grup 3 (n=20): Kontrol grubunu oluşturdu. İkinci PGF_{2α} enjeksiyonu sonrası serum fizyolojik (2 ml) 40 ve 50. saatte damar içi verildi.

İkinci PGF_{2α} enjeksiyonu sonrası 42-43. saatler içerisinde araştırma merkezinin yetiştirme stratejisi gereği ilk hafta 6 adet merinos ırkı, ikinci hafta 10 adet pırlak ırkı koç kullanılarak elde sıfat yöntemi ile tek sefer çiftleştirildi. Vulva'da sperma görülmesiyle aşımın gerçekleştiğinin kararı verildi.

2.2.3. Kan Örneklerinin Toplanması

Kan örnekleri; P₄ ve E₂ ölçümleri için 8 ml, LH ölçümleri için 4 ml, vena jugularisten steril bir kanül ve holder yardımı ile antikoagulan (EDTA) içeren vakumlu tüplere toplandı.

Kan örnekleri her iki PGF_{2α} enjeksiyonu öncesinde ve ikinci PGF_{2α} enjeksiyonu takip eden 24, 28, 32, 39, 40.5, 41, 44, 48, 49, 50.5, 51, 55, 60, 64, 68, 72. saatler ile 18 ve 21.günlerde toplandı.

Toplanan kanlar 1 saat içerisinde 3000 devir/dakikada, 10 dakika süre ile santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazmalar 2 ml'lik saklama tüplerine aktarılarak -24 °C'de ölçüm gününe kadar muhafaza edildi.

2.2.4. Gebelik Kontrolü

Koyunların gebelik kontrolleri, aşım sonrası 30. ve 60. günlerde iki kez ultrasonografi yardımıyla (Real-Time, B-mode 6.0/8.0 MHz linear rektal prob) gerçekleştirildi. Gebelik muayenesi, koyunlar ayakta sabit tutularak metilkarboksiselüloz içeren ultrasonografi jeli kullanılarak yapıldı. Ultrason probu, rektal çubuk kullanılarak idrar kesesinin kranialinde 90° saat yönünde ve ardından 180° tersi yönde döndürülerek tüm reproduktif kanal tarandı.

2.2.5. Hormon Düzeyinin Belirlenmesi

2.2.5.1. Plazma P₄ Düzeyinin Belirlenmesi

Plazma P₄ düzeyi, her iki PGF_{2α} enjeksiyonu öncesinde ve ikinci PGF_{2α} enjeksiyonu takip eden 24, 48, 72. saatler ile 18 ve 21. günde alınan kan örneklerinde ölçüldü.

Plazma P₄ düzeyinin belirlenmesi için beşeri (Alaçam ve ark., 2009) P₄ radioimmunoassay kiti (Immunotech®, Beckman Coulter, Fransa Kat.No: IM1188) kullanıldı.

Kullanılan kit içeriği;

1. Antikor kaplı tüpler: 100 adet anti-P₄ antikor kaplı tüp.
2. Tracer (Radyoaktif İşaretli Antijen): 1 vial, 55 ml, ¹²⁵I işaretlenmiş P₄.
3. Standart solüsyonları: 0.5 ml'lik 6 vial (0, 0.11, 0.5, 1.75, 9.6, 60 ng/ml)
4. Kontrol solüsyonu: 1 vial, 0.5 ml.

Kan plazma P₄ ölçüm metodu;

1. Plazma örnekleri ölçüm öncesinde çözdürüldü.

2. Standart, kontrol ve örnekler için ikişer tane antikor kaplı tüp, toplam radyoaktivitenin belirlenmesi için (toplam cpm) antikor kaplı olmayan iki adet tüp hazırlandı.
3. Kontrol, standart ve örneklerden antikor kaplı tüplere 50 µl konuldu.
4. Standart ve plazma örneklerini tüplere koyma işlemi bittikten sonra tüm tüplere 1 dk. İçerisinde elektronik pipet yardımı ile 500 µl tracer konuldu.
5. Oda ısında (18-25°C) 1 saat horizontal çalkalayıcıda 350 rpm'de inkubasyona bırakıldı.
6. Antikor ile kaplı olmayan tüpler hariç tüm tüpler dökülerek, kurutma kağıdı üzerine ters çevrildi ve içeriğin iyice boşalması sağlandı.
7. Bütün tüpler 50 saniye süre ile gama sayacında okutuldu.
8. Ölçülen değerler hormon hesaplama programında sigmoid (-) standart eğrisi kullanılarak ng/ml cinsine çevrildi.

2.2.5.2. Plazma E₂ Düzeyinin Belirlenmesi

Plazma E₂ düzeyi; ikinci PGF_{2α} enjeksiyonu takip eden 24, 48, 72. saatler ile 18.günde alınan kan örneklerinde belirlendi.

Plazma E₂ düzeyinin belirlenmesinde beşeri (Özpınar ve Fırat, 2003) E₂ radioimmunoassay kiti (Immunotech[®], Beckman Coulter, Fransa Kat.No: A21854) kullanıldı.

Kullanılan kit içeriği;

1. Antikor kaplı tüpler: 100 adet anti-östradiol antikor kaplı tüp.
2. Tracer (Radyoaktif İşaretli Antijen): ¹²⁵I işaretlenmiş östradiol (55x): 1 vial, 1ml
3. Tracer tampon çözeltisi: 1 vial, 55 ml
4. Standart solüsyonları: 1 ml'lik 7 vial (0, 11, 37, 140, 480, 1400, 5000 ng/ml)
5. Kontrol solüsyonu: 1 vial, 1 ml.

Kan plazma E₂ düzeyi aşağıda belirtilen işlemler yapılarak ölçüldü;

1. Plazma örnekleri ölçüm öncesinde çözdürüldü.
2. Standart, kontrol ve örnekler için ikişer tane antikor kaplı tüp, toplam radyoaktivitenin belirlenmesi için (toplam cpm) antikor kaplı olmayan iki adet tüp hazırlandı.
3. Tracer tampon çözeltisi içine ¹²⁵I-östradiol içeren 1ml tracer ilave edilerek radyoaktif hale geçmesi sağlandı.
4. Kontrol, standart ve örneklerden antikor kaplı tüplere 100 µl konuldu.
5. Standart ve plazma örneklerini tüplere koyma işlemi bittikten sonra tüm tüplere 1 dk. içerisinde elektronik pipet yardımı ile 500 µl tracer konuldu.
6. Oda ısında (18-25°C) 1 saat horizontal çalkalayıcıda 350 rpm'de inkubasyona bırakıldı.
7. Antikor ile kaplı olmayan tüpler hariç tüm tüpler dökülerek, kurutma kağıdı üzerine ters çevrildi ve içeriğin iyice boşalması sağlandı.
8. Bütün tüpler 50 saniye süre ile gama sayacında okutuldu.
9. Ölçülen değerler hormon hesaplama programında sigmoid (-) standart eğrisi kullanılarak pg/ml cinsine çevrildi.

2.2.5.3. Plazma LH Düzeylerinin Belirlenmesi

Plazma LH düzeylerinin belirlenmesi için; ikinci PGF_{2α} enjeksiyonu takip eden 24, 28, 32, 39, 40.5, 41, 44, 49, 50.5, 51, 55, 60, 64, 68, 72. saatlerde alınan kan örnekleri kullanıldı.

Plazma LH düzeyinin belirlenmesinde; koyuna spesifik (Contreras-Solis ve ark., 2009; Leterier ve ark., 2011) ELISA LH kiti (LH Detect[®], ReproPharm/INRA, Fransa Kat.No. 221) kullanıldı.

Kullanılan kit içeriği;

1. Mikropleyt: Anti-LH antikor (AC1) ile hassaslaştırılmış 12x8 strip, 96 kuyucuk.

2. Standart solüsyonları (oLH): 150 µl'lik 7 tüp (0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ng/ml)
3. İkinci Anti-LH antikoru (AC2): 1 vial, 11 ml
4. Üçüncü Anti LH antikoru (AC3): 1 vial, 11 ml
5. Substrat solüsyonu: 1 vial, 11 ml, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)
6. Stop solüsyonu: 1 vial, 11 ml
7. Dilüsyon solüsyonu: 1 vial, 11 ml

Kan plazma LH düzeyi aşağıda belirtilen işlemler yapılarak ölçüldü;

1. Solüsyonlar (dilüsyon, AC2, AC3, TMB, stop, ve standart) çözdürülerek hazır hale getirildi.
2. Mikropleyt, 30 dk oda ısında (18-25°C) bekletildi.
3. Plazma örnekleri çözdürülerek vorteks ile homojenize edildi.
4. Mikropleytdeki kuyucuklara 6 adet (100 µl) standart konuldu.
5. Mikropleytdeki kuyucuklara, ölçülecek örnekler (10 µl) konuldu.
6. Örneklerin konulduğu kuyucuklara dilüsyon solüsyonu (90 µl) ilave edilerek 1/10 oranında dilüe edildi.
7. Mikropleyt'in üzeri yapışkan bir bantla kapatılarak hafifçe karıştırıldı ve 37 °C' de 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. Otomatik yıkama cihazı ile distile su kullanılarak 5 kez yıkandı.
9. Her kuyucuya 100 µl AC2 konuldu. Üzerine yapışkan bir bantla kapatılarak 37 °C' de 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
10. Otomatik yıkama cihazı ile distile su kullanılarak 5 kez yıkandı.
11. Her kuyucuya 100 µl AC3 konuldu. Üzerine yapışkan bir bantla kapatılarak 37 °C' de 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
12. Otomatik yıkama cihazı ile distile su kullanılarak 5 kez yıkandı.
13. Her kuyucuya 100 µl TMB-substrat eklendi ve üzeri kapatılarak oda ısında 15 dk. bekletildi.
14. Her kuyucuya 100 µl stop solüsyonu konuldu.
15. Mikropleyt ELISA cihazı ile 450 nm'de okundu.
16. Standart aralığı üzerindeki örnekler dilüe edilerek tekrar ölçüldü.

17. Okunan değerler hormon hesaplama programında sigmoid (+) standart eğrisi kullanılarak ng/ml cinsine çevrildi.

2.2.6. İstatistiki Hesaplamalar

İstatistik analizlerde ANOVA testi kullanıldı. Grup içi farkın önemini belirlemede Tukey, gruplar arası farkın önemini belirlemede Duncan testinden faydalanıldı. Analizler bilgisayar ortamında SPSS (16.0) programında gerçekleştirildi.

Bazal LH düzeyinin % 10 artışı preovulatör dalğanın başlangıç ve bitişinin belirlenmesindeki hedef değer olarak kullanıldı. Bazal düzeyin belirlenmesinde de LH dalğanın başlangıcı kabul edilen % 10'luk artışın başlamasından önceki LH düzeyi, bazal LH düzeyi olarak değerlendirildi. LH dalga uzunluğu preovulatör dalğanın başlangıç ve bitiş arasındaki geçen süre olarak kabul edildi (Contreras-Solis, 2009a; Letelier ve ark., 2011).

Gruplar arasındaki LH AUC düzeyinin tespiti WinNonlin[®] programı yardımı ile logaritmik linear trapezoidal kurala göre (Rowland ve Tozer, 1989) bilgisayar ortamında gerçekleştirildi.

Araştırmada östrüs, gebelik, doğum oranı ve fekondasyon oranı aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı (Fierro ve ark., 2011).

$$\text{Östrüs oranı} = \text{Östrüs tespit edilen koyun sayısı} / \text{koyun sayısı} \times 100$$

$$\text{Gebe kalma oranı} = \text{Gebe kalan koyun sayısı} / \text{Çiftleşen koyun sayısı} \times 100$$

$$\text{Kuzulama oranı} = \text{Doğuran koyun sayısı} / \text{Gebe kalan koyun sayısı} \times 100$$

$$\text{Fekondasyon oranı} = \text{Canlı doğan kuzu sayısı} / \text{Çiftleşen koyun sayısı}$$

$$\text{Prolifikasyon oranı} = \text{Canlı doğan kuzu sayısı} / \text{Gebe kalan koyun sayısı}$$

3. BULGULAR

3.1. Grupların Reprodüktif Parametreleri

Çalışmada; Grup 1 (Kisspeptin x1), Grup 2 (Kisspeptin x2) ve Grup 3 (Kontrol) koyunlarda östrüs, gebe kalma, kuzulama, fekondasyon, proliferasyon oranları ile gebelik süreleri arasında herhangi bir istatistiki önem belirlenmemiştir (Çizelge 3.1).

Koç altında durmayan Grup 1’de 3, Grup 2’de 4 ve Grup 3’de 4 koyunun östrüs’ta olmadıkları anlaşıldı. Gebe kalan koyunlardan Grup 1’de 2, Grup 2’de 3 ve Grup 3’de 2 koyun ikiz kuzuladı, diğer koyunlar ise tek kuzuladı ve gruplar arasında istatiki önem bulunmadı.

Çizelge 3.1. Grup 1 (Kisspeptin x1), Grup 2 (Kisspeptin x2) ve Grup 3 (Kontrol) gruplarında östrüs oranı, gebe kalma oranı, kuzulama oranı, fekondasyon oranı, proliferasyon oranı ve gebelik süresi

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Koyun Sayısı (n)	20	20	20
Östrüs Oranı (%)	85 (17/20)	80 (16/20)	80 (16/20)
Gebe Kalma Oranı (%)	52.94 (9/17)	50 (8/16)	50 (8/16)
Kuzulama Oranı (%)	100 (9/9)	100 (8/8)	100 (8/8)
Fekondasyon Oranı	0.65 (11/17)	0.69 (11/16)	0.63 (10/16)
Prolifikasyon Oranı	1.22 (11/9)	1.38 (11/8)	1.25 (10/8)
Gebelik süresi (gün)	149 (147-152)	148 (146-152)	149 (146-152)

3.2. Grupların P₄ Düzeyleri

Çalışmada; Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 24, 48 ve 72. saatler ile 18 ve 21. gün P₄ düzeyleri arasında herhangi bir istatistiki önem belirlenmemiştir (Çizelge 3.2).

Tüm gruplarda -10. gün P₄ düzeyleri 1.5 ng/ml'nin üzerinde bulundu. Grup 1'de 6, Grup 2'de 7 ve Grup 3'de 6 koyunun P₄ düzeyi 1 ng/ml'nin altında bulundu. Tüm gruplarda 0. gün P₄ düzeyleri 2 ng/ml'nin üzerinde bulunup, Grup 1 ve Grup 3'de 1 koyunun P₄ düzeyi 1 ng/ml'nin altında bulundu.

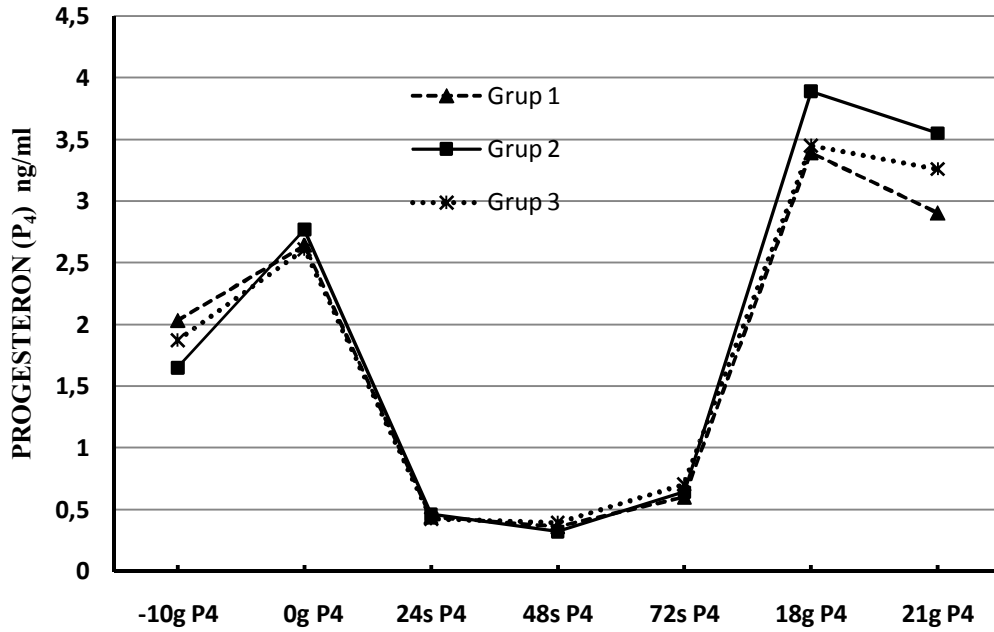
Tüm gruplarda 2. PGF₂ α uygulaması sonrasındaki 24. saatte P₄ düzeyinin düştüğü, 48. saatte bazal düzeye indiği, 72. saatte ise tekrar yükselişe geçtiği belirlendi. Örneğin, Grup 2'de 24. saat P₄ düzeyi $0,46 \pm 0,22$ ng/ml iken 48. saatte $0,32 \pm 0,16$ ng/ml ve 72. saatte $0,64 \pm 0,37$ ng/ml olarak belirlenmiştir.

Tüm gruplarda gebe kalan tüm koyunların 18 ve 21. gün P₄ düzeyleri 3 ng/ml'nin üzerinde bulundu. Grup 1'de 4, Grup 2'de 6 ve Grup 3'de 6 koyunun 18. gün P₄ düzeyi 3ng/ml'nin üzerinde iken aynı koyunlara ait 21. gün P₄ düzeyi 1 ng/ml'nin altında bulundu. Tüm gruplarda ikiz kuzulayan koyunların 21. gün P₄ düzeyi, tek kuzulayan koyunlara göre daha yüksek tespit edildi.

Çizelge 3.2. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 1. (-10g P₄) ve 2. (0g P₄) PGF_{2 α} uygulamaları ve 24, 48 ve 72. saatler ile 18. ve 21. günler sonrası P₄ (ng/ml) düzeyleri (Mean \pm Std Dev) ve istatistiki önemi (p<0,05)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p
-10g P₄	2,03 \pm 1,39 (0,3- 5,4)	1,65 \pm 1,49 (0,1 -5,8)	1,87 \pm 1,99 (0,1- 8,9)	0,475
0g P₄	2,64 \pm 1,21 (0,8 -5,3)	2,77 \pm 0,86 (1,1- 6,7)	2,61 \pm 1,33 (0,3- 6,9)	0,416
24s P₄	0,44 \pm 0,19	0,46 \pm 0,22	0,42 \pm 0,24	0,597

	(0,1- 0,8)	(0,1- 1)	(0,21- 2,6)	
48s P4	0,36 ± 0,19	0,32 ± 0,16	0,39 ± 0,25	0,325
	(0,2- 1)	(0,1- 0,7)	(0,1- 3,1)	
72s P4	0,60 ± 0,29	0,64 ± 0,37	0,70 ± 0,71	0,823
	(0,2- 1,19)	(0,1- 1,63)	(0,1- 3,4)	
18g P4	3,39 ± 1,93	3,89 ± 2,31	3,45 ± 2,76	0,590
	(0,2- 6,4)	(0,7- 8,8)	(0,21- 10,6)	
21g P4	2,87 ± 2,40	3,55 ± 3,59	3,26 ± 4,10	0,606
	(0,2- 7,3)	(0,2- 9,8)	(0,2- 14,6)	



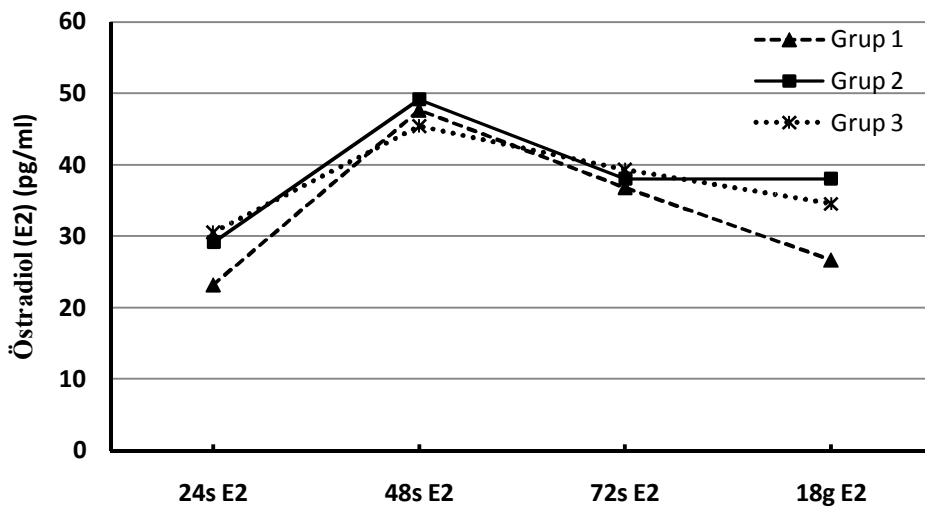
Şekil 3.1. Grup 1, Grup 2, Grup 3'ün -10, 0. gün, 24, 48, 72. saat ve 18, 21. gün P₄ düzeyleri.

