T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# KOYUN RASYONUNDAKİ HAM PROTEİN ORANININ KAN ÜRE NİTROJEN, OVARYUM FONKSİYONU, FERTİLİZASYON, UTERUS FİZYOLOJİ VE EMBRİYO KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

**İrfan TUR**

**DOKTORA TEZİ**

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**
**Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ**

**KONYA-2014**

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# KOYUN RASYONUNDAKİ HAM PROTEİN ORANININ KAN ÜRE NİTROJEN, OVARYUM FONKSİYONU, FERTİLİZASYON, UTERUS FİZYOLOJİ VE EMBRİYO KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

**İrfan TUR**

**DOKTORA TEZİ**

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**
**Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ**

BAP 10102021

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10102021 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2014**

S.U. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İrfan TUR tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

| | | İMZA |
|---|---|---|
| Jüri Başkanı: | Prof. Dr. Tevfik TEKELİ<br>Selçuk Üniversitesi | |
| Danışman: | Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ<br>Selçuk Üniversitesi | |
| Üye: | Prof. Dr. Mehmet GÜLER<br>Selçuk Üniversitesi | |
| Üye: | Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ<br>Ankara Üniversitesi | |
| Üye: | Doç. Dr. Aydın GÜZELOĞLU<br>Selçuk Üniversitesi | |

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Hasan Hüseyin DÖNMEZ
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Mevsimsel üreme özelliğine sahip koyunlarda çoğunlukla planlı bir besleme programı yapılmayıp rasyon içeriğine fazla önem verilmemektedir. Genellikle üreme sezonuna girmeden önce rasyonda değişim yapılarak koyunlar yoğun bir beslemeye (flushing) alınmaktadır. Ancak koyun rasyonundaki ham protein oranı ve bunun döl verimine etkisi üzerinde sınırlı sayıda araştırma yapılmış olup bu konuda detaylı bilgilere rastlanılmamaktadır. Reprodüktif biyoteknoloji uygulamalarının da gelişmesi ile koyun rasyonlarının reprodüktif açıdan yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir.

Sunulan tez projesinde, koyunlarda özellikle üreme sezonuna giriş ve sürecinde yapılan rasyon değişimlerine bağlı farklı ham protein oranına sahip konsantre yemlerle beslemenin kan üre nitrojen, ovaryum fonksiyonu, fertilizasyon, uterus fizyolojisi ve embriyo kalitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sunulan bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) (Proje no:10102021) tarafından desteklenmiştir. Tez projesi 30.09.2009 tarihi ve 2009/67 karar numarası ile Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul (SÜVFEK) onayı almıştır.

Öncelikle bu çalışmada uzakta da olsak yazım sürecinin başından sonuna pozitif iletişimi ile danışmanlık desteğini ve anlayışını takdir ettiğim tez danışmanım Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ'e, önceki danışmanım olan ve tezimin oluşturulmasında ve çalışmamın tamamlanmasında emeği yadsınamayacak olan Prof. Dr. Ahmet SEMACAN'a, embriyo kalitelerini değerlendirdiğimiz Prof. Dr. Mehmet GÜLER'e çalışmamın özellikle uterus yıkama kısmında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. İbrahim AYDIN'a ve çalışma arkadaşlarım, Ülküm ÇİZMECİ ve Ayşe Merve KÖSE'ye teşekkür etmek istiyorum. Son olarak varlıklarını hep hissettiğim zor zamanlarımda hep yanımda olan ve bu vesile ile tezimin bitmesinde doğrudan olmasa da dolaylı katkılarını unutamayacağım aileme teşekkürlerimi belirtmek istiyorum.

Tez projemin yürütülebilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Selçuk Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü' ne teşekkürlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR……v