3.3. Grupların E₂ Düzeyleri

Çalışmada; Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 24, 48 ve 72. saatler ile 18. gün E₂ düzeyleri arasında istatistiki önem belirlenmemiştir (Çizelge 3.3). Östradiol düzeyinin tüm gruplarda 48. saate kadar yükseldiği, 48. saatten sonra da azaldığı belirlendi. Örneğin, Grup 2'de 24. saat E₂ düzeyi 29,14 ± 9,77 pg/ml iken 48. saatte 49,15 ± 18,37 pg/ml ve 72. saatte 38,04 ± 12,64 pg/ml olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 24, 48 ve 72. saatler ile 18. gün E₂ (pg/ml) düzeyleri (Mean±Std Dev) ve istatistiki önemi (p<0,05)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p
24s E ₂	23,16 ± 10,20 (13,4-57,2)	29,14 ± 9,77 (16,4-58)	30,50 ± 13,11 (14,4-58)	0,094
48s E ₂	47,64 ± 14,05 (14,4-69)	49,15 ± 18,37 (19,8-87)	45,44 ± 16,44 (18-79,4)	0,472
72s E ₂	36,81 ± 14,83 (19,8-66)	38,04 ± 12,64 (21,2-62,2)	39,33 ± 17,52 (17-76,1)	0,870
18g E ₂	26,63 ± 9,6 (14-44,6)	38,00 ± 16,54 (15-79)	34,52 ± 13,28 (13-79,4)	0,092



Şekil 3.2. Grup 1, Grup 2, Grup 3'ün 24, 48 ve 72. saatler ile 18. gün E₂ düzeyleri

3.4. Grupların LH Düzeyleri

Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 50.5 ($p=0,005$) ve 51. ($p=0,014$) saat LH düzeyleri arasında istatistiki önem bulundu (Çizelge 3.4). Gruplar arasında 50.5. saat LH düzeyi, Grup 1'de $9,15 \pm 11,44$, Grup 2'de $22,06 \pm 28,90$, Grup 3'de $2,27 \pm 3,12$ ng/ml olarak tespit edildi. Gruplar arasında 51. saat LH düzeyi Grup 1'de $9,37 \pm 10,72$, Grup 2'de $14,05 \pm 16,26$, Grup 3'de $2,80 \pm 3,93$ ng/ml olarak tespit edildi.

Tüm gruplarda bazal LH düzeyi $0,54 \pm 0,06$ ng/ml olarak tespit edildi. Tüm koyunların plazma örnekleri 64. saate kadar ölçülüp, sadece LH artışı tespit edilemeyen koyunların 68. ve 72. saat plazma örnekleri ölçüldü. Grup 1'de 1, Grup 2'de 2 ve Grup 3'de 4 koyunda 72. saate kadar LH artışı tespit edilemedi. Çiftleşme saatinde östrüste olmayan koyunlardan Grup 1'de 2, Grup 2'de 1 ve Grup 3'de 3 koyunda LH artışı 55. saat ve sonrasında gerçekleştiği belirlendi.

Çizelge 3.4. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 24, 28, 32, 39, 40.4, 41, 44, 49, 50.5, 51, 55, 60 ve 64. saat LH düzeyleri (ng/ml) (Mean±Std Dev) ve istatistiki önemi ($p<0,05$)

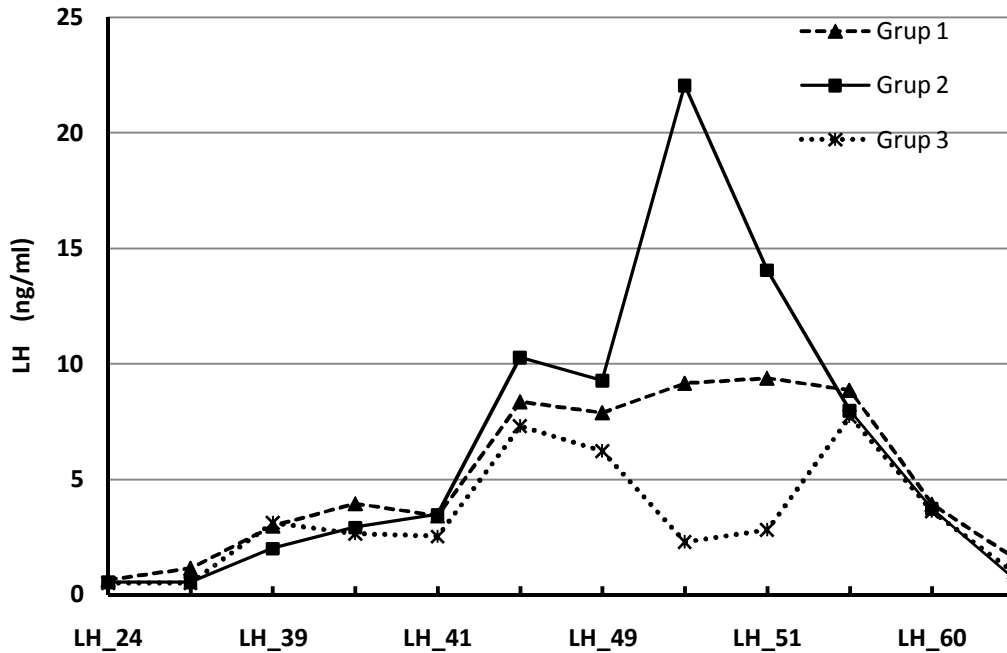
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p
LH_24	$0,65 \pm 0,60$ (0,6 - 3)	$0,53 \pm 0,08$ (0,6 - 0,7)	$0,49 \pm 0,09$ (0,48 - 0,8)	0,375
LH_28	$0,68 \pm 0,9$ (0,6 - 3)	$0,56 \pm 0,08$ (0,6 - 0,7)	$0,59 \pm 0,09$ (0,48 - 0,8)	0,420
LH_32	$1,15 \pm 1,99$ (0,6 - 7,2)	$0,54 \pm 0,08$ (0,48 - 0,7)	$0,49 \pm 0,06$ (0,48 - 0,6)	0,148
LH_39	$2,98 \pm 7,67$ (0,48 - 32,4)	$1,99 \pm 5,90$ (0,48 - 26,3)	$3,11 \pm 8,17$ (0,6 - 34,8)	0,874
LH_40.5	$3,95 \pm 8,69$ (0,6 - 39,1)	$2,90 \pm 6,23$ (0,6 - 28)	$2,63 \pm 5,17$ (0,48- 19,6)	0,820
LH_41	$3,42 \pm 7,87$ (0,6 - 34,7)	$3,46 \pm 4,44$ (0,6 - 13,4)	$2,51 \pm 5,06$ (0,48 - 20,1)	0,858
LH_44	$8,34 \pm 12,10$	$10,26 \pm 23,07$	$7,31 \pm 14,03$	0,863

	(0,48 - 34,1)	(0,6 - 98)	(0,48 - 55,2)	
LH_49	7,88 ± 11,01 (0,48 - 40,1)	9,27 ± 11,55 (0,6 - 59)	6,21 ± 14,82 (0,6 - 61,8)	0,754
LH_50.5	9,15 ± 11,44 ^{ab} (0,48 - 34,6)	22,06 ± 28,90 ^a (0,6 - 84,2)	2,27 ± 3,12 ^b (0,48 - 11,7)	0,005**
LH_51	9,37 ± 10,72 ^{ab} (0,6 - 31,2)	14,05 ± 16,26 ^a (0,48 - 51,6)	2,80 ± 3,93 ^b (0,6 - 13,8)	0,014*
LH_55	8,85 ± 13,09 (0,48 - 42,3)	7,96 ± 10,02 (0,6 - 36,8)	7,72 ± 10,42 (0,48 - 35)	0,823
LH_60	3,92 ± 6,09 (0,6 - 21,9)	3,73 ± 9,69 (0,6 - 42,3)	3,61 ± 6,99 (0,6 - 28,8)	0,992
LH_64	1,60 ± 4,45 (0,48 - 20,5)	0,66 ± 0,21 (0,48 - 1,5)	0,93 ± 1,13 (0,6 - 5,5)	0,534

Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiki fark bulunmaktadır.

* Gruplar arasındaki fark önemli (p<0,05)

** Gruplar arasındaki fark önemli (p<0,01)



Şekil 3.3. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 24, 28, 32, 39, 40.5, 41, 44, 49, 50.5, 51, 55, 60, 64. saat LH düzeyleri

3.5. Grupların LH AUC Düzeyleri

Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 LH AUC düzeyleri arasında 55. saat ($p=0,042$) AUC düzeyinde istatistiki önem bulundu (Çizelge 3.5).

Gruplar arasında 55. saat LH AUC düzeyi Grup 1’de $126,58 \pm 79,96$ ng/ml, Grup 2’de $168,05 \pm 132,91$ ng/ml, Grup 3’de $83,05 \pm 82,89$ ng/ml olarak tespit edildi. Gruplar arasında 24, 28 ve 32. saat LH AUC düzeyleri tespit edilemedi.

Çizelge 3.5. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3’ün 24, 28, 32, 39, 40.4, 41, 44, 49, 50.5, 51, 55, 60 ve 64. saat LH AUC düzeyleri (ng/ml) (Mean±Std Dev) ve istatistiki önemi ($p<0,05$).

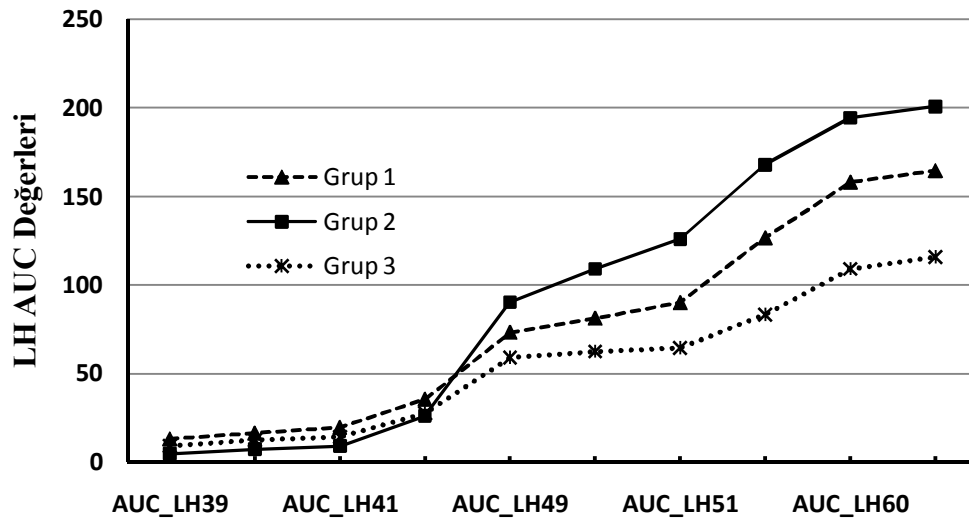
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p
AUC_LH24				
AUC_LH28				
AUC_LH32				
AUC_LH39	$13,13 \pm 33,76$ (0- 112)	$4,79 \pm 20,88$ (0-91)	$9,03 \pm 28,37$ (0-119)	0,657
AUC_LH40.5	$16,44 \pm 40,80$ (0,5- 148)	$7,45 \pm 26,81$ (0,5- 118)	$12,18 \pm 33,86$ (1-141)	0,719
AUC_LH41	$19,58 \pm 47,82$ (0,5- 184)	$9,24 \pm 31,19$ (0,5- 138)	$14,16 \pm 37,91$ (0,5- 152)	0,720
AUC_LH44	$35,63 \pm 61,23$ (1- 253)	$26,16 \pm 50,26$ (1- 163)	$27,45 \pm 48,12$ (1- 170)	0,836
AUC_LH49	$73,34 \pm 78,61$ (0 – 285)	$90,43 \pm 104,51$ (1 – 435)	$58,79 \pm 82,17$ (1 – 267)	0,551
AUC_LH50.5	$81,30 \pm 80,72$ (1 -286)	$109,21 \pm 111,31$ (0 -444)	$62,34 \pm 87,38$ (0,5 -280)	0,309
AUC_LH51	$90,03 \pm 81,59$ (1 -286)	$125,99 \pm 118,10$ (1 -449)	$64,24 \pm 88,54$ (0 -284)	0,154
AUC_LH55	$126,58 \pm 79,96^{ab}$ (1 -286)	$168,05 \pm 132,91^a$ (1 -469)	$83,05 \pm 82,89^b$ (1 -288)	0,042*

AUC_LH60	158,20 ± 85,67 (1 -298)	194,52 ± 139,39 (1 -489)	108,97 ± 86,90 (1 -288)	0,054
AUC_LH64	164,68 ± 87,23 (1 -330)	200,94 ± 141,65 (1 -497)	115,71 ± 91,49 (1 -288)	0,063

Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiki fark bulunmaktadır.

* Gruplar arasındaki fark önemli (p<0,05)

** Gruplar arasındaki fark önemli (p<0,01)



Şekil 3.4. Grup 1, Grup 2, Grup 3'ün 24, 32, 39, 40.5, 41, 44, 49, 50.5, 51, 55, 60, 64. saat LH AUC düzeyleri

3.6. Grupların Preovulatör LH Profili

Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün preovulatör LH artışı başlangıç zamanı (PO_LH-İlk), preovulatör LH pik zamanı (PO_LH-Pik), preovulatör LH artışının bitiş zamanı (PO_LH-Son), preovulatör LH dalga süresi (PO_LH-Süre) ve preovulatör LH pik PO_LH-Pik-ng düzeyinde, gruplar arasında PO_LH-Son (p=0,017), PO_LH-Süre (p=0,009) ve PO_LH-Pik-ng (p=0,030) bulgularında istatistiki önem bulundu (Çizelge 3.6).

Gruplar arasında 24 - 39. saatte Grup 1’de 3, Grup 2’de 1, Grup 3’de 2, 41 - 51. saatte Grup 1’de 12, Grup 2’de 16 ve Grup 3’de 8, 55 - 64. saatte Grup 1’de 4, Grup 2’de 1 ve Grup 3’de 6 koyunda LH piki tespit edildi. Gruplar arasında 50.5 - 51. saatte LH piki gerçekleşen koyun sayısı Grup 1’de 2, Grup 2’de 9 ve Grup 3’te 0 olarak belirlendi. Grup 1 ve 2’de Kp-10 uygulama saati öncesinde LH piki ve dalgası gerçekleşmiş koyunlarda, uygulama sonrasında belirgin bir LH artışı tespit edilemedi.

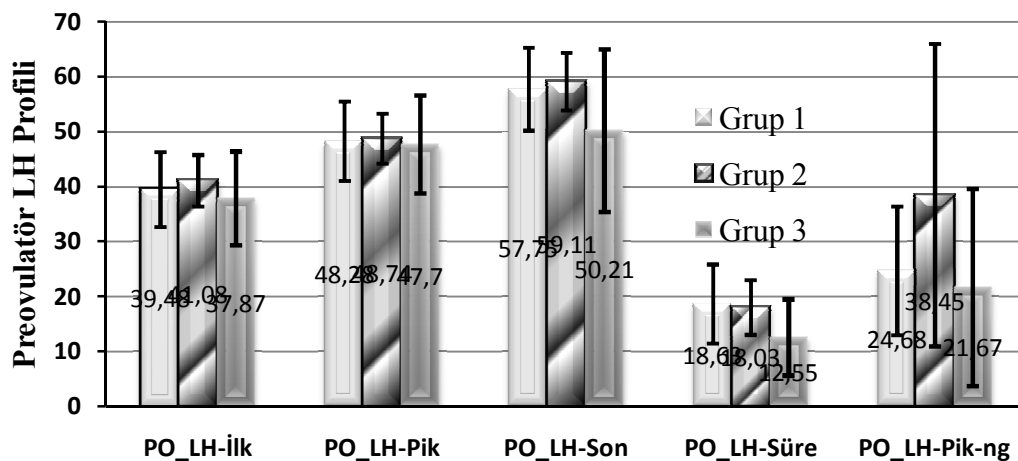
Çizelge 3.6. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3’ün preovulatör LH artışı başlangıç zamanı (PO_LH-İlk), preovulatör LH artışının bitiş zamanı (PO_LH-Son), preovulatör LH pik zamanı (PO_LH-Pik), preovulatör LH dalga süresi (PO_LH-Süre) (saat) preovulatör LH pik konsantrasyonu (PO_LH-Pik-ng) (Mean±Std Dev) ve istatistiki önemleri (p<0,05)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p
PO_LH-İlk	39,48 ± 6,80	41,08 ± 4,69	37,87 ± 8,56	0,361
PO_LH-Pik	48,28 ± 7,25	48,74 ± 4,55	47,70 ± 8,94	0,912
PO_LH-Son	57,75 ± 7,55 ^{ab}	59,11 ± 5,23 ^a	50,21 ± 14,80 ^b	0,017**
PO_LH-Süre	18,63 ± 7,21 ^a	18,03 ± 5,00 ^a	12,55 ± 6,93 ^b	0,009**
PO_LH-Pik-ng	24,68 ± 11,69 ^{ab}	38,45 ± 27,51 ^a	21,11 ± 17,97 ^b	0,030*

Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiki fark bulunmaktadır.

* Gruplar arasındaki fark önemli (p<0,05)

** Gruplar arasındaki fark önemli (p<0,01)



Şekil 3.5. Grup 1, Grup 2, Grup 3’ün PO_LH-İlk, PO_LH-Pik, PO_LH-Son, PO_LH-Süre, PO_LH-Pik-ng değerleri

4.TARTIŞMA

Bu araştırmada pırlak ırkı koyunlarda, Kp-10'un preovulatör LH profili ile reproduktif parametreler üzerindeki etkileri araştırıldı. Senkronizasyondan sonra tek veya aralıklı iki kez uygulanan Kp-10'un, preovulatör LH profili ve reproduktif parametrelere olan etkisi ve bununla beraber pırlak ırkı koyunlara ait P₄, E₂, LH hormon profillerine ait veriler tespit edildi.

Sunulan araştırmada Grup 1 (% 85), Grup 2 (% 80) ve Grup 3'te (% 80) tespit edilen östrüs oranları, bazı araştırmacıların elde ettikleri östrüs oranlarından düşük (Oyediji ve ark., 1990; Beck ve ark., 1996; Godfrey ve ark., 1999; Vinales ve ark., 2001; Menchaca ve ark., 2004b; Kohno ve ve ark., 2005; Türk ve ark., 2008; Ali ve ark., 2009; Özyurtlu ve ark., 2010; Fierro ve ark., 2011; Kaşıkçı ve ark., 2011; Olivera-Muzante ve ark., 2011b) bazıları ile benzer (Alnimer ve ark., 2005; Ataman ve Aköz, 2005; Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005), bazılarından ise yüksek (Husein ve Kridli, 2002; Husein ve Ababneh, 2008; Martemucci ve D'Alessandro, 2010) olarak tespit edilmiştir.

Senkronizasyon çalışmalarından sonra östrüs tespit süresine bağlı olarak östrüs oranları değişebilmektedir. Nitekim sunulan araştırmada koç etkisinin preovulatör LH profilini etkileyebileceği düşünülerek koyunlarda östrüs takibi gerçekleştirilmemiştir. Tüm gruplardaki koyunlar sadece 42-43. saatler içerisinde çiftleştirilmiş ve östrüs oranı sadece bu saatte tespit edilmiştir. Östrüs takip uzunluğu arttıka östrüse gelen koyun sayısındaki artış ve dolayısı ile östrüs oranının yükselmesi (Menchaca ve ark. 2004b; Letelier ve ark., 2011) diğer çalışmalarda 72 saat ve daha uzun süreli östrüs takibinin gerçekleştirilmesi, yapılan araştırmaya göre yüksek östrüs oranının sebebi olabilir. Ayrıca koç etkisinin östrüs profilini ve östrüs davranışını uyararak östrüs oranını arttırması (Romano ve ark., 2001; Evans ve ark., 2004) belli aralıklarla arama koçu kullanılan bu çalışmalarda yüksek östrüs oranına yol açmış olabilir. Östrüs oranlarıyla ilgili araştırmalarda östrüs tespit süresinin yanında, senkronizasyon amacıyla kullanılan PGF_{2α}'nın dozunun da östrüs oranını

etkilediği tespit edilmiştir. Uygulanan $PGF_{2\alpha}$ dozu yükseldikçe hem uygulama östrüs aralığının kısalması hem de östrüs oranının yükselmesi (Loubser ve Van Niekerk, 1981; Contreras-Solis, 2009a; Olivera-Muzante ve ark., 2011b) yapılan araştırmada kullanılan yüksek doz $PGF_{2\alpha}$ 'nın hızlı luteal regrasyona yol açarak çiftleşme saatinde koyunlarda östrüs oranını arttırdığı ve bu nedenle PG veya $PGF_{2\alpha}$ uygulayan ve daha uzun süreli östrüs takibi gerçekleştiren diğer çalışmalara göre benzer veya daha yüksek östrüs oranına yol açmış olabilir.

Östrüs oranı, ırk (Gonzalez-Añover ve ark., 2007), senkronizasyon yöntemi (Godfrey ve ark., 1999; Martemucci ve D'Alessandro, 2011), mevsim (Hashem ve ark., 2011), $PGF_{2\alpha}$ analogu (Rişvanlı ve ark., 2010), PG analogu (Husein ve Kridli, 2002), PG dozu (Kaşıkçı ve ark., 2011), eCG uygulaması (Doğan ve Nur, 2006), eCG dozu (Kaşıkçı ve ark., 2011), $PGF_{2\alpha}$ ve PG aralığı (Houghton ve ark., 1995; Vinales ve ark., 2001), beslenme, stres ve yaş (Menchaca ve ark., 2004b) gibi faktörler tarafından etkilenebilmesi, yapılan araştırma ile diğer çalışmalar arasındaki farklı bulguların nedeni olarak düşünülmektedir.

Yapılan araştırmada Grup 1 (% 52.94), Grup 2 (% 50) ve Grup 3'te (% 50) tespit edilen gebelik oranları, bazı araştırmacıların elde ettikleri gebelik oranlarından düşük (Beck ve ark., 1996; Vinales ve ark., 2001; Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005; Ataman ve Aköz, 2006; Ali ve ark., 2009; Türk ve ark., 2008; Martemucci ve D'Alessandro, 2010; Özyurtlu ve ark., 2010; Fierro ve ark., 2011; Kaşıkçı ve ark., 2011), bazıları ile benzer (Walker ve ark., 1989b; Husein ve Kridli, 2002; Alnimer ve ark., 2005; Ali, 2007; Talebkhan Garoussi ve ark., 2012), bazılarından ise yüksek (Fukui ve ark., 1999; Menchaca ve ark., 2004b; Reyna ve ark., 2007; Husein ve Ababneh, 2008; Awel ve ark., 2009; Fukui ve ark., 2010; Olivera-Muzante ve ark., 2011a, 2011b) olarak tespit edilmiştir.

Östrüs siklusunun 10. günü uygulanan $PGF_{2\alpha}$ 'nın, çiftleşmeden 2 saat sonra serviks'te bulunan spermatozoa sayısını yaklaşık 3 kat düşürdüğü (Hawk ve Cooper, 1977), $PGF_{2\alpha}$ ile yapılan senkronizasyon sonrasında koyunların % 90'unda

ovulasyon varlığı belirlense de, çiftleşmeyi takip eden 24. saatte koyunların sadece % 60'ının ovidukt kanalında spermatozoa tespit edildiği bildirilmektedir (Hawk, 1973). Sunulan çalışmada çiftleşme saatinde östrüs oranını arttırmak için kullanılan yüksek doz PGF_{2α}'nın, yetersiz sayıda motil spermatozoa'nın ovidukt kanalına göç etmesine yol açarak gebelik oranlarını düşürdüğü düşünülmektedir. Ayrıca koç etkisinin preovulatr LH artışını etkileyebileceği düşünülerek tüm koyunlar bir saat içerisinde çiftleştirilmiştir. Koyunlar bu süre içerisinde sadece bir kez çiftleştirilerek koçlar en kısa sürede uzaklaştırılmıştır. Gebelik oranı yüksek olan çalışmalarda ise koyunlar östrüs boyunca birden fazla sayıda, aynı veya farklı koçla çiftleşmesi, çiftleştirilmesi veya belli aralıklarla iki kez suni tohumlama yapılması, ovulasyon zamanında ovidukt'ta olabilecek motil spermatozoa sayısında artışa yol açtığı ve bunun gebelik oranlarını yükselttiği düşünülmektedir.

Bu araştırmada Grup 1 (0,65), Grup 2 (0,69) ve Grup 3'te (0,63) tespit edilen fekondasyon oranı, bazı araştırmacıların elde ettikleri fekondasyon oranından düşük (Ataman ve Aköz, 2006; Türk ve ark., 2008; Özyurtlu ve ark., 2010; Fierro ve ark., 2011) veya büyük (Husein ve Ababneh, 2008; Olivera-Muzante ve ark., 2011a, 2011b) olarak belirlendi. Yapılan çalışmalarda östrüs oranı ve elde edilen yavru sayısının farklı olması, fekondasyon oranlarını etkilediği belirlenmiştir. Grup 1 (1,22), Grup 2 (1,38) ve Grup 3'te (1,25) tespit edilen proliferasyon oranı, bazı araştırmacıların elde ettikleri proliferasyon oranından düşük (Karaca ve ark., 2009; Kaşıkçı ve ark., 2011; Martemucci ve D'Alessandro, 2011) benzer (Fierro ve ark., 2011) veya büyük (Husein ve Ababneh, 2008; Türk ve ark., 2008; Özyurtlu ve ark., 2010; Olivera-Muzante ve ark., 2011a, 2011b; Zonturlu ve ark., 2011) olarak belirlendi. Yapılan çalışmalarda gebe kalma oranı ve elde edilen yavru sayısının farklı olması, proliferasyon oranlarını etkilemiştir.

Sunulan çalışmada gebelik, fekondasyon ve proliferasyon oranlarının düşük belirlenmesinin nedeni yüksek doz PGF_{2α} kullanılması olabilir. Çünkü çift doz prostaglandin ile yapılan senkronizasyonun, ovulasyon öncesi folliküler dinamiği bozduğu, preovulatr follikül'ün fonksiyonunu ve final maturasyonunu etkilediği (Barrett ve ark., 2002; Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005), çiftleşmeden önceki luteal

dönemde ve ovulasyon öncesi veya sonrası P₄ düzeyini düşürerek gebe kalma, proliferasyon ve fekondasyon oranlarını azalttığı ileri sürülmektedir (Fierro ve ark., 2011). Ayrıca ırkın (Fair ve ark., 2005; Gonzalez-Añover ve ark., 2007; Richardson ve ark., 2011), senkronizasyon yönteminin (Olivera-Muzante ve ark., 2011a), kullanılan PGF_{2α} / PG analogu ve dozunun (Olivera-Muzante ve ark., 2011b), PGF_{2α} / PG uygulama aralığının (Emsen ve ark., 2011), eCG uygulama zamanı ve dozunun (Quintero-Elisea ve ark., 2011), yaşın (Fukui ve ark., 2010), VKS'nun (Fukui ve ark., 2010), koç etkisinin, tohumlama yöntemi ve mevsimin, gebelik, proliferasyon ve fekondasyon oranlarını etkilemesi, sunulan araştırma ile yapılan çalışmalar arasındaki farklı bulguların nedeni olabilir.

Kisspeptin 10'un GnRH nöronlarında bulunan Kiss1r reseptörlerine bağlanarak LH salınımına yol açtığı pek çok türde belirlenmiştir. İntravenöz yolla, koyunda 0.54-0.65 µg/kg (Caraty ve ark., 2007), keçide 1µg/kg (Hashizume ve ark., 2010), prepubertal düvede 4.76 µg/kg (Kadokawa ve ark., 2008), inekte 0.13 µg/kg (Withlock ve ark., 2008) dozunda uygulanan Kp-10, LH artışına yol açmıştır. Farklı memeli türlerinde Kp nöronlarının merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerine lokalize olmaları ve bu nedenle hipotalamus başta olmak üzere Kiss1r dağılımlarındaki bölgesel farklılıklar, türler arasında uygulanan Kp'nin, GnRH nöronlarını uyarma derecesini etkileyerek LH artışı için gerekli Kp dozunda türler arasında çeşitliliğe yol açmış olabilir. Ayrıca inek, domuz ve rat gibi canlılarda Kp'nin direkt olarak hipofizi etkileyebilmesi (Gutierrez-Pascual ve ark., 2007; Suzuki ve ark., 2008; Ezzat ve ark., 2010), E₂'ün gonodatropik hücrelerde, Kp'ne olan duyarlılığı arttırması (Ezzat ve ark., 2010), östrus siklus dönemlerine ve mevsime bağlı olarak Kiss1, Kiss1r ve Kp sisteminde değişiklikler, yapılan çalışmalarda LH artışı için gerekli Kp dozunu etkilediği düşünülmektedir.

Smith ve ark. (2009a) üreme döneminde çift doz PGF_{2α} ile senkronize edilen koyunlarda, uygulama sonu 24, 40. saat ile 10. günde, tek doz i.v 20 µg ve 250 µg Kp-10 uygulamasının LH artışına yol açtığını, ancak her iki dozda da 40. saat Kp-10 uygulamasının diğer uygulamalara göre LH salınımını daha etkili uyardığını tespit etmişlerdir. Smith ve ark. (2009a) 40. saat 20 ve 250 µg Kp-10 sonrasında LH

düzeşini 20 µg Kp grubunda 40.5. saatte 0.5-1 ng/ml, 41. saatte 0.5 ng/ml, 250 µg grubunda ise 40.5. saatte 1.5-1 ng/ml, 41. saatte 0.5-1 ng/ml ve uygulamayı takip eden 180. dk ise yaklaşık 0.5 ng/ml düzeyinde belirlemiştir. Uygulanan Kp dozu yükseldikçe hem salınan LH düzeyinin artması hem de LH'nin bazal düzeşine gerilemesinin daha uzun sürmesi, GnRH nöronlarının uyarılma kapasitesine bağılı olabilir. Koyunlarda luteal ve folliküler dönemde uygulanan Kp sonrasında salınan GnRH düzeyinin ve Kiss1r mRNA ekspresyonlarının benzer olduğı tespit edilmiştir (Smith ve ark., 2011). Bazı canlılarda Kp direkt olarak gonadotropoları etkilese de, hipotalamus ve hipofiz bağılantısı kesilmiş koyunlarda bu sonuç tespit edilememiştir (Smith ve ark., 2008a). Bu nedenle preovulatör dönemde Kp'nin daha yüksek LH artışına yol açması, gonodotropoların GnRH'a olan duyarlılığıın bu dönemde daha da artmasına bağılı olabilir.

Smith ve ark. (2011) sunulan araştırma ile benzer şekilde senkronize ettikleri koyunlara, uygulama sonu 40. saatte, benzer dozda (50 µg) Kp-10 uygulaması gerçekleştirmiş ve uygulamayı takip eden 30 ve 60. dk'da LH düzeyini yaklaşık 1.5 ve 0.5 ng/ml, 180.dk ise bazal düzeyde belirlemiştir. Yapılan araştırmada ise hem Kp-10 uygulanan gruplarda hem de kontrol grubunda 39, 40 ve 40.5 saatte tespit edilen LH düzeyi belirtilen çalışmalara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu yüksekliğıın ana sebebi preovulatör LH dalga artışının Pırlak ırkı koyunda daha erken başlaması olabilir. Tüm gruplarda 40.5 ve 41. saatte LH'nin bazal düzeyin üzerinde olmasından dolayı istatistiki bir önem belirlenemese de, 39. saatte Grup 1 ve Grup 2'de tespit edilen LH düzeyinin, 40.5 saatte yaklaşık 1 ng/ml artması, diğere çalışmalarda elde edilen artış düzeylerine benzerlik göstermektedir.

Çalışmalarda Kp uygulamasının preovulatör LH dalga başlangıcına yakın bir zamanda daha etkili olduğı bulgusuna ulaşılmış ancak preovulatör LH pikine yakın saatte uygulanan Kp-10'un etkisini araştıran çalışmaya rastlanılmamıştır. Sunulan araştırmada ise Grup 2'de 50. saatte preovulatör LH pik zamanına paralel uygulanan Kp-10'un, 50.5. saatte LH'nin ani bir pik yapmasına veya 49. saatte yüksek olan LH düzeyinin daha da artmasına yol açtığı belirlendi. Bu uygulama ile Grup 2'de 50.5. saatte tespit edilen LH düzeyi Grup 3'e göre 10 kat daha yüksek olduğı gözlemlendi. Bu

sonucun, pik zamanına yakın ya gonadotropoların GnRH'a olan duyarlılıklarının en üst düzeyde olması ya da folliküler dönemde gonadotropolarla direkt olarak etkisinin olmadığı tespit edilen Kp'nin, pik zamanında direkt olarak gonadotropoları etkilemesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Caraty ve ark. (2007) üreme döneminde, 0-14. gün CIDR ve 14. gün PGF_{2α} uygulanarak senkronize ettikleri koyunlara, uygulamayı takip eden 30. saatte başlayarak 8 saat boyunca aralıksız toplam 5000 µg (100 µg/kg) Kp-10 uygulaması gerçekleştirmiş, 32. saatte koyunlarda LH artışının başladığı, 10 saatlik bir sürede koyunların tamamında LH pikinin gerçekleştiğini, kontrol grubunda ise LH pikinin daha geç (44-60 saat) başladığını ve 64. saate kadar koyunlarda tespit edilen pik oranını % 55.5 olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan araştırmada ise gruplar arasında 64. saate kadar tespit edilen LH pik oranı, Grup 1'de % 95, Grup 2'de % 90 ve Grup 3'te % 80 olarak belirlendi. Grup 3'te tespit edilen bu oranının Caraty ve ark. (2007)'nin kontrol grubuna göre daha yüksek olmasının nedeni, başta ırk ve senkronizasyon farklılığına bağlı olarak Grup 3'ün preovulatör LH pikinin 64. saate kadar büyük oranda tamamlanması olabilir. Gruplar arasında 41-51. saatte Grup 1'de % 60, Grup 2'de % 80 ve Grup 3'te % 40 oranında LH pikinin gerçekleşmesi ve Grup 2'de sadece bir koyunda 55. saat itibarıyla LH piki gerçekleşirken, Grup 2'de 4 ve Grup 3'te 6 koyunda LH pikinin gerçekleşmesi, preovulatör LH dalga artışı ve bu artışı takip eden 10. saatte uygulanan Kp-10'un, LH pik dağılımını 10 saatlik bir zaman dilimi içerisinde senkronize ettiğini göstermektedir. Bu bulgu Caraty ve ark. (2007) yaptıkları çalışma ile kısmi paralellik gösterebilir, araştırmacıların aralıksız ve daha yüksek dozda Kp-10 uygulaması, yapılan araştırmaya göre çok daha kısa sürede LH pikini oluşturarak tüm koyunlarda preovulatör LH pikininin daha erken tamamlanmasına yol açmıştır.

Hipofizin GnRH'a cevap verme yeteneğinin, preovulatör LH dalgasının başladığı saatlerde daha çok arttığı belirtilmiştir (Smith ve ark., 2011). Östrüs başlangıcından ve preovulatör LH pikinden önce uygulanan GnRH'ın preovulatör LH artışını destekleyebileceği ancak uygulanan GnRH'ın, LH piki kendiliğinden gerçekleşmiş ise LH artışı için önemli bir etkisinin olmayacağı vurgulanmıştır (Perry

ve Perry, 2009). Bunun nedeni olarak; prevulatör LH salınımindaki artış ile birlikte dalga süresince gonadotroplarda pulsatil LH salınımı ve LH miktarını etkileyen sekretuar granül sayısı, depolanan LH düzeyi ve GnRH reseptör sayısının azalması kabul edilmektedir (Brooks ve ark., 1993; Taragnat ve ark., 1998; Crawford ve ark., 2000). Sunulan araştırmada Grup 1 ve 2’de, Kp-10 uygulama saati öncesinde LH piki ve dalgası gerçekleşmiş koyunlarda, uygulama sonrasında belirgin bir LH artışının tespit edilememesinin nedeni olarak, bu granüllerin LH dalgasına paralel olarak sayıca azalması veya depolanan LH’ın azalması ileri sürülebilir.

Sunulan projede, Kp-10 uygulamasının fertilité parametrelerini etkilemediği belirlendi. Koyun ve ineklerde preovulatör dönemde uygulanan GnRH veya hCG’nin, reproduktif parametreler üzerine olan etkilerine yönelik, farklı sonuçlar tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar GnRH veya hCG’nin reproduktif parametreleri etkilemediğini, bazıları yükselttiğini, bazıları ise azalttığını bildirmişlerdir (Lewis ve ark., 1990; Mee ve ark., 1993; Khan ve ark., 2003; Funston ve ark., 2005; Gómez-Brunet ve ark., 2007; Türk ve ark., 2008; Fields ve ark., 2009; Perry ve Perry, 2009; Paksoy ve Kalkan, 2010). İneklerde östrüs başlangıcından, 8-13 saat sonra uygulanan GnRH’ın, LH pulslarına bir etkisinin olmadığı bildirilmiş ancak daha geç saatte uygulanan GnRH’ın ovulasyon anında LH salınım sıklığını azaltarak kalitesiz CL’un şekillenmesine ve düşük düzeyde progesteron sekresyonuna yol açmasına bağlı olarak, gebelik oranını etkileyebileceği bildirilmiştir (Fields ve ark., 2009).