1. GİRİŞ ..... 1
1.1. Koyun Yetiştiriciliğinin Türkiye ve Dünyadaki Yeri ve Önemi ..... 1
1.2. Koyun Besleme, Günlük Besin Maddesi İhtiyacı ve Flushing ..... 3
1.2.1. Proteinler ..... 4
1.2.2. Ruminantlarda Protein Sindirimi ve Nitrojen Metabolizması ..... 5
1.2.3. Rasyonda Protein Azlığı ..... 7
1.2.4. Rasyonda Protein Fazlalılığı ..... 7
1.2.5. Ruminantlarda Optimum Reprodüktif Verim İçin Besleme Standartları .. 9
Beslenme östrus ilişkisi ..... 15
Beslenme ovulasyon ilişkisi ..... 15
Beslenmenin embriyo üzerine etkisi ..... 16
1.3. Uterus pH' sı Beslenme ve Reprodüksiyon İlişkisi ..... 16
1.4. Koyunlarda Reprodüktif Anatomi, Fizyoloji ve Seksüel Sikluslar ..... 17
1.5. Pubertas ..... 20
1.6. Fizyolojik Endokrin Düzen ve Hormonlar ..... 22
1.6.1. Gonadotropik Hormonlar ..... 23
Follikül stimulan hormon (FSH) ..... 24
Luteinleştirici hormon (LH) ..... 25
Prolaktin ..... 25
Büyüme hormonu ..... 26
Oksitosin ..... 26
1.6.2. Plasental Hormonlar ..... 27
Gebe kısrak serum gonadotropini (eCG) ..... 27
İnsan koryonik gonadotropini (hCG) ..... 27
Plasental laktojen ..... 27
Protein B ..... 28
1.6.3. Gonadal Steroid Hormonlar ..... 28
Östrojenler ..... 29
Progestagenler ..... 30
Relaksin ..... 30
İnhibin ..... 31
Prostaglandinler ..... 31
Aktivin ..... 32
1.7. Koyunlarda Östrus Siklusu ve Folliküler Dalga ..... 33
1.7.1. Proöstrus ..... 38
1.7.2. Östrus ..... 38
Östrus semptomları ve çiftleşme davranışları ..... 39
Ovaryumdaki değişimler ..... 39
Östrus siklusu esnasındaki endokrin değişimler ..... 40
1.7.3. Metöstrus ..... 41
1.7.4. Diöstrus ..... 41
1.7.5.Anöstrus ..... 41
1.8. Siklik Reprodüktif Aktivitenin Kontrolü ..... 42
1.8.1. Hormonal Olmayan Metodlarla Kontrol ..... 43
Gün ışığı düzenlemeleri / fotoperiyodun düzenlenmesi ..... 43
Besleme / Flushing ..... 44
Diğer hormonal olmayan yöntemler ..... 44

1.8.2. Hormonal Yöntemlerle Kontrol ..... 46
Anterior hipofiz hormonları salınımını uyaran preparatlar ..... 46
Östrojenler ..... 47
Progestagenler ..... 47
Prostaglandinler ..... 48
Melatonin ..... 49
Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ..... 50
Hipofiz gonadotropinlerine ek olarak veya yerini alacak şekilde kullanılan preparasyonlar ..... 51
İmmunizasyon protokolü ..... 51
1.9. Senkronizasyon ..... 52
1.10. Süperovulasyon ..... 55
1.11. Koyunlarda Çiftleştirme ve Tohumlama Yöntemleri ..... 58
1.12. Embriyo Toplama ..... 60
1.12.1. Cerrahi Yöntemle Embriyo Toplama ..... 60
1.12.2. Cerrahi Olmayan Yöntemle Embriyo Toplama ..... 61
1.13. Toplanan Embriyoların Değerlendirilmesi ve Sınıflandırılması ..... 62
1.14. Embriyo Dondurma ..... 64
1.15. Koyunlarda Embriyo Transferi ..... 67
2. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 68
2.1. Gereç ..... 68
2.1.1. Hayvan Materyali ve Seçimi ..... 68
2.1.2 Bakım Besleme Şartları ve Barınaklar ..... 68
2.1.3. Yem Materyali ..... 69
2.2.1. Koyunların Bakımı ve Beslenmesi ..... 70
2.2.2. Östrus Senkronizasyonu ..... 71
2.2.3. Süperstimülasyon Uygulaması ..... 72
2.2.4. Östrus Gözlemi ..... 72
2.2.5. Koyunların Çiftleştirilmesi ..... 73
2.2.6. Uterus Yıkama ve Embriyoların Toplanması ..... 73
2.2.7. Kan Örneklerinin Toplanması ..... 74
2.2.8. Uterus pH'sının ve Sıcaklığının Ölçülmesi ..... 75
2.2.9. Ovaryum Fonksiyonun Değerlendirilmesi ..... 75
2.2.10. Fertilizasyon ve Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi ..... 75
2.2.11. Kan Üre Nitrojen (BUN) Değerlerinin Ölçümü ..... 76
2.2.12. İstatistiksel Analizler ..... 76
3.BULGULAR ..... 78
3.1. Kan Üre Nitrojen Değerleri ..... 78
3.2. Uterus pH' sı ve Sıcaklığı ..... 80
3.3. Ovaryum Cevapları ..... 82
3.4. Süperstimülasyon, Süperovulasyon, Fertilizasyon ve Embriyo Toplama Oranları ..... 84
3.5. Embriyo Kaliteleri ..... 85
3.6. Embriyo Toplama Oranları ..... 87
4. TARTIŞMA ..... 93
4.1. Kan Üre Nitrojen Değerleri Beslenme İlişkisi ..... 94
4.2. Uterus pH' sı ve Sıcaklığı Beslenme İlişkisi ..... 99
4.3. Süperovulasyon Cevapları Beslenme İlişkisi ..... 100
4.4. Fertilizasyon Oranı Beslenme İlişkisi ..... 109