Uygun saat ve sayıda uygulanmayan GnRH, ovulasyon zamanında LH salınım sıklığında değişikliklere, hipofiz GnRH reseptör sayısının azalması sonucu LH düzeyinde düşmeye, hipofiz hücrelerinin pulsatil GnRH salınımına karşı duyarsızlaşmasına, CL’un gelişimi için gerekli LH salınım sıklığının ve LH düzeyinin olumsuz yönde etkilenmesine yol açabilir. Bu nedenle preovulatör dönemde uygulanan GnRH’ın fertilizasyon üzerinde farklı sonuçlara yol açması, çalışmalarda uygulanan GnRH’ın preovulatör LH dalgasının başlangıcına, ortasına ve bitiş dönemlerine denk gelmesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Bununla beraber GnRH veya hCG kullanımının ovulasyon ertelenmesi veya gecikmesi olan hayvanlarda gebelik oranını arttırdığı, özellikle repeat breeder,

sıcaklık stresi başta olmak üzere çeşitli stres faktörlerine maruz kalmış ineklerde gebelik oranını arttırdığı, uygun saatte uygulanan GnRH ve hCG'nin ovulasyon zamanlarındaki varyasyonların önüne geçerek sabit zamanlı tohumlama yapılan hayvanlarda gebelik oranını arttırabileceği belirtilmektedir (Stevenson ve ark., 1990; Kaim ve ark., 2003; De Rensis ve ark., 2008; Colazo ve ark., 2009; De Rensis ve ark., 2010). Sunulan bu araştırmada da hem gruplar arasında LH dalga artışı ve pikinin benzer saatte gerçekleşmesi hem de tüm gruplarda 48. saatte belirlenen bazal P₄ düzeyinin 72. saatte yaklaşık 2 kat artması, gruplar arasında ovulasyon özelliklerinin benzer olduğunu göstermektedir. Bu nedenle araştırmada kullanılan koyunlarda ovulasyon ertelenmesi gibi fertilitiyi olumsuz etkileyen durumlar ile karşılaşmadığı ya da kontrol grubunda ovulasyon gecikmesi olsa bile spermanın fertilizasyon saati içerisinde canlılığını koruması, gruplar arasında benzer fertilitite parametrelerine yol açmış olabilir. Bununla beraber Caraty ve ark. (2007), Kp-10 uygulamasını takip eden 5. günde Kp-10 ile kontrol grubunun ovaryumunda, benzer sayıda CL tespit etmesi, senkronizasyon sonu Kp-10 uygulamasının ovulasyon oranı üzerinde çarpıcı bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Bu araştırmada Grup 1 ($126,58 \pm 79,96$ ng/ml), Grup 2 ($168,05 \pm 132,91$ ng/ml), Grup 3'te ($83,05 \pm 82,89$ ng/ml) 55. saate kadar salınan toplam LH miktarı (AUC_LH55) istatistiksel olarak önemli bulundu. Grup 2'nin LH AUC düzeyinin kontrol grubuna göre 2 kat daha yüksek olması, Kp-10 uygulamasının potansiyel olarak LH salınımını arttırdığını göstermektedir. Logaritmik trapezoidal kurala göre hesaplanan LH AUC düzeyi, LH'nin dalga uzunluğuna ve pik düzeyinin yüksekliğine bağlı olarak değişmektedir. Grup 2' de hem LH pik düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olması hem de preovulatör LH dalga süresinin daha uzun olması, salınan LH miktarını arttırarak LH AUC düzeyinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına yol açmıştır. Benzer şekilde Grup 1'inde hem LH dalga uzunluğunun hem de LH pikinin kontrol grubuna göre daha yüksek olması LH AUC değerinin daha yüksek olmasına yol açtığı düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada Grup 2’de LH pik düzeyinin ve 64. saate kadar toplam salınan LH düzeyinin (AUC_LH64) kontrol grubuna göre 2 kat daha yüksek olmasına rağmen, reproduktif parametreler üzerine her hangi bir istatiki önemi tespit edilemedi. Bu durum LH pikinin ovulasyonu hangi ölçüde etkilediğinin veya ovulasyon için minimum LH düzeyinin ne olması gerektiğini düşündürmektedir. Mandalarda granuloza hücrelerine çok küçük düzeyde (1 ng/ml) LH uygulamasının, ovulasyon için gerekli olan LH reseptörü ile gen ekspresyonunu, 2 saat içerisinde arttırdığının ve LH uygulamasını takip eden 6 saat içinde bu gen ekspresyonunun pik yaparak 18 saat boyunca maksimum düzeyde olduğunun tespit edilmesi (Monga ve ark., 2011) ovulasyon için çok yüksek düzeylerde LH pikine gereksinim olmayabileceğini düşündürmektedir.

Ovulasyon ve CL’un formasyonu için LH pik düzeyinin yüksek veya düşük olmasından ziyade, preovulatör LH dalga uzunluğunun önemli olduğu, CL formasyonu için 10 saatlik bir preovulatör LH artışının yeterli olduğu belirtilmektedir (Mee ve ark., 1993, Schmitt ve ark., 1996, Kaim ve ark., 2003, Fields ve ark., 2012). Sunulan araştırmada, Kp uygulanan gruplarda preovulatör LH dalga süresinin kontrol grubuna göre 6 saat kadar daha uzun olmasına rağmen reproduktif parametreler arasında herhangi bir istatiki fark belirlenememiştir. Grup 3’te ovulasyon için yeterli uzunlukta (12 saat) LH artışının oluşması, benzer reproduktif parametrelerin nedeni olabilir.

Bu araştırmada gruplarda LH dalga artışının başlama saati, bazı araştırmacılara göre daha erken (Keisler ve ark., 1989; Souza ve ark., 1999), benzer (Kaya ve ark., 2005; Ben Said ve ark., 2007; Fair ve ark., 2007; Contreras-Solis ve ark., 2009a, 2009b; Salem ve ark., 2010) veya daha geç (Deaver ve ark., 1986; Menegatos ve ark., 2003) bir saatte, benzer şekilde LH pik saati de bazı araştırmacılara göre daha erken (Keisler ve ark., 1989; Dobson ve ark., 1997; Rubianes ve ark., 1997; Souza ve ark., 1999; Picazo ve ark., 2000; Yıldız ve ark., 2003) benzer (Contreras-Solis ve ark., 2009a) veya daha geç (Deaver ve ark., 1986; Kaya ve ark., 2005; Contreras-Solis ve ark., 2009b) bir saatte tespit edilmiştir. Koyunlarda E₂, hem gonadotropin sekretuar hücrelerini direkt olarak hem de hipotalamus GnRH hücrelerini uyarak

LH salınımı etkileyebilmesi, LH dalga başlangıcı için, E₂ yükselişinin önemli olduğunu göstermektedir. Koyunlarda GnRH'ın yokluğunda E₂'nin doza bağlı olarak LH salınımını arttırması, E₂'nin hipofiz gonadotrop hücrelerini direkt olarak etkilediğinin bir göstergesidir. Ancak E₂'nin preovulatör yükselişi hipofizdeki GnRH reseptörü için gerekli mRNA artışından sonra gerçekleşmesi, bu dönemde E₂ yükselişinden ziyade, dolaşımdaki P₄ düzeyindeki düşüş hızına bağlı olarak, hipofizde GnRH'a olan duyarlılığın artması sonucunda GnRH artışının gerçekleştiği öngörüsü hakimdir (Di Gregorio ve Nett, 1995; Nett ve ark., 2002). Bu nedenle yapılan çalışmalarda dolaşımda P₄ düzeyinin düşüş hızı ile E₂ düzeyinin yükseliş hızlarının farklı olması, çalışmalar arasındaki LH dalga başlangıç ve pik saatini etkileyerek farklı bulgular elde edilmesinin nedeni olabilir. Bununla beraber folliküler dönemde hipotalamus ve hipofizin, dolaşımdaki E₂ düzeyine cevap verme yeteneği ve uyarılma süresinin ırka bağlı olarak değiştiğinin tespit edilmesi (Ben Saïd ve ark., 2007), sunulan araştırma ile diğer çalışmalarda kullanılan ırkların farklı olması, LH dalga başlangıç saati başta olmak üzere preovulatör LH profilinde farklı bulguların elde edilmesinin nedeni olabilir.

Sunulan çalışmada Grup 1 ($24,68 \pm 11,69$ ng/ml), Grup 2 ($38,45 \pm 27,51$ ng/ml) ve Grup 3'te ($21,11 \pm 17,97$ ng/ml) tespit edilen LH pik düzeyi, bazı araştırmacıların elde ettikleri pik düzeyinden düşük (Acritopoulou ve Haresign, 1980; Keisler ve ark., 1989; Rubianes ve ark., 1997; Batista-Arteaga ve ark., 1998; Souza ve ark., 1999; Kaya ve ark., 2005), daha yüksek (Dobson ve ark., 1997), bazı araştırmacıların tespit ettikleri pik düzeyi Grup 1 ve 3' göre benzer (Contreras-Solis ve ark., 2009; Letelier ve ark., 2011) veya daha yüksek iken (Picazo ve ark., 2000) Grup 2'ye göre daha düşük olarak tespit edilmiştir. Koyunlarda ARC bölgesindeki hücrelerde ve median eminens'in GnRH nörosekretuar terminal liflerinde, GnRH ile Kp hücrelerinin kolonize halinde bulunması, hipofizer portal sisteme birlikte salınarak hipofiz gonadotroplarında bulunan GnRH/Kp reseptörlerini sinerji içerisinde uyardığı düşünülmektedir (Kotani ve ark., 2001; Pompolo ve ark., 2006; Smith ve ark., 2011). Bu görüşü, GnRH anti serumunun Kp'nin LH salgılatıcı etkisini bloke etmesi veya Kp antiserumunun GnRH'ı bloke etmesi, Kp ile GnRH'ın etkileşim içerisinde olduklarını destekler niteliktedir (Arreguin-Arevalo ve ark.,

2007; Roseweir ve ark., 2009, Pineda ve ark., 2010; Rişvanlı ve ark., 2010). Ayrıca Kp-10 uygulamasının, GnRH uygulamasına göre daha düşük düzeyde ancak daha kısa sürede LH pikine yol açması (Kadokawa ve ark., 2008) Kp'nin, GnRH nöronlarından hipofizer portal sistemine GnRH salınımını uyararak hipofizden LH salınımına yol açtığıın göstergesi olabilir. Sunulan araştırmada preovulatör LH pik zamanında uygulanan Kp, hipotalamustaki GnRH nöronlarını tetiklemiş, GnRH'ın gonadotrop lar üzerindeki uyarma gücünü arttırmış ve zaten bu dönemde yüksek olan GnRH ile birlikte gonadotrop hücrelerini etkiliyerek LH pik düzeyini arttırmış olabilir.

Bu araştırmada Grup 1 ($18,63 \pm 7,21$), Grup 2 ($18,03 \pm 5,00$) ve Grup 3'te ($12,55 \pm 6,93$) tespit edilen LH dalga süresi, bazı araştırmacıların (Quirke ve ark., 1979; Kaya ve ark., 2005) tespit ettikleri süreden daha uzun iken bazı araştırmacıların tespit ettikleri LH dalga süresi, Grup 1 ve 2'ye benzer olarak tespit edilmiştir (Contreras-Solis ve ark., 2009; Letelier ve ark., 2011). Hipofizin uyarılma derecesi ve süresi, depo tarzında salınan LH miktarı, LH'nin pik düzeyine çıkış ve bazal düzeye inme hızı, LH dalga süresini etkileyebilmektedir. Grup 1 ve 2'de LH dalga süresinin Grup 3'e göre daha uzun olması, 40. saatte uygulanan Kp'nin, GnRH hücrelerini etkilemesine veya bazal LH düzeyini yükseltmesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Koyunların follikül sayısını ve çapını, preovulatör follikül gelişimini, folliküler dönemdeki P₄ / E₂ düzeyini, hipotalamus ve hipofizde GnRH ve LH salınımında rol oynayan aktif hücre ve nöron sayılarını, nöronların uyarılma derecelerini, GnRH/LH salınım sıklığını etkileyen pek çok faktörün, preovulatör LH profilini etkilemesinden dolayı çalışmalar arasında farklı bulgulara yol açmış olabilir.

Letelier ve ark. (2011), 0-10.gün PGF_{2α} ve 0-14.gün FGA ile senkronize etkileri gruplarda LH dalga başlangıcını 50 ve 58. saatte, LH pikini 60 ve 65. saatte, LH dalga bitişini 68 ve 71. saatte, LH dalga süresini 17 ve 13 saat, LH pik düzeyini 23 ve 32 ng/ml, LH AUC düzeyini 145 ve 219 ng/ml, bazal LH düzeyini ise 0,55 ve 0,21 ng/ml olarak tespit etmesi, ayrıca Contreras-Solis ve ark. (2009b) ovulasyonu takip eden 3, 5, ve 7. günlerde PGF_{2α} uyguladıkları gruplarda uygulama sonu LH

dalga başlangıcını 30.0 ± 1.7 , 36.7 ± 2.6 , 42.9 ± 1.9 . saatte, LH pikini 36.7 ± 1.9 , 44.6 ± 2.4 , 50.9 ± 1.7 . saatte, LH dalga bitişini 48.0 ± 2.1 , 56.7 ± 2.4 , 60.7 ± 1.2 . saatte, LH dalga süresini 18.0 ± 0.9 , 20.0 ± 1.0 , 18.7 ± 1.3 saat, LH pik düzeyini 26.3 ± 2.5 , 28.0 ± 4.4 , 32.9 ± 4.8 ng/ml, LH AUC düzeyini 148.0 ± 20.4 , 165.4 ± 24.5 , 196.9 ± 29.1 ng/mL, bazal LH düzeyini ise 0.4 ± 0.1 , 0.6 ± 0.1 , 0.7 ± 0.1 ng/mL olarak tespit etmesi, senkronizasyon yönteminin folliküler gelişimi ve maturasyonu, LH dalgası öncesi P₄ düşüş hızı veya E₂ yükseliş zamanını, GnRH/LH salınım sıklığı artış zamanını etkilemesine bağlı olarak, preovulatör LH profilini etkileyebileceğini göstermektedir.

Temel olarak ırk ve senkronizasyon yönteminden etkilenen preovulatör LH profili stres (Martin ve ark., 2008; Pierce ve ark., 2009; Wagenmaker ve ark., 2009; Saifullizam ve ark., 2010), eCG kullanımı (Ainsworth ve ark., 1983), P₄ düzeyi (Husein ve Ababneh, 2008), E₂ düzeyi (Joseph ve ark., 1994; McDowell ve ark., 1998) beslenme ve yaştan da etkilenebilmesi yapılan araştırma ile çalışmalar arasındaki farklı bulguların nedeni olabilir.

Gruplar arasında östrüs'ta tespit edilen E₂ düzeyi, araştırmacıların tespit ettikleri E₂ düzeyinden büyük (Vinoles ve ark., 2001; Barrett ve ark., 2002; Gonzalez-Añover ve ark., 2007; Fair ve ark., 2007), benzer (Menegatos ve ark., 2003) veya küçük (Horoz ve ark., 1997, Ekiz ve Özcan, 2006) olarak belirlendi. Gruplarda 48. saatte yüksek olan E₂ düzeyi preovulatör LH dalgasının bitmesi ve P₄ düzeyinin yükselmesi ile 72. saate düşmüştür. Gruplar arasında 24, 48, 72. saatler tespit edilen E₂'ün bu profili, yapılan diğer araştırmalar ile paralellik göstermektedir (Bartlewski ve ark., 1999c; González-Bulnes ve ark., 2003; Gonzalez-Añover ve ark., 2007). Irk ve senkronizasyon yönteminin follikülerin sayısını ve büyüme hızını etkileyerek, preovulatör dönemde E₂ düzeyi ile E₂'nin hormonal profilini etkileyebileceği tespit edilmiştir (Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005; Fair ve ark., 2007; Gonzalez-Añover ve ark., 2007). Koyunlarda östrüs boyunca E₂ düzeyinin azalıp artarak dalgalı bir profil gösterdiği ve E₂ düzeyinde bireysel varyasyonların oldukça çok olduğu belirtilmiştir (Worsfold ve ark., 1986; Menegatos ve ark., 2003; Ekiz ve Özcan, 2006; Saifullizam ve ark., 2010). Irk ve senkronizasyon farklılığı ile östrüs boyunca E₂ düzeyinin

dalgalanması, tespit edilen saatlerde E₂ düzeyini ve hormonal profili etkilemesine bağlı olarak çalışmalarda farklı E₂ düzeyinin nedeni olabilir.

Gruplar arasında 24, 48 ve 72. saatte tespit edilen P₄ düzeyi, bazı araştışıcıların tespit ettikleri P₄ düzeyinden büyük (Karen ve ark., 2003; Ekiz ve Özcan, 2006;) veya benzer (Alexander ve ark., 2008; Ali ve ark., 2009) olduğu tespit edildi. Gruplar arasında uygulama sonu P₄ düzeyi 24 saat içerisinde hızla düşerek 1ng/ml'nin altına düşmüş 24, 48 ve 72. saatlerin hormonal profili diğer araştışmaların bulguları ile paralellik göstermektedir (Batista-Arteaga ve ark.1998; Godfrey ve ark., 1999; Husein ve Haddad, 2006; Husein ve Ababneh, 2008; Letelier ve ark., 2009). Araştışmada gebe olan koyunların P₄ düzeyi 3 ng/ml'nin üzerinde iken gebe olmayan koyunların 1ng/ml düzeyinin altında tespit edilmesi araştışıcıların bulguları ile paralellik göstermektedir (Karen ve ark., 2003; Husein ve Haddad, 2006; Alexander ve ark., 2008; Barbato ve ark., 2009). Progesteron düzeyi ırk (Bartlewski ve ark., 1999b., Kaulfuss ve ark., 2006), mevsim (Kaulfuss ve ark., 2006), CL ve fôtus sayısı (Kalkan ve ark., 1996) ve senkronizasyon yöntemine göre değişebileceği ileri sürülmektedir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, 10 gün ara ile 250 µg cloprostenol ile östrüs senkronizasyonu yapılan Pırlak ırkı koyunlarda, senkronizasyon sonu 40. ve 50. saatlerde 1 µg/kg uygulanan Kp-10'un, salınan LH miktarını arttırdığı, grup içi preovulatör LH dalgasını belirli bir zaman içerisinde topladığı belirlendi. Araştırmada Kp'nin reproduktif parametreler üzerinde bir etkisi tespit edilemedi. Ovulasyon ertelenmesi, gecikmesi veya ovulasyon saati oldukça dağınık olan sürülerde Kp-10'un ovulasyonları senkronize ederek, özellikle sabit zamanlı suni tohumlama ve biyoteknolojik çalışmalarda reproduktif parametreleri yükseltebileceği kanısına varıldı.

ÖZET

Kisspeptinin Koyunlarda Bazı Reprodüktif Parametrelere Etkisi

Bu çalışmada, Kp-10 uygulamasının koyunlarda bazı reprodüktif parametreler ile preovulatör LH profili üzerine olan etkileri araştırıldı. Materyal olarak benzer yaş ve ağırlıkta 60 pırlak koyunu kullanıldı. Koyunlar her grupta 20 koyun olacak şekilde rastgale 3 gruba ayrıldı. Koyunların östrüs siklusu üreme döneminde, 10 gün ara ile çift doz PGF₂ α (cloprostenol 250 µg, i.m) uygulaması yapılarak senkronize edildi. Grup 1'e, ikinci PGF₂ α enjeksiyonu takip eden 40. saatte bir kez Kp-10 (1 µg/kg, i.v) uygulanırken, Grup 2'ye 40 ve 50. saat olmak üzere iki kez Kp-10 (1 µg/kg, i.v) uygulaması gerçekleştirildi. Grup 3'e ise Kp-10 uygulaması yapılmadı. Tüm gruplardaki koyunlar 42-43. saatler içerisinde elde sıfat yöntemiyle koç ile çiftleştirildi.