4.5. Embriyo Toplama Oranları Beslenme İlişkisi ..... 112
4.6. Embriyo Kalitesi Beslenme İlişkisi ..... 113
5. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 118
6. ÖZET ..... 120
7. SUMMARY ..... 121
8. KAYNAKLAR ..... 122
9. EKLER ..... 132
EK A. Etik Kurul Kararı ..... 132
10. ÖZGEÇMİŞ ..... 133

## SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---|---|
| aa | Aminoasit |
| BHBA | Beta Hidroksi Bütirik Asit |
| BMPs | Kemik morfogenetik proteinleri |
| BSA | Sığır serum albumini |
| BSE | Bovine Spongiform Ensefalopati |
| BUN | Kan üre nitrojen |
| Ca | Kalsiyum |
| CA | Corpus albicans |
| CAP | Klormadinon asetat |
| CIDR | Kontrollü internal ilaç salgılayıcı |
| CL | Corpora lutea |
| Cl | Klor |
| Cls | Corpus luteum spirium |
| Clv | Corpus luteum verum |
| cm | Santimetre |
| $CO_2$ | Karbondioksit |
| dk | Dakika |
| dl | Desilitre |
| DMSO | Dimetilsülfoksit |
| $E_2$ | Östradiol |
| eCG | Kısrak koryonik gonadotropini |
| FGA | Flurogeston asetat |
| FSH | Follikül uyarıcı hormon |
| g | Gram |
| GDFs | Büyüme ve farklılaşma faktörleri |
| GIT | Gastrointestinal kanal |
| GnRH | Gonadotropin salgılatıcı hormon |
| hCG | İnsan koryonik gonadotropini |
| hMG | İnsan menapausal gonadotropin |
| HP | Ham protein |
| ICM | İç hücre katmanı |

| | |
|---|---|
| IETS | Uluslararası embriyo transfer topluluğu |
| IFN$\tau$ | İnterferon tau |
| IGF-I | İnsülin benzeri büyüme faktörü |
| IUDs | İntrauterin aygıtlar |
| iv | İntravenöz |
| K | Potasyum |
| kg | Kilogram |
| l | Litre |
| LH | Luteinleştirici hormon |
| M | Molar |
| MA | Megestrol asetat |
| MAP | Medroksiprogesteron asetat |
| ME | Metabolik enerji |
| mg | Miligram |
| Mg | Magnezyum |
| MGA | Melengestrol asetat |
| Mj | Megajoule |
| ml | Mililitre |
| MOET | Çoklu ovulasyon embriyo transferi |
| N | Azot |
| Na | Sodyum |
| NEA | Norethandrone |
| NEFA | Esterleşmemiş yağ asidi |
| ng | Nanogram |
| $NH_3$ | Amonyak |
| $NH_4$ | Amonyum |
| NPN | Azot niteliğinde olmayan azotlu bileşik |
| ºC | Santigrat derece |
| OPS | Açık uçlu payet |
| P | Fosfor |
| $P_4$ | Progesteron |
| PAG | Gebelik ilişkili glikoprotein |
| PBS | Fosfat tampon solüsyonu |