Grup 2'nin 50.5 saat plazma LH düzeyi (22,06 ± 28,90 ng/ml) Grup 1 (9,15 ± 11,44) ve Grup 3'e (2,27 ± 3,12) göre daha yüksek bulundu (p=0.005). Preovulatör LH dalga başlangıcı ve LH pik zamanı tüm gruplarda benzer saatte gerçekleşti. Grup 2'nin (38,45 ± 27,51) preovulatör LH pik düzeyi Grup 1 (24,68 ± 11,69) ve Grup 3'e (21,11 ± 17,97 ng/ml) göre daha yüksek tespit edildi (p= 0.030). Grup 1, 2 ve 3'te LH dalga süresi sırasıyla 18,63 ± 7,21, 18,03 ± 5,00 and 12,55 ± 6,93 saat (p= 0.009) olarak belirlendi. Grup 1 (126,58 ± 79,96) ve Grup 2'nin (168,05 ± 132,91) 55. saat LH AUC düzeyi grup 3'e (83,05 ± 82,89) göre daha yüksek bulundu (p= 0.042).

Gruplar arasında P₄ ve E₂ hormon profilleri benzer olarak tespit edildi. Gebelik tanısı çiftleşmeyi takip eden 30 ve 60. günlerde ultrasonografi (Real-Time, B-mode 6.0/8.0 MHz) ile gerçekleştirildi. Tüm gruplarda gebelik, proliferasyon ve fekdasyon oranları benzer olarak tespit edildi.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada Kp-10 uygulamasının LH profilini istatistiksel açıdan önemli derecede değiştirdiği ancak reprodüktif parametreleri etkilemediği belirlendi.

Anahtar kelimeler: kisspeptin, koyun, Pırlak, preovulatör LH, reprodüktif parameterler.

SUMMARY

The Effects of Kisspeptin to Some Reproductive Parameters in Ewes

In this study, it was investigated, the effects of the administrations of Kp-10 on some reproductive parameters and preovulatory LH profiles in ewes. As the materials of this study, 60 Pirlak ewes of similar age and weight were used. Ewes were randomly allocated into 3 experimental groups including 20 ewes in each. Estrous cycles were synchronized by an PGF₂ α (cloprostenol 250 μ g, i.m) which was administered twice, 10 days apart in the breeding season. Following a second cloprostenol injection, the Group 1 was treated with kisspeptin-10 (1 μ g / kg) once at 40th h but the Group 2 was treated with Kp-10 (1 μ g / kg) twice at 40th and 50th h. The Group 3 was not treated with Kp-10. All group of ewes were mated with ram at 42-43rd by hand mating system.

Group 2 ($22,06 \pm 28,90$ ng/ml) plasma levels of LH at 50.5 h was found higher than Group 1 ($9,15 \pm 11,44$) and Group 3 ($2,27 \pm 3,12$) ($p=0.005$). Onset of LH surge and peak time of LH occurred similar time in all groups. Preovulatory LH peak concentration of Group 2 ($38,45 \pm 27,51$) was found higher than Group 1 ($24,68 \pm 11,69$) and Group 3 ($21,11 \pm 17,97$ ng/ml) ($p= 0.030$). Duration of LH surge was $18,63 \pm 7,21$, $18,03 \pm 5,00$ and $12,55 \pm 6,93$ h respectively in Group 1, 2 and 3 ($p= 0.009$). Levels of LH AUC at 55 h Group 1 ($126,58 \pm 79,96$) and Group 2 ($168,05 \pm 132,91$) higher than group 3 ($83,05 \pm 82,89$) ($p= 0.042$).

All of Group's P4 and E2 hormone profiles were found to be similar. Pregnancy diagnosis was performed on day 30 and 60 post-mating by means of (B-mode real time) ultrasonography. In all group, rates of conception, prolificacy and fecundity were found to be similar.

As a result, in this study, it is identified that Kp-10 administration had statistically significant alteration some LH profiles but has no effect on reproductive parameters.

Key Words: Ewe, Kisspeptin, Pirlak, Preovulatory LH, Reproductive parameters.

6. KAYNAKLAR

- ABECIA, J.A., FORCADA, F., GONZÁLEZ-BULNES, A. (2011). Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **27(1)**: 67-79.
- ACOSTA, T.J., MIYAMOTO, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.* **82**: 127-140.
- ACRITOPOULOU, S., HARESIGN, W. (1980). Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 alpha given at different stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* **58**: 219-223.
- AINSWORTH, L., LACHANCE, R., LABRIE, F. (1983). Effects of progestagen treatments and PMSG on the induction of the preovulatory LH discharge in ewes. *Anim Reprod Sci* **5(4)**: 281-286.
- ALAÇAM, E. (2001). Üremenin Kontrolü. "Evcil Hayvanlarda Doğum ve infertilite. Alaçam E (Editör).Üçüncü Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara. 71-81.
- ALAÇAM, E., AY, S., SABAN, E. (2009). İnek, koyun ve köpeklerde değişik radioimmunoassay progesteron ölçüm kitlelerinin reproduktif sürecin farklı evrelerinde değerlendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* **56**: 37-41.
- ALECOZAY, A.A., SELCER K, W., CLARK, J.R., BURNS, J.M., NORMAN, R.L., NISWENDER, G.D., LEAVITT, W.W. (1988). Pattern of ovarian progesterone secretion during the luteal phase of the ovine estrous cycle. *Biol Reprod.* **39(2)**: 287-94.
- ALEXANDER, B., COPPOLA, G., MASTROMONACO, G.F., JOHNE, S.T., REYES, E.R., BETTS, D.H., KING, W.A. (2008). Early Pregnancy Diagnosis by Serum Progesterone and Ultrasound in Sheep Carrying Somatic Cell Nuclear Transfer-Derived Pregnancies. *Reprod Domest Anim.* **43(2)**: 207-11.
- AL-GUBORY, K.H., HERVEU, J., FOWLER, P.A. (2003). Effects of pregnancy on pulsatile secretion of LH and gonadotrophin-releasing hormone-induced LH release in sheep: a longitudinal study. *Reproduction.* **125(3)**: 347-55.
- ALI, A. (2007). Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. *Small Rum. Research* **72**, 33-37.
- ALI, A., HAYDER, M., SAIFELNASER, E.O. (2009). Ultrasonographic and endocrine evaluation of three regimes for oestrus and ovulation synchronization for sheep in the subtropics. *Reprod Domest Anim.* **44(6)**: 873-878.
- ALLISON, A.J., KELLY, R.W. (1978). Synchronisation of oestrus and fertility in sheep treated with progestagen-impregnated implants, and prostaglandins with or without intravaginal sponges and subcutaneous pregnant mare's serum. *New. Zeal. J. Agr. Res.* **21**, 389-393.

- AL-MERESTANI, M.R., ZARKAWI, M., WARDEH, M. (1999). Early Breeding and Pregnancy Diagnosis in Syrian Awassi Sheep Yearlings. *Reprod Dom Anim* **34**:413-416.
- ALNIMER, M., TABBAA, M.J., AMASHEH, M., ALZYOUD, H. (2005). Hormonal treatments and the ram effect on synchronised oestrus in Awassi ewes at the beginning of the breeding season. *New. Zeal. J. Agr. Res.* **48**: 473–480.
- ANDERSSON, H. (2008). Clinical Reproductive Endocrinology. Ed: KANEKO, J., HARVEY, J., BRUSS, M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Chapter:21, 6th Edition, Elsevier, USA.
- ARAI, A.C., XIA, Y.F., SUZUKI, E., KESSLER, M., CIVELLI, O., NOTHACKER, H.P. (2005). Cancer metastasis-suppressing peptide metastatin upregulates excitatory synaptic transmission in hippocampal dentate granule cells. *J Neurophysiol.* **94(5)**: 3648-3652.
- ARREGUÍN-AREVALO, J.A., LENTS, C.A., FARMERIE, T.A., NETT, T.M., CLAY, C.M. (2007). KiSS-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci.* **101(3-4)**:265-75.
- ATAMAN, M.B., AKÖZ, M. (2005). Koyunlarda diöstrüsün farklı günlerinde enjekte edilen prostaglandin F_{2α}'nın enjeksiyon-östrüs, enjeksiyon-ovulasyon aralığı ve fertilité üzerine etkisi. *SÜ Vet Bil Derg.* **21**:79–82.
- ATAMAN, M.B., AKÖZ, M. (2006). GnRH-Pgf_{2α} and Pgf_{2α}-Pgf_{2α} Synchronization in Akkaraman Cross-Bred Sheep in the Breeding Season. *Bull Vet Inst Pulawy* **50**:101-104,
- ATKINSON, S., ADAMS, N.R., MARTIN, G.B. (1989). LH, FSH and ovulation rate in ewes treated with exogenous oestradiol. *J Reprod Fertil* **86**: 383-390.
- AWEL, H., ESHETU, L., TADESSE, G., BIRHANU, A., KHAR, S.K. (2009). Estrus synchronization in sheep with synthetic progestagens. *Trop Anim Health Prod.* **41(7)**: 1521-4.
- BABY, T.E., BARTLEWSKI, P.M. (2011). Progesterone as the driving regulatory force behind serum FSH concentrations and antral follicular development in cycling ewes. *Reprod Fertil Dev.* **23(2)**: 303-10.
- BACKHOLER, K., BOWDEN, M., GAMBER, K., BJØRBAEK, C., IQBAL, J., CLARKE, I.J. (2010a). Melanocortins mimic the effects of leptin to restore reproductive function in lean hypogonadotropic ewes *Neuroendocrinology.* **91(1)**: 27-40.
- BACKHOLER, K., SMITH, J.T., RAO, A., PEREIRA, A., IQBAL, J., OGAWA, S., LI, Q., CLARKE, I.J. (2010b). Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* **151**: 2233–2243.
- BAIRD, D.T. (1978). Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol Reprod* **18**: 359-364.
- BARBATO, O., SOUSA, N.M., DEBENEDETTI, A., CANALI, C., TODINI, L., BECKERS, J.F. (2009). Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. *Theriogenology* **72(7)**: 993-1000.

- BARRETT, D.M., BARTLEWSKI, P.M., COOK, S.J., RAWLINGS, N.C. (2002). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF₂alpha given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* **58**: 1409–1424.
- BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., COOK, S.J., RAWLINGS, N.C. (1998). Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil*. **113(2)**: 275-85.
- BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., COOK, S.J., CHANDOLIA, R.K., HONARAMOOZ, A., RAWLINGS, N.C. (1999a). Ovarian antral follicular Dynamics and their relationships with endocrinem variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Fertil* **115**: 111-124
- BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., RAWLINGS, N.C. (1999b). An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology* **52**: 115-130.
- BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., RAWLINGS, N.C. (1999c). Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. *Anim Reprod Sci*. **57(1-2)**:67-88.
- BARTLEWSKI, P.M., BEARD, A.P., RAWLINGS, N.C. (2000). An ultrasound-aided study of temporal relationships between the patterns of LH/FSH secretion, development of ovulatory-sized antral follicles and formation of corpora lutea in ewes. *Theriogenology*. **54(2)**: 229-45.
- BARTLEWSKI, P.M., VANDERPOL, J., BEARD, A.P., COOK, S.J., RAWLINGS, N.C. (2000). Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim Reprod Sci* **58(3-4)**: 273-291.
- BARTLEWSKI, P.M., BABY, T.E., GIFFIN, J.L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Anim Reprod Sci*. **124(3-4)**:259-68.
- BATAILLER, M., CARATY, A., MALPAUX, B., TILLET, Y. (2004). Neuroanatomical organization of gonadotropin-releasing hormone neurons during the oestrus cycle in the ewe. *BMC Neurosci*. **5(46)** 1-8.
- BATISTA-ARTEAGA, M., GONZÁLEZ-VALLE, F., GRACIA-MOLINA, A. (1998). Follicular Quality and Hormonal Relationships (LH and progesterone) during the Follicular Phase of the Oestrous Cycle in the Canarian Ewe. *Reprod Dom Anim* **33**, 325-330.
- BAZER, F.W., SPENCER, T.E., OTT, T.L. (1997). Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol*. **37(6)**: 412-20.
- BEARDEN, H.J., FUGUAY, J.W. (2000). Applied animal reproduction 5^h ed.chapter 5.
- BECK, N.F.G., JONES, M., DAVIES, B., PETERS, A.R., WILLIAMS, S.P. (1996). Oestrus synchronization in ewes: the effect of combining a prostaglandin with a GnRH agonist (buserelin), *Anim Sci*. **62**, 85–87.
- BEN SAID, S., LOMET, D., CHESNEAU, D., LARDIC, L., CANEPA, S., GUILLAUME, D., BRIANT, C., FABRE-NYS, C., CARATY, A. (2007). Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biol Reprod*. **76(4)**: 673-680.

- BERLINGUER, F., GONZALEZ-BULNES, A., SUCCU, S., LEONI, G., MOSSA, F., BEBBERE, D., ARIZNAVARETA, C., TRESGUERRES, J.A., VEIGA-LOPEZ, A., NAITANA, S. (2007). Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. *Domest Anim Endocrinol.* **32(4)**: 303-14.
- BINDON, B.M., BLANC, M.R., PELLETIER, J., TERQUI, M., THIMONIER, J. (1979). Periovarian gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. *J Reprod Fertil* **55**: 15–25.
- BISTER, J.L., NOEL, B., PERRAD, B., MANDIKI, S.N., MBAYAHAGA, J., PAQUAY, R. (1999). Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Dom Anim Endocrinol* **17**: 315-328.
- BOGUSZ, A.L., HARDY, S.L., LEHMAN, M.N., CONNORS, J.M., HILEMAN, S.M., SLIWOWSKA, J.H., BILLINGS, H.J., MCMANUS, C.J., VALENT, M., SINGH, S.R., NESTOR, C.C., COOLEN, L.M., GOODMAN, R.L. (2008). Evidence that γ -Aminobutyric Acid Is Part of the Neural Circuit Mediating Estradiol Negative Feedback in Anestrous Ewes. *Endocrinology* **149(6)**: 2762–2772.
- BOSCOS, C.M., SAMARTZI, F.C., LYMBEROPOULOS, A.G., STEFANAKIS, A., BELIBASAKI, S. (2003). Assessment of progesterone concentration using enzymeimmunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. *Reprod Dom Anim* **38**, 170–174.
- BREEN, K.M., STACKPOLE, C.A., CLARKE, I.J., PYTIAK, A.V., TILBROOK, A.J., WAGENMAKER, E.R., YOUNG, E.A., KARSCH, F.J. (2004). Does the type II glucocorticoid receptor mediate cortisol-induced suppression in pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone? *Endocrinology* **145**: 2739–46.
- BREEN, K.M., BILLINGS, H.J., WAGENMAKER, E.R., WESSINGER, E.W., KARSCH, F.J. (2005). Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. *Endocrinology*. **146**: 2107–1215.
- BROOKS, J., TAYLOR, P.L., SAUNDERS, P.T., EIDNEKA STRUTHERS, W.J., MCNEILLY, A.S. (1993). Cloning and sequencing of the sheep pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor and changes in expression of its mRNA during the estrous cycle. *Mol Cell Endocrinol* **94**: 23–27.
- CAHILL, L.P., SAUMANDE, J., RAVVAULT, J.P., BLANC, M., THIMONIER, J., MARIANA, J.C., MAULEON, P. (1981). Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fertil* **62**: 141–150.
- CAMPBELL, B.K., DOBSON, H., BAIRD, D.T., SCARAMUZZI, R.J. (1999). Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep *J Reprod Fertil.* **117(2)**: 355-67.
- CAMPBELL, R.E. (2007). Defining the gonadotrophin-releasing hormone neuronal network: transgenic approaches to understanding neurocircuitry *J Neuroendocrinol.* **19(7)**: 561-73.
- CARATY, A., FABRENYS, C., DELALEU, B., LOCATELLI, A., BRUNEAU, G., KARSCH, F. (1998). Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology.* **139**: 1752–60.

- CARATY, A., SKINNER, D.C. (1999). Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*. **140(1)**: 165-70.
- CARATY, A., SMITH, J.T., LOMET, D., BEN SAÏD, S., MORRISSEY, A., COGNIE, J., DOUGHTON, B., BARIL, G., BRIANT, C., CLARKE, I.J. (2007). Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*. **148(11)**: 5258-5267.
- CARATY, A., FRANCESCHINI, I. (2008). Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: potential applications for better control of fertility in females. *Reprod Domest Anim*. **43(2)**: 172-178.
- CARATY, A., FRANCESCHINI, I., HOFFMAN, G.E. (2010). Kisspeptin and the preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe: basic aspects and potential applications in the control of ovulation *J Neuroendocrinol*. **22(7)**: 710-715.
- CÁRDENAS, H., WILEY, T.M., POPE, W.F. (2004). Prostaglandin F2 alpha induced estrus in ewes exhibiting estrous cycles of different duration. *Theriogenology* **62(1)**: 123-129.
- CASTELLANO, J.M., GAYTAN, M., ROA, J., VIGO, E., NAVARRO, V.M., BELLIDO, C., DIEGUEZ, C., AGUILAR, E., SÁNCHEZ-CRIADO, J.E., PELLICER, A., PINILLA, L., GAYTAN, F., TENA-SEMPERE, M. (2006). Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*. **147(10)**: 4852-62.
- CASTELLANO, J.M., ROA, J., LUQUE, R.M., DIEGUEZ, C., AGUILAR, E., PINILLA, L., TENA-SEMPERE, M. (2009). KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. *Peptides* **30**: 139–145.
- CHENG, G., COOLEN, L.M., PADMANABHAN, V., GOODMAN, R.L., LEHMAN, M.N. (2010). The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep *Endocrinology*. **151(1)**: 301-311.
- CHRISTIAN, C.A., KENNEY, C.J., JAMESON, L., MOENTER, S.M. (2008). Classical Estrogen Receptor Signaling Mediates Negative and Positive Feedback on Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Firing *Endocrinology* **149(11)**: 5328–5334.
- CHRISTIAN, C.A., MOENTER, S.M. (2010). The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev*. **31**: 544-77.
- CHU, Z., ANDRADE, J., SHUPNIK, M.A., MOENTER, S.M. (2009). Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *J Neurosci*. **29(17)**: 5616-27.
- CIECHANOWSKA, M., LAPOT, M., MATEUSIAK, K., PRZEKOP, F. (2010). Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. *Reprod Biol*. **10(2)**: 85-124.
- CLARKE, I.J., FINDLAY, J.K., CUMMINS, J.T., EVANS, W.J. (1986). Effects of ovine follicular fluid on plasma LH and FSH secretion in ovariectomised ewes to indicate the site of action of inhibin. *J Reprod Fertil* **77**: 575-585.