| | |
|---|---|
| PG | Prostaglandin |
| PL | Plasental laktojen |
| PMSG | Gebe kısrak serum gonadotropini |
| PUN | Plazma üre nitrojen |
| rbST | Rekombinant sığır somatotropini |
| RDP | Rumende sindirilebilir protein |
| RIA | Radyoimmunoassay |
| RUP | Rumende sindirilemeyen protein |
| S | Kükürt |
| SCFA | Kısa zincirli yağ asitleri |
| SMB | Syncromate B |
| STH | Somatotropik hormon |
| SÜVF | Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi |
| TG | Trigliserid |
| UDP | Sindirilemeyen protein |
| UFO | Fertilize olmamış oosit |
| USG | Ultrasonografi |
| µg | Mikrogram |
| µl: | Mikrolitre |

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Koyun Yetiştiriciliğinin Türkiye ve Dünyadaki Yeri ve Önemi

Koyun, insanoğlunun ilk evcilleştirdiği hayvanlardan biridir. Yabani hayattan uzaklaşıp evcil hayvan statüsünde adaptasyon sağlayan koyun üzerinde uzun yıllar çalışan insanoğlu, seleksiyon ve genetik çeşitliliğe neden olan birçok yolla koyun türünde değişiklikler meydana getirmiştir. Belirli verim yönlerinde koyunları seleksiyona tabi tutarak birbirinden farklı koyun ırkları üretilmiştir. Bugün, dünya üzerinde 200'den fazla koyun ırkı bulunmakta ve yeni jenerasyonlar üretmek üzere birçok proje yürütülmektedir (Akçapınar 2000).

Türkiye'de koyun varlığı 29 milyon 284 bin baş, (TÜİK 2013) olup bu oran, dünya koyun varlığının (1.169.004.916) (FAOSTAT 2013) %2,5'una denk gelmektedir. Son yıllarda azalma göstermesine karşın Türkiye koyun varlığı açısından dünyanın önde gelen ülkelerinden biridir. Dünya genelinde bazı ülkelerde 1987-2011 yılları arasındaki koyun varlığı ve Türkiyedeki koyun varlığı karşılaştırmalı olarak Çizelge 1.1'de verilmiştir. Nitekim Türkiyedeki çalışma materyalimizin de içinde bulunduğu önemli yerli koyun ırkları, lokalize olduğu bölgeler, verim özellikleri, mevcut koyun sayıları ve ikizlik oranları ile ilgili veriler Orman-Köy İlişkileri Genel Müdürlüğü 2013 verilerine göre Çizelge 1.2'de sunulmuştur. Araştırmalara göre dünya üzerinde 1.000'den fazla koyun ırkı bulunmaktadır. Ancak, bunların çok az bir kısmı ekonomik öneme sahip ırklardır. Buna karşın tüm ırklar genetik çeşitlilik açısından bilime katkıları göz önünde tutulduğunda ayrı bir öneme sahiptir (Uysal 2013, Akçapınar 2000).

**Çizelge 1.1.** Bazı ülkelerde yıllara göre koyun varlığı (milyon/ FAOSTAT 2013).

| | **1987** | **1992** | **1997** | **2002** | **2007** | **2008** | **2009** | **2010** | **2011** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Türkiye** | 44 | 40 | 33 | 27 | 26 | 25 | 24 | 22 | 23 |
| **Avusturalya** | 149 | 148 | 120 | 106 | 86 | 80 | 73 | 68 | 73 |
| **Arjantin** | 29 | 26 | 13 | 12 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| **Almanya** | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| **Fransa** | 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| **İngiltere** | 39 | 45 | 43 | 36 | 34 | 33 | 31 | 31 | 32 |
| **İtalya** | 11 | 10 | 11 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| **İspanya** | 17 | 25 | 24 | 24 | 22 | 20 | 20 | 18 | 17 |
| **Brezilya** | 20 | 20 | 15 | 14 | 16 | 17 | 17 | 17 | 18 |
| **Amerika** | 10 | 11 | 8 | 7 | 6 | 6 | 6 | 6 | 5 |
| **Yunanistan** | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 10 |
| **İran** | 41 | 46 | 52 | 52 | 54 | 50 | 50 | 50 | 49 |

**Çizelge 1.2.** Türkiyedeki önemli yerli koyun ırkları ve bazı veriler (Uysal, 2013).

| **Koyun ırkları** | **Mevcut/baş** | **Lokalizasyon** | **Verim** | **İkizlik (%)** |
|---|---|---|---|---|
| Akkaraman | 14 552 000 | Tüm Orta Anadolu | Et ve süt düşük | 20-30 |
| Norduz | | Doğu Anadolu (Van) | Süt | 10 |
| İvesi | 1 323 000 | Güneydoğu Anadolu | Süt | 10-20 |
| Herik | | Amasya | Kombine | 10 |
| Dağlıç | 3 533 000 | Orta ve Batı Anadolu | Kombine | |
| Kıvırcık | 1 766 000 | Trakya ve Kuzeybatı Anadolu | Et ve süt iyi | 10-20 |
| Karayaka | 883 000 | Karadeniz | Et düşük ama kaliteli | 4-6 |
| Morkaraman | 7 276 000 | Doğu Anadolu | Et ve süt düşük | 20-30 |

Türkiye'de koyun varlığının %96'sı (TÜİK 2013) düşük verimli yerli ırklardan, geri kalanı merinos, merinos melezleri ve az sayıda diğer kültür ırklarının

melezlerinden oluşmaktadır. Yaşadıkları bölge koşullarına kolay uyum sağlamaları, yetersiz otlatma ve besleme koşullarına ve hastalıklara dayanıklılıkları nedeniyle düşük verimli yerli ırklar ekonomik zorluklar içindeki yetiştiriciler için günümüzde de önemini korumaktadır (Akçapınar 2000).

### 1.2. Koyun Besleme, Günlük Besin Maddesi İhtiyacı ve Flushing

Koyunların yaşamlarını sağlıklı olarak sürdürebilmeleri ve canlı ağırlıklarını koruyabilmeleri için günlük yaşam payı ihtiyaçlarının karşılanması gerekmektedir. Pratik olarak yaşam payının hesaplanabilmesi için koyunların, ergin, yün üretimi için yapağısı kesilmeyen, aşım sezonunda veya erken gebe olmayan, kuraklık gibi kıtlık durumlarına maruz kalmamış olması gerekmektedir. Yaşam payı ihtiyacının karşılanması amacıyla, homeotermi ve normal vital parametrelerin devamı için vücuda gerekli besinin sağlanması, feçes, idrar ve deriden zorunlu kayıpların telafi edilmesi ve fiziksel aktivite için gerekli besinin sağlanması gerekmektedir. Böylece tüm kayıplar telafi edilmiş olmaktadır. Etkili bir besleme yönetimi için de yaşam payı ihtiyacının hesaplanması gerekmektedir. Günlük besin ihtiyacı, genotip, yaş ve fizyolojik statü, yılın sezonu, hastalıklar ve paraziter enfestasyon, besleme düzeyi ve besleme yönetimine göre değişmektedir. Yem alımının artması ile birlikte aslında o yemi metabolize etmek için harcanan enerji miktarı da artmaktadır. Acil protein ihtiyacı, rumende sindirilebilir protein veya protein olmayan kaynaklardan nitrojen ihtiyacının karşılanması rumendeki mikrobiyal fermentasyonun aktivasyonu için gereklidir. Günlük nitrojen (N) ihtiyacı, kuru maddede 10,0-62,5 g/kg ham protein arasında değişmektedir. Düşük protein konsantrasyonları hızlı bir şekilde mikrobiyel parçalanmaya uğramakta ve mikrobiyal pasaj göreceli olarak engellenmektedir. Bu nedenle yem alımı da önemli oranda azalmaktadır. Koyunların net mineral ihtiyacı, vücudun, idrar, dışkı ve deriden özellikle sodyum (Na) ve potasyum (K) kaybının hesaplanması ile belirlenmektedir. Bunun yanında örneğin kükürt (S) ihtiyacı temel olarak protein sentezi ve rumen mikroorganizmalarının gelişimi ile artmaktadır. Sonuç olarak gereksinim, mineral konsantrasyonundan çok, diyetin N potansiyeli referans alınarak ölçülmektedir. Koyun için rasyonun N oranı 0,08; yani 12,5 g N; 1,0 g S olarak önerilmektedir. Koyunlarda K ve klor (Cl) yetersizliğine pek rastlanmazken aynı zamanda merada otlatılan koyunlarda fosfor (P) yetersizliğinin de görülmediği bildirilmektedir. Kalsiyum (Ca) yetersizliğine ise koyunlar sadece hububat yemleriyle beslendiğinde rastlanılmaktadır. Kaba yeşil yem alamayan

koyunların yemlerine ise günlük 15 g/kg Ca ilavesi yapılması gerektiği bildirilmektedir (Corbett ve Ball 2002).