- CLARKE, I.J., QI, Y., PUSPITA SARI, I., SMITH, J.T. (2009a). Evidence that RF-amid related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol.* **30(3)**: 371-378.
- CLARKE, I.J., SMITH, J.T., CARATY, A., GOODMAN, L.R., LEHMAN, M. (2009b). Kisspeptin and seasonality in sheep. *Peptides* **30**: 154–163.
- CLARKE, I.J. (2011). Control of GnRH secretion: One step back. *Front Neuroendocrinol.*, **32(3)**: 367-375
- CLARKSON, J., HAN, S.K., LIU, X., LEE, K., HERBISON, A.E. (2010). Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. *Mol Cell Endocrinol* **324(1-2)**: 45-50.
- CLAYTON, R.N., SOLANO, A.R., GARCIA-VELA, A., DUFAU, M.L., CATT, K.J. (1980). Regulation of pituitary receptors for gonadotropin releasing hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **107**: 699–706.
- COLAZO MG, REE TO, EMMANUEL DG, AMBROSE DJ. (2009). Plasma luteinizing hormone concentrations in cows given repeated treatments or three different doses of gonadotropin releasing hormone. *Theriogenology*.**71(6)**:984-92.
- CONTRERAS-SOLIS, I., VASQUEZ, B., DIAZ, T., LETELIER, C., LOPEZ-SEBASTIAN, A., GONZALEZ-BULNES, A. (2009a). Ovarian and endocrine responses in tropical sheep treated with reduced doses of cloprostenol. *Anim Reprod Sci.* **114(4)**: 384-92.
- CONTRERAS-SOLIS, I., VASQUEZ, B., DIAZ, T., LETELIER, C., LOPEZ-SEBASTIAN, A., GONZALEZ-BULNES, A. (2009b). Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and "male effect". *Theriogenology*.**71(6)**: 1018-25
- CRAWFORD, J.L, CURRIE, R.J, MCNEILLY, A.S. (2000) Replenishment of LH stores of gonadotrophs in relation to gene expression, synthesis and secretion of LH after the preovulatory phase of the sheep oestrous cycle. *J Endocrinol.*;**167(3)**:453-463.
- CRAWFORD, J.L., MCNEILLY, J.R., MCNEILLY, A.S. (2004). No Evidence for Pituitary Priming to Gonadotropin-Releasing Hormone in Relation to Luteinizing Hormone (LH) Secretion Prior to the Preovulatory LH Surge in Ewes *Biol Reprod* **71**: 224–235.
- DARDENTE, H., BIRNIE, M., LINCOLN, G.A., HAZLERIGG, D.G. (2008). RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol.* **20(11)**: 1252-1259.
- DE RENSIS, F., VALENTINI, R., GORRIERI, F., BOTTARELI, E., LOPEZ-GATIUS, F. (2008). Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. *Theriogenology*. **69**:1077–1082
- DE RENSIS, F., LÓPEZ-GATIUS, F., GARCÍA-ISPIERTO, I., TECHAKUMPU, M. (2010). Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: an update. *Theriogenology*. **73(8)**:1001-1008.

- DE ROUX, N., GENIN, E., CAREL, J.C., MATSUDA, F., CHAUSSAIN, J.L., MILGROM, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* **100(19)**: 10972-6.
- DEAVER, D.R., STILLEY, N.J., DAILEY, R.A., INSKEEP, E.K., LEWIS, P.E. (1986). Concentrations of ovarian and pituitary hormones following prostaglandin F₂ alpha-induced luteal regression in ewes varies with day of the estrous cycle at treatment. *J Anim Sci.* **62(2)**: 422-7.
- DELGADILLO, J.A., GELEZ, H., UNGERFELD, R., HAWKEN, P.A., MARTIN, G.B. (2009). The 'male effect' in sheep and goats--revisiting the dogmas. *Behav Brain Res.* **200(2)**: 304-14.
- DÍ GREGORIO, G.B., NETT, T.M. (1995). Estradiol and progesterone influence the synthesis of gonadotropins in the absence of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod.* **53**:166–72
- DHILLO, W.S., CHAUDHRI, O.B., THOMPSON, E.L., MURPHY, K.G., PATTERSON, M., RAMACHANDRAN, R., NIJHER, G.K., AMBER, V., KOKKINOS, A., DONALDSON, M., GHATEI, M.A., BLOOM, S.R., (2007). Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**: 3958–3966.
- DOBSON, H., CAMPBELL, B.K., SCARAMUZZI, R.J. (1997). Use of a GnRH antagonist in conjunction with low amplitude, high frequency LH pulses to induce follicular growth without an LH surge and ovulation in ewes. *Anim Reprod Sci.* **46(3-4)**: 213-222.
- DOGAN, I., NUR, Z. (1996). Different estrous induction methods during the non-breeding season in Kivircik ewes. *Veterinari Medicina*, **51(4)**: 133–138.
- DRIANCOURT, M.A., FÉVRE, J., MARTAL, J., AL-GUBORY, K.H. (2000). Control of ovarian follicular growth and maturation by the corpus luteum and the placenta during pregnancy in sheep *J Reprod Fertil.* **120(1)**: 151-8
- DRIANCOURT, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm a manipulation of reproduction. *Theriogenology* **55**: 1211-1239.
- DUGGAVATHI, R., BARTLEWSKI, P.M., BARRETT, D.M., GRATTON, C., BAGU, E.T., RAWLINGS, N.C. (2004). Patterns of antral follicular wave dynamics and accompanying endocrine changes in cyclic and seasonally anestrous ewes treated with exogenous ovine follicle-stimulating hormone during the interwave interval. *Biol Reprod* **70**: 821-827.
- DUGGAVATHI, R., BARTLEWSKI, P.M., BARRETT, D., BAGU, E., RAWLINGS, N.C. (2008). Short- and Long-Term Effects of Unilateral Ovariectomy in Sheep: Causative Mechanisms. *Biology of reproduction* **78**: 490–496.
- DUNGAN, H.M., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. (2006). Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion *Endocrinology.* **147(3)**: 1154-8.

- EKİZ, E.E., ÖZCAN, M. (2006). Sexual behavior and hormone levels of Kıvırcık ewes after estrus synchronization during and out of the breeding season. *Arch. Tierz. Dummerstorf* **49 (6)**: 583-592
- EKİZ, E.E., MATUR, E., ARSLAN, M., AKYAZI, I., ÖZCAN, M. (2009). Influence of ram presence (permanent vs. intermittent) on estrus parameters and behaviours in Kıvırcık ewes. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* **116(7)**: 260-5.
- EMSEN, E., GIMENEZ-DIAZ, C., KUTLUCA, M., KOYCEGIZ, F. (2011). Reproductive response of ewes synchronized with different lengths of MGA treatments in intrauterine insemination program. *Anim Reprod Sci.* **126(1-2)**: 57-60.
- ESTRADA, K.M., CLAY, C.M., POMPOLO, S., SMITH, J.T., CLARKE, I.J. (2006). Elevated KiSS-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback, *J. Neuroendocrinol.* **18**: 806–809
- EVANS, A.C.O., DUFFY, P., HYNES, N., BOLAND, M.P. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* **53**: 699-715.
- EVANS, A.C. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci.* **78(3-4)**: 289-306.
- EVANS, A.C., DUFFY, P., CROSBY, T.F., HAWKEN, P.A., BOLAND, M.P., BEARD, A.P. (2004). Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus synchronisation and fertility during the breeding season in ewes *Anim Reprod Sci* **84(3-4)**: 349-58.
- EZZAT, A.A., SAİTO, H., SAWADA, T., YAEGASHİ, T., GOTO, Y., NAKAJİMA, Y., JİN, J., YAMASHİTA, T., SAWAI, K., HASHİZUME, T. (2010). The role of sexual steroid hormones in the direct stimulation by Kisspeptin-10 of the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin from bovine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci.* **121(3-4)**:267-72
- FAIR, S., HANRAHAN, J.P., O'MEARA, C.M., DUFFY, P., RIZOS, D., WADE, M., DONOVAN, A., BOLAND, M.P., LONERGAN, P., EVANS, A.C. (2005). Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology.* **63(7)**: 1995-2005.
- FAIR, S., HANRAHAN, J.P., DONOVAN, A., DUFFY, P., O'MEARA, C.M., LONERGAN, P., EVANS, A.C. (2007). Hormonal relationships during the periovulatory period among ewe breeds known to differ in fertility after cervical artificial insemination with frozen thawed semen. *Anim Reprod Sci.* **97(3-4)**: 284-294.
- FIELDS, S.D., PERRY, B.L., PERRY, G.A. (2009). Effects of GnRH treatment on initiation of pulses of LH, LH release, and subsequent concentrations of progesterone *Domest Anim Endocrinol.* **37(4)**:189-195.
- FIELDS, S.D., GEBHART, K.L, PERRY, B.L., GONDA, M.G., WRIGHT, C.L., BOTT, R.C., PERRY, G.A. (2012). Influence of standing estrus before an injection of GnRH during a beef cattle fixed-time AI protocol on LH release, subsequent concentrations of progesterone, and steroidogenic enzyme expression. *Domest Anim Endocrinol.* **42(1)**:11-19.

- FIERRO, S., OLIVERA-MUZANTE, J., GIL, J., VIÑOLES, C. (2011). Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology*. **76(4)**: 630-639.
- FORADORI, C.D., COOLEN, L.M., FITZGERALD, M.E., SKINNER, D.C., GOODMAN, R.L., LEHMAN, M.N. (2002). Colocalization of progesterone receptors in parvocellular dynorphin neurons of the ovine preoptic area and hypothalamus. *Endocrinology*. **143(11)**: 4366-4374.
- FORADORI, C.D., GOODMAN, R.L., ADAMS, V.L., VALENT, M., LEHMAN, M.N. (2005). Progesterone increases dynorphin concentrations in cerebrospinal fluid and preprodynorphin messenger ribonucleic acid levels in a subset of dynorphin neurons in the sheep. *Endocrinology* **146**: 1835–1842.
- FOSTER, D.L., OLSTER, D.H., (1985). Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb patterns of tonic luteinising hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology* **116**, 375–381.
- FRANCESCHINI, I., LOMET, D., CATEAU, M., DELSOL, G., TILLET, Y., CARATY, A. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett*. **401(3)**: 225-30.
- FU, L.Y., VAN DEN POL, A.N. (2010). Kisspeptin Directly Excites Anorexigenic Proopiomelanocortin Neurons but Inhibits Orexigenic Neuropeptide Y Cells by an Indirect Synaptic Mechanism *J Neurosci*. **30(30)**: 10205-10219.
- FUKUI, Y., ISHIKAWA, D., ISHIDA, N., OKADA, M., ITAGAKI, R., OGISO, T. (1999). Comparison of Fertility of Estrous Synchronized Ewes with Four Different Intravaginal Devices during the Breeding Season. *J Reprod Dev*. **45(5)**: 337-343
- FUKUI, Y., KOHNO, H., OKABE, K., KATSUKI, S., YOSHIKAWA, M., TOGARI, T., WATANABE, H. (2010). Factors affecting the fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen-thawed semen during the non-breeding season. *J Reprod Dev*. **56(4)**: 460-6.
- FUNSTON, R.N., LIPSEY, R.J., GEARY, T.W., ROBERTS, A.J. (2005). Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. *J Anim Sci*. **83(6)**:1403-1405.
- GIBBONS, J. R., KOT, K., THOMAS, D. L., WILTBANK, M. C. AND GINTHER, O. J. (1999). Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogenology* **52**: 1005-1020.
- GINGERICH, S., WANG, X., LEE, P.K., DHILLON, S.S., CHALMERS, J.A., KOLETAR, M.M., BELSHAM, D.D., (2009). The generation of an array of clonal, immortalized cell models from the rat hypothalamus: analysis of melatonin effects on kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone neurons. *Neuroscience* **162**, 1134–1140.
- GINTHER, O.J., KOT, K., WILTBANK, M.C. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* **43**: 689-703.

- GODFREY, R.W., COLLINS, J.R., HENSLEY, E.L., WHEATON, J.E. (1999). Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. *Theriogenology*. **51**: 985-97.
- GÓMEZ-BRUNET, A., SANTIAGO-MORENO, J., MONTORO, V., GARDE, J., PONS, P., GONZÁLEZ-BULNES, A., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., (2007). Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the time of AI. *Small Rum. Research* **71**: 117–122
- GONZALEZ-AÑOBER, P., ENCINAS, T., VEIGA-LOPEZ, A., AMMOUN, I., CONTRERAS, I., ROS, J.M., ARIZNAVARRETA, C., TRESGUERRES, J.A., GONZALEZ-BULNES, A. (2007). Effects of breed on follicular dynamics and oestradiol secretion during the follicular phase in sheep. *Reprod Domest Anim*. **42(1)**: 29-33.
- GONZÁLEZ-BULNES, A., GARCÍA-GARCÍA, RM., CASTELLANOS, V., SANTIAGO-MORENO, J., ARIZNAVARRETA, C., DOMÍNGUEZ, V., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., TRESGUERRES, J.A., COCERO, M.J. (2003). Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod Nutr Dev*. **43(1)**:17-28.
- GONZÁLEZ-BULNES, A., VEIGA-LOPEZ, A., GARCIA, P., GARCIA-GARCIA, R.M., ARIZNAVARRETA, C., SANCHEZ, M.A., TRESGUERRES, J.A., COCERO, M.J., FLORES, J.M.(2005). Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* **63**: 2523–2534.
- GOODMAN, R.L., LEGAN, S.J., RYAN, K.D., FOSTER, D.L., KARSCH, F.J. (1981). Importance of variations in behavioural and feedback actions of oestradiol to the control of seasonal breeding in the ewe. *J Endocrinol*. **89(2)**: 229-40
- GOODMAN, R.L., COOLEN, L.M., ANDERSON, G.M., HARDY, S.L., VALENT. M., CONNORS, J.M., FITZGERALD, M.E., LEHMAN, M.N. (2004). Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology*. **145(6)**: 2959-2967
- GOODMAN, R., INSKEEP, E.K. (2006). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Sheep. NEILL, J.D., PLANT, T.M. PFAFF, D.V., CHALLIS, J.R, KRETZER, D., RICHARDS, J., WASSARMAN, P.M., *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Chapter:44, 3rd edition, Elsevier. USA*
- GOODMAN, R.L., LEHMAN, M.N., SMITH, J.T., COOLEN, L.M., DE OLIVEIRA, C.V., JAFARZADEHSHIRAZI, M.R., PEREIRA, A., IQBAL, J., CARATY, A., CIOFI, P., CLARKE, I.J. (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*. **148(12)**: 5752-60
- GOODMAN, R.L., JANSEN, H.T., BILLINGS, H.J., COOLEN, L.M., LEHMAN, M.N. (2010). Neural Systems Mediating Seasonal Breeding in the Ewe. *Journal of Neuroendocrinology* **22**, 674–681
- GOODMAN, R.L., HOLASKOVA, I., NESTOR, C.C., CONNORS, J.M., BILLINGS, H.J., VALENT, M., LEHMAN. M.N., HILEMAN, S.M. (2011). Evidence that the arcuate nucleus is an important site of progesterone negative feedback in the ewe. *Endocrinology*. **152(9)**: 3451-60.

- GORDON, I. (1997). *Controlled Reproduction in sheep and Goat. CABI pub*, New York
- GOTTSCH, M.L., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. (2006). Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Mol Cell Endocrinol.* **254-255**: 91-96.
- GREEN, M.P., SPATE L, D., BIXBY, J.A., EALY, A.D., ROBERTS, R.M. (2005). A comparison of the anti-luteolytic activities of recombinant ovine interferon-alpha and -tau in sheep. *Biol Reprod.***73(6)**: 1087-93.
- GÜNGÖR, O., CENESIZ, M., PANCARCI, S. M., YILDIZ, S., KAYA, M., KACAR, C., ÖZYURLU, N., GÜRBULAK, K. (2007). Effects of different progesterone releasing intravaginal devices on estrous synchronization and LH surge in fat-tailed ewes during non-breeding season. *Medycyna Wet.* **63 (11)**: 1316-1319.
- GUTIERREZ-PASCUAL, E., MARTINEZ-FUENTES, A.J., PINILLA, L., TENA-SEMPERE, M., MALAGON, M.M., CASTANO, J.P. (2007). Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol* **19**: 521–530.
- GÜR, S., TÜRK, G., DEMIRCI, E., YÜCE, A., SÖNMEZ, M., OZER, S., AKSU, E. (2011). Effect of pregnancy and foetal number on diameter of corpus luteum, maternal progesterone concentration and oxidant/antioxidant balance in ewes. *Reprod Domest Anim.* **46(2)**: 289-95.
- KAŞIKÇI, G., CIRIT, Ü., GÜNDÜZ, M.C., BACINOĞLU, S., SABUNCU A. (2011). Effects of halving intravaginal sponges and eCG dose on estrus response and fertility in Tahirova ewes during the breeding season *Turk. J. Vet. Anim. Sci* **35(3)**: 193-199.
- HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. (2000). *Reproduction in farm animals*, 7thEd: Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- HAMADEH, S.K., HULET, C.V., ROSS, T.T., HALLFORD, D.M. (1989). Ovarian cyclicity and serum progesterone and luteinizing hormone in fine-wool ewes supplemented with alfalfa or pinto beans. *Theriogenology* **32**: 149-58.
- HAMEED, S., JAYASENA,C., DHILLO,W. (2011). Kisspeptin and fertility. *Journal of Endocrinology* **208(2)**: 97–105.
- HAMERNIK, D.L., CLAY, C.M., TURZILLO, A., VAN KIRK, E.A., MOSS, G.E. (1995). Estradiol increases amounts of messenger ribonucleic acid for gonadotropin-releasing hormone receptors in sheep. *Biol Reprod.* **53**: 179-85.
- HAN, S.K., GOTTSCH, M.L., LEE, K.J., POPA, S.M., SMITH, J.T., JAKAWICH, S.K., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A., HERBISON, A.E. (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* **25(49)**:11349-56.
- HARRIS, T.G., DYE, S., ROBINSON, J.E., SKINNER, D.C., EVANS, N.P. (1999). Progesterone can block transmission of the estradiol-induced signal for luteinizing hormone surge generation during a specific period of time immediately after activation of the gonadotropin-releasing hormone surge-generating system *Endocrinology.* **140(2)**:827-834.

- HASHEM, N.M., EL-ZARKOUNY, S.Z., TAHA, T.A., ABO-ELEZZ, Z.R. (2011). Effect of season, month of parturition and lactation on estrus behavior and ovarian activity in Barki x Rahmani crossbred ewes under subtropical conditions. *Theriogenology*. **15:75(7)**: 1327-35.
- HASHIZUME, T., SAITO, H., SAWADA, T., YAEGASHI, T., EZZAT, A.A., SAWAI, K., YAMASHITA, T. (2010). Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Anim Reprod Sci*. **118(1)**:37-41.
- HAWK, H.W. (1973). Uterine Motility and Sperm Transport in the Estrous Ewe after Prostaglandin Induced Regression of Corpora Lutea. *J ANIM SCI* **37**: 1380-1385.
- HAWK, H.W., COOPER, B.S. (1977). Sperm Transport into the Cervix of the Ewe after Regulation of Estrus with Prostaglandin or Progestogen *J ANIM SCI* **44**: 638-644.
- HAWKEN, P.A., EVANS, A.C., BEARD, A.P. (2008). Short term, repeated exposure to rams during the transition into the breeding season improves the synchrony of mating in the breeding season *Anim Reprod Sci*. **106(3-4)**:333-44.
- HENRY, B.A., GODING, J.W., TILBROOK, A.J., DUNSHEA, F.R., CLARKE, I.J. (2001). Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight, *J. Endocrinol*. **168**: 67–77.
- HIDEN, U., BILBAN, M., KNÖFLER, M., DESOYE, G. (2007). Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. *Rev Endocr Metab Disord*. **8**: 31-39.
- HILL, J.W., ELMQUIST, J.K., ELIAS, C.F. (2008). Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **294(5)**: E827-32.
- HORI, A., HONDA, S., ASADA, M., OHTAKI, T., ODA, K., WATANABE, T., SHINTANI, Y., YAMADA, T., SUENAGA, M., KITADA, C., ONDA, H., KUROKAWA, T., NISHIMURA, O., FUJINO, M. (2001). Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **286**: 958–963.
- HOROZ, H., AK, K., KAŞIKÇI, G., BARAN, A., SÖNMEZ, C., ŞENÜNVER, A. (1997) Üreme Mevsiminde Farklı Östrüs Senkronizasyon Yöntemleri Uygulanan Kıvrıcık Koyunlarında serum Progesteron, Östradiol 17 beta ve LH seviyeleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. **3(1)**: 85-92.
- HOUGHTON, J.A., LIBERATI, N., SCHRICK, F.N., TOWNSEND, E.C., DAILEY, R.A., INSKEEP, E.K. (1995). Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *J Anim Sci*. **73**: 2094-2101.
- HUSEIN, M.Q., BAILEY, M.T., ABABNEH, M.M., ROMANO, J.E., CRABO, B.G., WHEATON, J.E. (1998). Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. *Theriogenology*. **49(5)**: 997-1005.
- HUSEIN, M.Q., KRIDL, R.T. (2002). Reproductive Responses of Awassi Ewes Treated with either Naturally Occurring Progesterone or Synthetic Progestagen *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. **15(9)** : 1257-1262

- HUSEIN, M.Q., HADDAD, S.G. (2006). A new approach to enhance reproductive performance in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic gonadotropin. *Anim Reprod Sci.* **93(1-2)**: 24-33
- HUSEIN, M.Q., ABABNEH, M.M. (2008). A new strategy for superior reproductive performance of ewes bred out-of-season utilizing progestagen supplement prior to withdrawal of intravaginal pessaries. *Theriogenology.* **69(3)**: 376-83.
- JAVANMARD, A., AZADZADEH, N., ESMAILIZADEH, A.K. (2011). Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds. *Vet Res Commun.***35(3)**: 157-67.
- JOSEPH, B.J.K., CURRIE, W.D., RAVINDRA, J.P., COOK, S.J., RAWLINGS, N.C. (1994). Oestradiol and the surge release of gonadotropins in the ewe. *Anim Reprod Sci* **34(3/4)**: 217–30.
- KADOKAWA, H., MATSUI, M., HAYASHI, K., MATSUNAGA, N., KAWASHIMA, C., SHIMIZU, T., KIDA, K., MIYAMOTO, A. (2008). Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of growth hormone as well as luteinizing hormone in prepubertal Holstein heifers. *J Endocrinol* **196**: 331–334.
- KAIM, M., BLOCH, A., WOLFENSON, D., BRAW-TAL, R., ROSENBERG, M., VOET, H., FOLMAN, Y. (2003) Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. *J Dairy Sci.* **86(6)**: 2012-2021.
- KALKAN, C., CETIN, H., KAYGUSUZOGLU, E., YILMAZ, B., CIFTÇI, M., YILDIZ, H.A., DEVECI, H., APAYDIN, A.M., OCAL, H. (1996). An investigation on plasma progesterone levels during pregnancy and at parturition in the Ivesi sheep. *Acta Vet Hung.* **44(3)**: 335-340.
- KALKAN, C., HOROZ, H. (2001). Pubertas ve Seksüel Sikluslar. "Evcil Hayvanlarda Doğum ve infertilite. Alaçam E (Editör).Üçüncü Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara. 23-41.
- KARACA, F., ATAMAN, M.B., ÇOYAN, K. (2009). Synchronization of estrus with short- and long-term progestagen treatments and the use of GnRH prior to short-term progestagen treatment in ewes *Small Ruminant Res.***81**:185-188.
- KAREN, A., BECKERS, J.F., SULON, J., DE SOUSA, N.M., SZABADOS, K., RECZIGEL, J., SZENCI, O. (2003). Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Theriogenology* **59(9)**:1941-1948.
- KARSCH, F.J., BOWEN, J.M., CARATY, A., EVANS, N.P., MOENTER, S.M. (1997) Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod.* **56(2)**:303-309.
- KAUFFMAN, A.S., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. (2007). Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends Neurosci.* **30(10)**: 504-511.
- KAULFUSS, K.H., GIUCCI, E., SÜSS, R., WÓJTOWSKI, J. (2006). An ultrasonographic method to study reproductive seasonality in ewes isolated from rams *Reprod Domest Anim.* **41(5)**: 416-22.

- KAYA, M., YILDIZ, S., GUVEN, B. (2005) The determination of plasma progesterone, oestradiol-17 β and luteinizing hormone levels during oestrous period of Tuj ewe-lambs following oestrus induction. *Revue Méd. Vét.* **156 (12)**: 628-632
- KEISLER, D.H., KEISLER, L.W. (1989). Formation and function of GnRH-induced subnormal corpora lutea in cyclic ewes. *J Reprod Fertil.* **87**: 265-273.
- KESLER, D.J., TROXEL, T.R., VINCENT, D.L., CARLIN, S.E. (1980). Luteinizing hormone concentrations in anestrus ewes administered various estrogens. *Theriogenology* **13**: 231-235.
- KHAN, T.H., HASTIE, P.M., BECK, N.F., KHALID, M. (2003) hCG treatment on day of mating improves embryo viability and fertility in ewe lambs. *Anim Reprod Sci.* **76(1-2)**:81-89.
- KINOSHITA, M., TSUKAMURA, H., ADACHI, S., MATSUI, H., UENOYAMA, Y., IWATA, K. (2005). Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* **146**: 4431-6.
- KIRBY, H.R., MAGUIRE, J.J., COLLEDGE, W.H., DAVENPORT, A.P. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev.* **62(4)**: 565-578.
- KOHNO, H., OKAMOTO, C., IIDA, K., TAKEDA, T., KANEKO, E., KAWASHIMA, C., MIYAMOTO, A., FUKUI, Y. (2005). Comparison of estrus induction and subsequent fertility with two different intravaginal devices in ewes during the non-breeding season. *J Reprod Dev.* **51(6)**: 805-12.
- LEE, J.H., MIELE, M.E., HICKS, D.J., PHILLIPS, K.K., TRENT, J.M., WEISSMAN, B.E., WELCH, D.R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* **88**: 1731 – 1737.
- LEHMAN, M.N., MERKLEY, C.M., COOLEN, L.M., GOODMAN, R.L. (2010). Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.* **1364**: 90-102.
- LETELIER, C.A., CONTRERAS-SOLIS, I., GARCÍA-FERNÁNDEZ, R.A., ARIZNAVARRETA, C., TRESGUERRES, J.A., FLORES, J.M., GONZALEZ-BULNES, A. (2009). Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology.* **71**: 676-682.
- LETELIER, C.A., CONTRERAS-SOLIS, I., GARCÍA-FERNÁNDEZ, R.A., SÁNCHEZ, M.A., GARCÍA-PALENCIA, P., SÁNCHEZ, B., ARIZNAVARRETA, C., TRESGUERRES, J.A., FLORES, J.M., GONZALEZ-BULNES, A. (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Anim Reprod Sci.* **126(1-2)**: 61-9.
- LEWIS G.S., CALDWELL D.W., REXROAD C.E., DOWLEN H.H, OWEN, J.R. (1990) Effects of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on pregnancy rate in dairy cattle. *J Dairy Sci.* **73(1)**: 66-72.

- LI, Q., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J.J., SMITH, G.W. (2009). Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. *Reproduction*. **137(2)**: 297-307.
- LINCOLN, G.A. (1992). Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. *Anim Reprod Sci* **28**: 203–217.
- LIU, X., DAI, Q., HART, E.J., DUGGAVATHI, R., BARRETT, D.M., RAWLINGS, N.C., BARTLEWSKI, P.M. (2006). Ovarian and endocrine responses to prostaglandin F₂alpha (PGF₂alpha) given at the expected time of the endogenous FSH peak at mid-cycle in ewes. *Theriogenology*. **66**: 811-821.
- LOGAN, K.A., JUENGEL, J.L., MCNATTY, K.P. (2002). Onset of steroidogenic enzyme gene expression during ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* **66**: 906-916.
- LOUBSER, P.G., VAN NIEKERK, C.H. (1981). Oestrus synchronization in sheep with progesterone-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostaglandin analogue. *Theriogenology*, **15**: 547-552.
- MACFARLANE, M.S., BREEN, K.M., SAKURAI, H., ADAMS, B.M., ADAMS, T.E. (2000). Effect of duration of infusion of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. *Anim Reprod Sci* **63**:167–75.
- MAGEE, C., FORADORI, C.D., BRUEMMER, J.E., ARREGUIN-AREVALO, J.A., MCCUE, P.M., HANDA, R.J., SQUIRES, E.L., CLAY, C.M. (2009). Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology*. **150(6)**: 2813-21.
- MAKRI, A., PISSIMISSIS, N., LEMBESSIS, P., POLYCHRONAKOS, C., KOUTSILIERIS, M. (2008). The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. *Cancer Treat Rev*. **34(8)**: 682-92.
- MARTEMUCCI, G., D'ALESSANDRO, A.G. (2010). Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined short term GnRH, PGF₂α and estradiol benzoate treatments. *Small Ruminant Res*. **93**: 41–47.
- MARTEMUCCI, G., D'ALESSANDRO, A.G. (2011). Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF(2α), GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Anim Reprod Sci*. **123(1-2)**: 32-39.
- MARTIN, G.B., THOMAS, G.B., TERQUI, M., WARNER, P. (1987). Pulsatile LH secretion during the preovulatory surge in the ewe : experimental observations and theoretical considerations *Reprod. Nutr. Dévelop*. **27**: 1023-1040.
- MARTIN, B., GOLDEN, E., CARLSON, O.D., EGAN, J.M., MATTSON, M.P., MAUDSLEY, S.. (2008.) Caloric restriction: Impact upon pituitary function and reproduction *Ageing Res Rev*. **7(3)**: 209-24.
- MCNATTY, K.P., HUDSON, N., HENDERSON, K.M., GIBB, M., MORRISON, L., BALL, K., SMITH, P. (1987). Differences in gonadotrophin concentrations and pituitary responsiveness

- to GnRH between Booroola ewes which were homozygous (FF), heterozygous (F+) and non-carriers (++) of a major gene influencing their ovulation rate. *J Reprod Fertil.* **80(2)**: 577-88.
- MCNATTY, K.P., HUDSON, N.L., WHITING, L., READER, K.L., LUN, S., WESTERN, A., HEATH, D.A., SMITH, P., MOORE, L.G., JUENGEL, J.L. (2007). The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. *Biol Reprod.* **76**: 552–560.
- MEAD, E.J., MAGUIRE, J.J., KUC, R.E., DAVENPORT, A.P. (2007). Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor GPR54, to atherosclerosis prone vessels. *Endocrinology* **148(1)**:140–147.
- MECZEKALSKI, B., PODFIGURNA-STOPA, A., GENAZZANI, A.R. (2011). Why kisspeptin is such important for reproduction? *Gynecol Endocrinol.* **27(1)**:8-13.
- MEE, M.O., STEVENSON, J.S., ALEXANDER, B.M., SASSER, R.G. (1993) Administration of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, estradiol-17 beta, pregnancy-specific protein B, and progesterone, proportion of luteal cell types, and in vitro production of progesterone in dairy cows. *J Anim Sci.* **71(1)**:185-198.
- MEIKLE, A., FORSBERG, M., GARÓFALO, E.G., CARLSSON, M.A., LUNDEHEIM, N., RUBIANES, E. (2001). Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17beta. *Anim Reprod Sci.* **67(1-2)**: 79-90.
- MENCHACA, A., RUBIANES, E. (2004a). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev.* **16(4)**: 403-413
- MENCHACA, A., MILLER, V., GIL, J., PINCZAK, A., LACA, M., RUBIANES, E. (2004b). Prostaglandin F2a Treatment Associated with Timed Artificial Insemination in Ewes. *Reprod Domest Anim.* **39(5)**: 352-355.
- MENEGATOS, J., CHADIO, S., KALOGIANNIS, T., KOUSKOURA, T., KOUIMTZIS, S. (2003). Endocrine events during the peri-estrous period and the subsequent estrous cycle in ewes after estrus synchronization. *Theriogenology.* **59(7)**: 1533-43.
- MESSAGER, S., CHATZIDAKI, E.E., MA, D., HENDRICK, A.G., ZAHN, D., DIXON, J., THRESHER, R.R., MALINGE, I., LOMET, D., CARLTON, M.B., COLLEDGE, W.H., CARATY, A., APARICIO, S.A. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102(5)**:1761-1766.
- MEZA-HERRERA, C.A., ROSS, T., HALLFORD, D., HAWKINS, D., GONZALEZ-BULNES, A. (2007). Effects of body condition and protein supplementation on LH secretion and luteal function in sheep. *Reprod Domest Anim.* **42(5)**: 461-465.
- MIKKELSEN, J.D., BENTSEN, A.H., ANSEL, L., SIMONNEAUX, V., JUUL, A., (2009). Comparison of the effects of peripherally administered kisspeptins. *Regul Pept.* **152**: 95–100.
- MILLAR, R.P., ROSEWEIR, A.K., TELLO, J.A., ANDERSON, R.A., GEORGE, J.T., MORGAN, K., PAWSON, A.J. (2010). Kisspeptin antagonists: Unraveling the role of kisspeptin in reproductive physiology *Brain Res.* **1364**: 81-89,

- MOENTER, S.M., CARATY, A., KARSCH, F.J. (1990). The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology*. **127(3)**:1375-84.
- MOENTER, S.M., CARATY, A., LOCATELLI, A., KARSCH, F.J. (1991). Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge *Endocrinology*. **129(3)**: 1175-82.
- MOLTER-GERARD, C., FONTAINE, J., GUÉRIN, S., TARAGNAT, C. (1999). Differential Regulation of the Gonadotropin Storage Pattern by Gonadotropin Releasing Hormone Pulse Frequency in the Ewe. *Biol Reprod*. **60(5)**:1224-30.
- MOLTER-GERARD, C., CARATY, A., GUERIN, S., FONTAINE, J., TARAGNAT, C. (2000). Dynamic Changes in the Gonadotrope Cell Subpopulations During an Estradiol-Induced Surge in the Ewe. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **63**, 1084–1091.
- MONGA, R., SHARMA, I., DATTA, T.K., SINGH, D. (2011). Characterization of serum-free buffalo granulosa cell culture and analysis of genes involved in terminal differentiation from FSH- to LH-responsive phenotype. *Domest Anim Endocrinol*. **41(4)**:195-206.
- MONTEIRO, F.M., MELO, D.S., FERREIRA, M.M., CARVALHO, L.M., SARTORELI, E., EDERHARDT, B.G., NOGUEIRA, P., BARROS, C.M. (2009) LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*), after induced estrus or after ovarian superstimulation. *Anim Reprod Sci*. **110(1-2)**:128-138
- NETT, T.M., TURZILLO, A.M., BARATTA, M., RİSPOLİ, L.A. (2002) Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domest Anim Endocrinol*. **23**:33– 42.
- NDIAYE, K., FAYAD, T., SILVERSIDES, D.W., SIROIS, J., LUSSIER, J.G. (2005). Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod*. **73(2)**: 324-33.
- NOAKES, D.E., PARKINSON, T.J., ENGLAND, G.C.V, ARTHUR, G.H. (2001). Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. Saunders company, Philadelphia
- OAKLEY, A.E., BREEN, K.M., CLARKE, I.J., KARSCH, F.J., WAGENMAKER, E.R., TILBROOK, A.J. (2009). Cortisol reduces gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in follicular phase ewes: influence of ovarian steroids *Endocrinology*. **150(1)**: 341-349.
- OCAK, A. (2007). Sakız ırkı melezi koyunlarda kısa süreli uygulamalar ile mevsim içi östrüs senkronizasyonu. Doktora tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- O'CALLAGHAN, D. (1999). A Practical Approach to the Management of Reproductive Seasonality in Sheep *Reprod Dom Anim*. **34**: 285-291.
- OHTAKI, T., SHINTANI, Y., HONDA, S., MATSUMOTO, H., HORI, A., KANEHASHI, K., TERAOKA, Y., KUMANO, S., TAKATSU, Y., MASUDA, Y., ISHIBASHI, Y., WATANABE, T., ASADA, M., YAMADA, T., SUENAGA, M., KITADA, C., USUKI, S., KUROKAWA, T., ONDA, H., NISHIMURA, O., FUJINO, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **411**: 613–617.

- OLIVERA-MUZANTE, J., FIERRO, S., LÓPEZ, V., GIL, J. (2011a). Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, **75**: 1232–1238.
- OLIVERA-MUZANTE, J., GIL, J., FIERRO, S., MENCHACA, A., RUBIANES, E. (2011b). Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, **76**: 1501-1507.
- OUSSAID, B., Mariana, J.C., Poulin, N., Fontaine, J., Lonergan, P., Beckers, J.F., Cognie, Y. (1999). Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil.* **117(1)**: 71-77.
- OYEDIJI, G.O., AKUSU, M.O., EGBUNIKE, G.N. (1990). Comparative studies on the effectiveness of Sil-estrus implants, Veramix sheep sponges and prostaglandin F2alpha in synchronizing estrus in West African dwarf sheep. *Theriogenology*. **34**: 613-8.
- ÖZPINAR, A., FIRAT, A. (2003) Metabolic profile of pre-pregnancy, pregnancy and early lactation in multiple lambing Sakiz ewes. 2. Changes in plasma progesterone, estradiol-17 beta and cholesterol levels. *Ann Nutr Metab.* **47(3-4)**:139-43.
- ÖZYURTLU, N., KUCUKASLAN, I., CETIN, Y. (2010). Characterization of oestrous induction response, oestrous duration, fecundity and fertility in Awassi ewes during the non-breeding season utilizing both CIDR and intravaginal sponge treatments. *Reprod Domest Anim.* **45(3)**: 464-467.
- PAKSOY, Z., KALKAN, C. (2010) The Effects of GnRH and hCG Used During and After Artificial Insemination on Blood Serum Progesterone Levels and Pregnancy Rate in Cows. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* **16 (3)**: 371-375.
- PERRY, G.A, PERRY, B.L. (2009) GnRH treatment at artificial insemination in beef cattle fails to increase plasma progesterone concentrations or pregnancy rates. *Theriogenology.* **71(5)**: 775-779
- PICAZO, R.A., GONZÁLEZ DE BULNES, A., GÓMEZ BRUNET, A., DEL CAMPO, A., GRANADOS, B., TRESGUERRES, J., LÓPEZ SEBASTIÁN, A. (2000). Effects of bromocriptine administration during the follicular phase of the oestrous cycle on prolactin and gonadotrophin secretion and follicular dynamics in merino monovular ewes. *J Reprod Fertil.***120**:177-86.
- PIERCE, B.N., CLARKE, I.J., TURNER, A.I., RIVALLAND, E.T., TILBROOK, A.J. (2009a). Cortisol disrupts the ability of estradiol-17beta to induce the LH surge in ovariectomized ewes. *Domest Anim Endocrinol.* **36(4)**: 202-8.
- PIERCE, B.N., STACKPOLE, C.A., BREEN, K.M., CLARKE, I.J., KARSCH, F.J., RIVALLAND, E.T., TURNER, A.I., CADDY, D.J., WAGENMAKER, E.R., OAKLEY, A.E., TILBROOK, A.J. (2009b). Estradiol enables cortisol to act directly upon the pituitary to suppress pituitary responsiveness to GnRH in sheep. *Neuroendocrinology* **89**: 86–97.
- PINEDA, M.H. (2003). McDonald's veterinary endocrinology and reproduction, 5thEd., Iowa State Press, Iowa. PINEDA R., GALIANO D., ROSEWEIR A., ROMERO M., GARRIDO M. ,