### 1.2.1. Proteinler

Proteinler, yüksek moleküler ağırlıklı kompleks organik yapılardır. Genellikle karbonhidratlar ve yağlarla birlikte bulunmakta, karbon, hidrojen ve oksijen içermekte bununla birlikte tüm proteinler N ve genellikle sülfür grubu taşımaktadır. Proteinler, enzim, asit veya alkaliler tarafından hidrolize edildiğinde amino asitlerine (aa) ayrışmaktadır. Biyolojik materyallerden 200'ün üzerinde amino asit izole edilmiştir. Ancak bunlardan sadece 20 tanesi sıklıkla protein komponenti olarak bulunmuştur. Amino asitler basit bir nitrojen grubu, genellikle bir amino (-$NH_2$) grubu ve asidik karboksil ünitesinden (-COOH) oluşmaktadır. Proteinler, aa yapılarından oluşmuştur. Bitkilerde bilinen yüzlerce aa bulunmaktadır. Ancak hayvanlarda sadece 20 tane aa yapısı bulunmaktadır. Bunlardan sadece 10 tanesi dokulardan sentezlenmektedir. Dolayısı ile diğer aa'ların diyetle alınması sağlanmalıdır. Dokular tarafından sentezlenemeyen aa'lara esansiyel aa'lar adı verilmektedir. Essansiyel aa'larin diyetlere takviye edilmesi gerekmektedir. Dokular tarafından sentezlenen aa' lar ise esansiyel olmayan aa'lar olarak adlandırılmaktadır. Esansiyel ve esansiyel olmayan aa'lar Çizelge 1.3'te verilmiştir. (McDonald ve ark 2001, Yalçın 2001, Cheeke 2005).

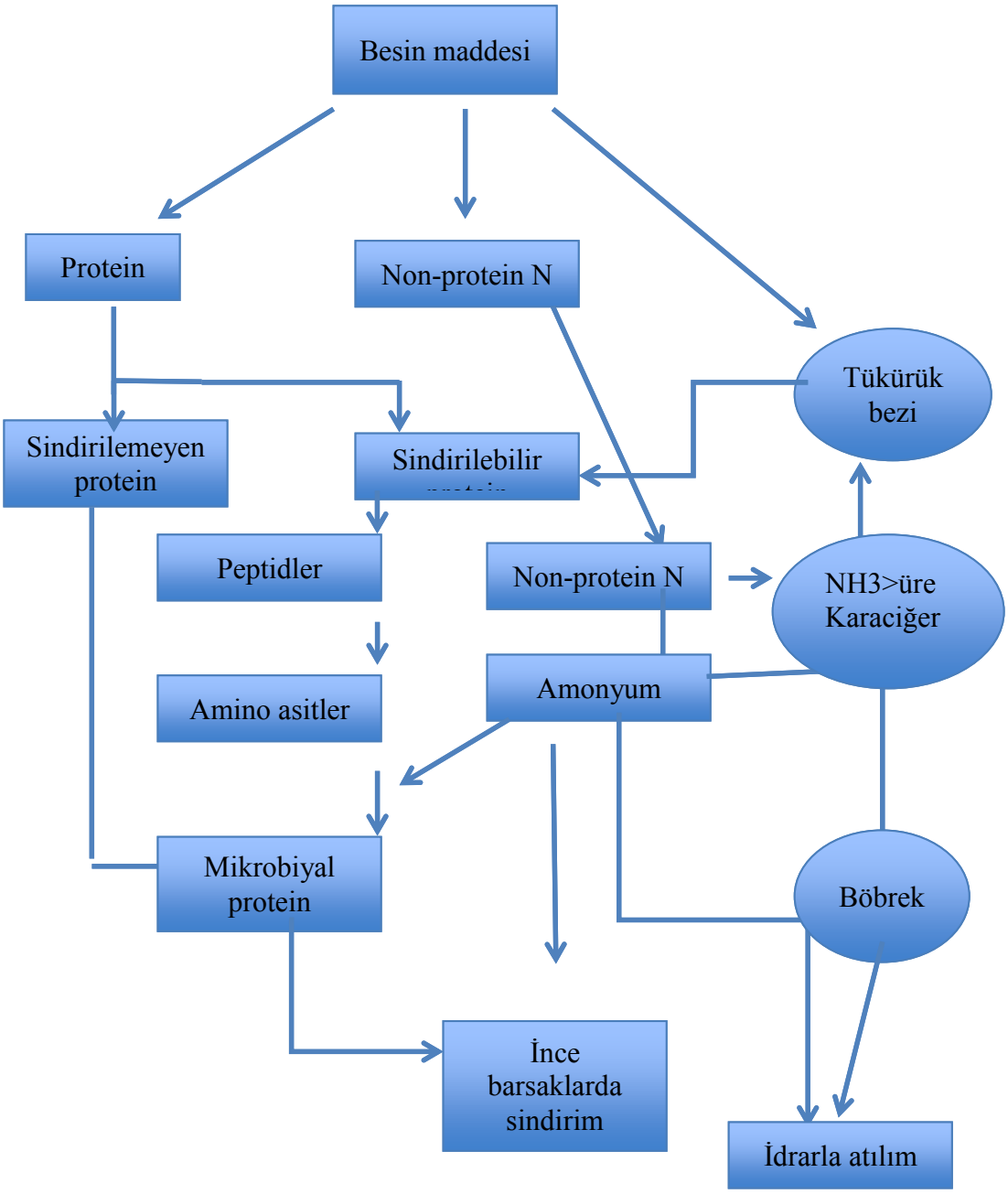
**Çizelge 1.3.** Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler (McDonald ve ark 2001).