- PINEDA, R., GARCIA-GALIANO, D., ROSEWEIR, A., ROMERO, M., SANCHEZ-GARRIDO, M.A., RUIZ-PINO, F., MORGAN, K., PINILLA, L., MILLAR, R.P., TENA-SEMPERE, M. (2010) Critical Roles of Kisspeptins in Female Puberty and Preovulatory Gonadotropin Surges as Revealed by a Novel Antagonist. *Endocrinology*. **151(2)**: 722–730.
- POMPOLO, S., PEREIRA, A., ESTRADA, K.M., CLARKE, I.J. (2006). Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain, *Endocrinology* **147**: 804–810.
- QUINTAL-FRANCO, J.A., KOJIMA, F.N., MELVIN, E.J., LINDSEY, B.R., ZANELLA, E., FIKE, K.E., WEHRMAN, M.E., CLOPTON, D.T., KINDER, J.E. (1999). Corpus luteum development and function in cattle with episodic release of luteinizing hormone pulses inhibited in the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol Reprod*. **61(4)**: 921–6.
- QUINTERO-ELISEA, J.A., MACÍAS-CRUZ, U., ÁLVAREZ-VALENZUELA, F.D., CORREA-CALDERÓN, A., GONZÁLEZ-REYNA, A., LUCERO-MAGAÑA, F.A., SOTO-NAVARRO, S.A., AVENDAÑO-REYES, L. (2011). The effects of time and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. *Trop Anim Health Prod*. **43(8)**: 1567-73.
- QUIRKE, J.F., HANRAHAN, J.P., GOSLING, J.P. (1979) Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J Reprod Fertil*. **55(1)**:37-44.
- RAMAKRISHNAPPA, N., RAJAMAHENDRAN, R., LIN, Y.M., LEUNG, P.C. (2005). GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. *Anim Reprod Sci*. **88(1-2)**: 95-113.
- RAO, J.U., SHAH, K.B., PUTTAIAH, J., RUDRAIAH, M. (2011). Gene expression profiling of preovulatory follicle in the buffalo cow: effects of increased IGF-I concentration on periovulatory events *PLoS One*. **6(6)**: e20754.
- RAWLINGS, N.C., EVANS, A.C., HONARAMOOZ, A., BARTLEWSKI, P.M. (2003). Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci*. **15;78(3-4)**: 259-70.
- RAWLINGS, N.C., BARTLEWSKI, P.M. (2007). Clinical Reproductive Physiology of Ewes. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Ed: Youngquist R. S., Threlfall W. Chapter 87, 2nd Ed. Saunders Elsevier, USA.
- REVEL, F.G., ANSEL, L., KLOSEN, P., SABOUREAU, M., PÉVET, P., MIKKELSEN, J.D., SIMONNEAUX, V. (2007). Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord*. **8(1)**: 57-65.
- REYNA, J., THOMSON, P.C., EVANS, G., MAXWELL, W.M. (2007). Synchrony of Ovulation and Follicular Dynamics in Merino Ewes Treated with GnRH in the Breeding and Non-breeding Seasons *Reprod Domest Anim*. **42(4)**: 410-7.
- REYNOLDS, R.M., LOGIE, J.J., ROSEWEIR, A.K., MCKNIGHT, A., MILLAR, R. (2009) A role for kisspeptins in pregnancy: facts and speculations. *Reproduction*. **138(1)**:1-7

- RHIND, S.M., LESLIE, L.D., GUNN, R.G. DONEY, J.M. (1985). Plasma FSH, LH, prolactin and progesterone profiles of Cheviot ewes with different levels of intake before and after mating, and associated effects on reproductive performance. *Anim Rep Sci* **8**: 301-313.
- RHIND, S.M., MCNEILLY, A.S. (1986). Follicle populations, ovulation rates and plasma profiles of LH, FSH and prolactin in Scottish blackface ewes in high and low levels of body condition. *Anim Rep Sci* **10**: 105-115.
- RHIND, S.M., MCMILLEN, S., MCKELVEY, W.A., RODRIGUEZ-HERREJON, F.F., MCNEILLY, A.S. (1989). Effect of the body condition of ewes on the secretion of LH and FSH and the pituitary response to gonadotrophin-releasing hormone. *Journal of Endocrinology* **120**: 497-502.
- RICHARD, N., CORVAISIER, S., CAMACHO, E., KOTTLER, M.L. (2009) KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. *Peptides*. **30(1)**: 123-9.
- RICHARDSON, L., HANRAHAN, J.P., O'HARA, L., DONOVAN, A., FAIR, S., O'SULLIVAN, M., CARRINGTON, S.D., LONERGAN, P., EVANS. A.C. (2011.) Ewe breed differences in fertility after cervical AI with frozen-thawed semen and associated differences in sperm penetration and physicochemical properties of cervical mucus. *Anim Reprod Sci*. **129(1-2)**: 37-43.
- RICHTER, T.A., ROBINSON, J.E., LOZANO, J.M., EVANS, N.P. (2005). Progesterone can block the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe by a direct inhibitory action on oestradiol-responsive cells within the hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. **17(3)**:161-169.
- RİŞVANLI, A., APAYDIN, A.M., BULUT, H., TIMURKAAN, N., SAAT, N. (2010). The effects of Kisspeptin antibodies on delayed estrus in rats. *Gynecol Endocrinol*. **26(4)**: 297-301.
- RİŞVANLI, A., DEMIRAL, O., ABAY, M., SAAT, N., BEKYUREK, T., KULAHCI, F., NIKSAROGLU, S., BALCI, T.A. (2010). Effect of different forms of prostaglandin f2 α analogues administration on hormonal profile, prostaglandin f2 α binding rate and reproductive traits in akkaraman sheep during the breeding season. *Acta Vet Veterinariae*, **38**: 391-398,
- ROA, J., TENA-SEMPERE, M. (2007). KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocrinol*. **153(1-3)**:132-40
- ROA, J., AGUILAR, E., DIEGUEZ, C., PINILLA, L., TENA-SEMPERE, M. (2008). New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* **29**: 48 – 69.
- ROMANO, J.E., FERNANDEZ ABELLA, D., VILLEGAS, N. (2001). A note on the effect of continuous ram presence on estrus onset, estrus duration and ovulation time in estrus synchronized ewes *Appl Anim Behav Sci*. **73(3)**:193-198.
- ROSA, H.J.D., BRYANT, M.J. (2002). The 'ram effect' as a way of modifying the reproductive activity in the ewe *Small Ruminant Research* **45**: 1–16.

- ROSA, H.J.D., BRYANT, M.J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep *Small Rum Res* **48**: 155–171.
- ROSEWEIR, A.K., KAUFFMAN, A.S., SMITH, J.T., GUERRIERO, K.A., MORGAN, K., PIELECKA-FORTUNA, J., PINEDA, R., GOTTSCH, M.L., TENA-SEMPERE, M., MOENTER, S.M., TERASAWA, E., CLARKE, I.J., STEINER, R.A., MILLAR, R.P. (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci.* **29(12)**: 3920-3929.
- ROSEWEIR, A.K., MILLAR, R.P. (2009). The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum Reprod Update.* **15(2)**: 203-12.
- ROWLAND, M., TOZER, T.N. (1989) Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Application. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- RUBIANES, E., BEARD, A., DIERSCHKE, D.J., BARTLEWSKI, P., ADAMS, G.P., RAWLINGS, N.C. (1997). Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF 2alpha and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. *Theriogenology.* **48**: 1093-1104.
- RUBIANES, E., MENCHACA, A., CARBAJAL, B. (2003). Response of the 1–5 day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2a. *Anim Reprod Sci* **78**: 47–55.
- SAIFULLIZAM, A.K., ROUTLY, J.E., SMITH, R.F., DOBSON, H. (2010). Effect of insulin on the relationship of estrous behaviors to estradiol and LH surges in intact ewes. *Physiol Behav.* **19;99(5)**: 555-61.
- SALEM, I.B., REKIK, M., GONZALEZ-BULNES, A., LASSOUED, N., KRAÏEM, K. (2010). Differences in preovulatory follicle dynamics and timing of preovulatory LH surge affect fertility of maiden sheep reared in semi-arid extensive conditions. *Anim Reprod Sci.* **117(1-2)**: 60-66.
- SAWYER, I., SMILLIE, S.J., BODKIN, J.V., FERNANDES, E., O'BYRNE, K.T., BRAIN, S.D. (2011). The Vasoactive Potential of Kisspeptin-10 in the Peripheral Vasculature. *PLoS One* **6(2)**: e14671.
- SCARAMUZZI, R.J., RADFORD, H.M. (1983). Factors regulating ovulation rate in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility* **69**: 353-367
- SCARAMUZZI, R.J., BAIRD, D.T., CAMPBELL, B.K., DRIANCOURT, M.A., DUPONT, J., FORTUNE, J.E., GILCHRIST, R.B., MARTIN, G.B., MCNATTY, K.P., MCNEILLY, A.S., MONGET, P., MONNIAUX, D., VIÑOLES, C., WEBB, R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev.* **23**: 444-67.
- SCHMITT, E.J., DIAZ, T., DROST, M., THATCHER, W.W. (1996) Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J Anim Sci.* **74(5)**:1084-1091
- SEEKALLU, S.V., TOOSI, B.M., RAWLINGS, N.C. (2009). LH pulse frequency and the emergence and growth of ovarian antral follicular waves in the ewe during the luteal phase of the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol.* **7(78)**:1-16

- SEEKALLU, S.V., TOOSI, B.M., ZIEGLERA, A., REEVESB, J.J., RAWLINGS, N.C (2010a). Pulsed GnRH secretion and the FSH secretory peaks that initiate ovarian antral follicular wave emergence in anestrous ewes. *Animal Reproduction Science* **120**: 56–64.
- SEEKALLU, S.V., TOOSI, B.M., DUGGAVATHI, R., BARRETT, D.M., DAVIES, K.L., WALDNER, C., RAWLINGS, N.C. (2010b). Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. *Theriogenology*. **15;73(5)**: 670-80.
- SEJIAN, V., MAURYA, V.P., NAQVI, S.M. (2011). Effect of thermal stress, restricted feeding and combined stresses (thermal stress and restricted feeding) on growth and plasma reproductive hormone levels of Malpura ewes under semi-arid tropical environment. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. **95(2)**: 252-8.
- SEMINARA, S.B., KAISER, U.B. (2005). New gatekeepers of reproduction: GPR54 and its cognate ligand, KiSS-1. *Endocrinology*. **146(4)**:1686-8.
- SENGER, P.L. (2003). Reproductive cyclicity – Terminology and basic concepts. In: Pathways to pregnancy and parturition. 2nd Ed. Current Conceptions Inc.
- SHABANKAREH, H.K., HABIBIZAD, J., TORKI, M. (2009). Corpus luteum function following single and double ovulation during estrous cycle in Sanjabi ewes. *Anim Reprod Sci*. **114(4)**:362-9.
- SIDDIQUI, M.A., FERREIRA, J.C., GASTAL, E.L., BEG, M.A., COOPER, D.A., GINTHER, O.J. (2010). Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers. *Reprod Fertil Dev*. **22(7)**:1110-7.
- SILVESTRE, R.A., EGIDO, E.M., HERNANDEZ, R., MARCO, J. (2008). Kisspeptin-13 inhibits insulin secretion without affecting glucagon or somatostatin release: study in the perfused rat pancreas. *J Endocrinol*. **196(2)**:283-90.
- SIMONNEAUX, V., RIBELAYGA, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*. **55(2)**:325-95.
- SMITH, J.T., CLAY, C.M., CARATY, A., CLARKE, I.J. (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*. **148(3)**:1150-7
- SMITH, J.T., RAO, A., PEREIRA, A., CARATY, A., MILLAR, R.P., CLARKE, I.J. (2008a). Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology*. **149(4)**:1951-9
- SMITH, J., COOLEN, L., KRIEGSFELD, L., SARI, I., JAAFARZADEHSHIRAZI, M., MALTBY, M., BATEMAN, K., ROBERT, L. GOODMAN, R., TILBROOK, A., UBUKA, T., BENTLEY, G., CLARKE, I., LEHMAN, M. (2008b). Variation in Kisspeptin and RFamide-Related Peptide (RFRP) Expression and Terminal Connections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in the Brain: A Novel Medium for Seasonal Breeding in the Sheep. *Endocrinology* **149**: 5770-5782.

- SMITH, J.T. (2009). Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. *Peptides*. **30(1)**:94-102.
- SMITH, J.T., SALEH, S.N., CLARKE, I.J. (2009a). Seasonal and cyclical change in the luteinizing hormone response to kisspeptin in the ewe, *Neuroendocrinology* **90**: 283–29
- SMITH, J.T., LI, Q., PEREIRA, A., CLARKE, I.J. (2009b). Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. **150(12)**:5530-5538.
- SMITH, J.T., CLARKE, I.J. (2010). Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. *Mol Cell Endocrinol*. **5;324(1-2)**:102-9.
- SMITH, J.T., LI, Q., YAP, K.S., SHAHAB, M., ROSEWEIR, A.K., MILLAR, R.P., CLARKE, I.J. (2011). Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology*. **152(3)**:1001-1012.
- SOUZA, C.J., CAMPBELL, B.K., BAIRD, D.T. (1999) Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol Reprod*. **56(2)**: 483-8.
- SPENCER, T.E., BURGHARDT, R.C., JOHNSON, G.A., BAZER, F.W. (2004) Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci*. **82(83)**: 537-50.
- STEVENSON, J.S., CALL, E.P., SCOBY, R.K., PHATAK, A.P. (1990) Double insemination and gonadotropin-releasing hormone treatment of repeat-breeding dairy cattle. *J Dairy Sci*. **73(7)**:1766-1772.
- SUZUKI, S., KADOKAWA, H., HASHIZUME, T. (2008) Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci*. **103(3-4)**:360-5
- TALEBKHAN GAROUSSI, M., FARZANEH, N., GALLEHDAR, E., MOHRI, M. (2012) Reproductive performance in out-of-breeding season of fatty ewes using implant norgestomet with or without PMSG. *Trop Anim Health Prod*. **44(5)**:965-968.
- TARAGNAT, C., BERNIER, A., FONTAINE, J. (1998). Gonadotrophin storage patterns in the ewe during the oestrous cycle or after long-term treatment with a GnRH agonist . *J Endocrinol*. **156**:149-57.
- TENA-SEMPERE, M. (2010). Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocrinol*. **314(2)**:164-169.
- THOMPSON, E.L., AMBER, V., STAMP, G.W., PATTERSON, M., CURTIS, A.E., COOKE, J.H., APPLEBY, G.F., DHILLO, W.S., GHATEI, M.A., BLOOM, S.R., MURPHY, K.G. (2009). Kisspeptin-54 at high doses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central mechanisms. *Br J Pharmacol*. **156(4)**: 609-25.
- TITI, H.H., KRIDL, R.T., ALNIMER, M.A. (2010). Estrus synchronization in sheep and goats using combinations of GnRH, progestagen and prostaglandin F2alpha. *Reprod Domest Anim*. **45(4)**:594-9.

- TOOSI B.M., SEEKALLU S.V., PIERSON R.A., RAWLINGS N.C. (2009) Evaluation of the ultrasound image attributes of developing ovarian follicles in the four follicular waves of the interovulatory interval in ewes. *Theriogenology* 72 (2009) 902–909
- TOOSI, B.M., DAVIES, K.L., SEEKALLU, S.V., ZIEGLER, A.C., BARRETT, D.M., DUGGAVATHI, R., RAWLINGS, N.C. (2010a). Ovarian follicular dominance and the induction of daily follicular waves in the ewe *Biol Reprod.* **83(1)**:122-9
- TOOSI, B.M., SEEKALLU, S.V., BARRETT, M.W., DAVIES K.L. DUGGAVATHI, R., BAGU, E.T., RAWLINGS N.C. (2010b). Characteristics of peaks in serum concentrations of follicle-stimulating hormone and estradiol, and follicular wave dynamics during the interovulatory interval in cyclic ewes *Theriogenology* **73(9)**: 1192–1201.
- TORRICELLI, M., GALLERI, L., VOLTOLINI, C., BILIOTTI, G., FLORIO, P., DE BONIS, M., PETRAGLIA, F. (2008). Changes of placental Kiss-1 mRNA expression and maternal/cord kisspeptin levels at preterm delivery. *Reprod Sci.* **15(8)**:779-84.
- TÜİK (TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU) (2010). İstatistiksel Tablolar, Büyükbaş ve Küçükbaş Hayvanlar, Tür Irklarına Göre Hayvan Sayısı. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&ust_id=13
- TÜRK, G., GÜR, S., SÖNMEZ, M., BOZKURT, T., AKSU, E.H., AKSOY, H. (2008). Effect of exogenous GnRH at the time of artificial insemination on reproductive performance of Awassi ewes synchronized with progestagen-PMSG-PGF2alpha combination. *Reprod Domest Anim.* **43(3)**: 308-313.
- VINOLES, C., MEIKLE, A., FORSBERG, M., RUBIANES, E. (1999). The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during early luteal phase of the ewe. *Theriogenology.* **51(7)**:1351-61
- VINOLES, C., FORSBERG, M., BANCHERO, G., RUBIANES, E. (2001) Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* **55**: 993-1004.
- VINOLES, C., FORSBERG, M., BANCHERO, G., RUBIANES, E. (2002). Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Animal Science*, **74**: 539-545.
- WAGENMAKER, E.R., BREEN, K.M., OAKLEY, A.E., PIERCE, B.N., TILBROOK, A.J., TURNER, A.I., KARSCH, F.J. (2009). Cortisol interferes with the estradiol-induced surge of luteinizing hormone in the ewe. *Biol Reprod.* **80(3)**: 458-63.
- WAGNER, G.C., JOHNSTON, J.D., CLARKE, I.J., LINCOLN, G.A., HAZLERIGG, D.G. (2008). Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology* **149**: 32–9.
- WAKABAYASHI, Y., NAKADA, T., MURATA, K., OHKURA, S., MOGI, K., NAVARRO, V.M., CLIFTON, D.K., MORI, Y., TSUKAMURA, H., MAEDA, K., STEINER, R.A., OKAMURA, H. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci.* **24;30(8)**: 3124-32.

- WALKER, S.K., SMITH, D.H., GODFREY, B., SEAMARK, R.F. (1989a). Time of ovulation in the South Australian Merino ewe following synchronization of estrus. 1. Variation within and between flocks. *Theriogenology*. **31(3)**:545-53.
- WALKER, S.K., SMITH, D.H., ANCELL, P., SEAMARK, R.F. (1989b). Time of ovulation in the South Australian Merino ewe following synchronization of estrus. 2. Efficacy of GnRH treatment and its relevance to insemination programs utilizing frozen-thawed semen. *Theriogenology*. **31(3)**: 555-64.
- WALLACE, J.M., MCNEILLY, A.S. (1986). Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during treatment of ewes with bovine follicular fluid throughout the luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol* **111**:317-27.
- WORSFOLD, A.I., CHAMINGS, R.J., BOOTH, J.M. (1986): Measurement estrone sulphate in sheep plasma as a possible indicator of pregnancy and the number of viable fetuses present . *Br. Vet. J.*, **142**: 195-197.
- YAVUZER, Ü., ZONTURLU, A.K., ARAL, F. (2010). Effect of recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) on some fertility parameters in Awassi ewes synchronized with PGF2 α in the breeding season. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* **57**: 241-245.
- YILDIZ, S., SAATCI, M., UZUN, M., GÜVEN, B. (2003). Effects of ram introduction after the second prostaglandin F2 alpha injection on day 11 on the LH surge characteristics in fat-tailed ewes. *Reprod Domest Anim.* **38(1)**:54-57.
- ZAMAH, A.M., HSIEH, M., CHEN, J., VIGNE, J.L., ROSEN, M.P., CEDARS, M.I., CONTI, M. (2010). Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod.* **25(10)**:2569-78.
- ZONTURLU, A.K., ÖZYURTLU, N., KAÇAR, C. (2011). Effect of Different Doses PMSG on Estrus Synchronization and Fertility in Awassi Ewes Synchronized with Progesterone During the Transition Period. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* **17(1)**: 125-129.