| Esansiyel aa | Esansiyel olmayan aa |
|---|---|
| Arginin | Alanin |
| Histidin | Aspartik asit |
| İzoleusin | Sistein |
| Leusin | Sistin |
| Lizin | Glutamik asit |
| Metiyonin | Glisin |
| Fenilalanin | Prolin |
| Treonin | Serin |
| Triptofan | Tirozin |
| Valin | |

Tüm proteinler kolloidal özelliktedir. Suda çözünürlüklerine göre farklılaşırlar ve bu suda çözünemeyen keratinden, suda yüksek oranda çözünen albumine kadar değişmektedir. Çözünebilir proteinler sodyum klorid ve amonyum sülfat gibi tuz solüsyonlarında kolayca presipite edilebilmektedirler. Tüm proteinler denatüre olabilmekte veya kendi doğal yapılarını kaybedebilmektedirler. Denatürasyon proteolitik olmayan her hangi bir yoldan proteinin doğal protein yapısının bozulması veya kimyasal yapısındaki, fiziksel veya biyolojik özelliklerinin değişimi anlamlarını taşımaktadır. Protein hidrolizinin ürünleri bu terim altında değerlendirilmemelidir. Isı, asitler, alkaliler, alkoller, üre ve ağır metal tuzları gibi birçok ajan proteinlerin denaturasyonuna neden olabilmektedir. Isı zararına karşı duyarlılığın ortamda farklı karbonhidratların bulunması ile arttığı bildirilmektedir (Yalçın 2001).

### 1.2.2. Ruminantlarda Protein Sindirimi ve Nitrojen Metabolizması

Alınan proteinler öncelikle rumen mikroorganizmalarınca peptidlere ve amino asitlere hidrolize olmakta, ancak bazı aa'lar daha sonra organik asitlere, amonyum ve karbondiokside indirgenmektedir (Sarraseca ve ark 1998). Ruminantlardaki azot döngüsü Şekil 1.1'de kısaca şematize edilmeye çalışılmıştır.




**Şekil 1.1.** Ruminantlarda azot döngüsü (McDonald ve ark 2001'den düzenlenmiştir).

Rumen sıvısındaki amonyum, mikrobiyal sindirimin ve protein sindiriminin anahtar aracısıdır. Eğer diyet protein bakımından yetersiz olursa veya proteinler sindirilemezse rumen amonyum konsantrasyonu düşecektir (yaklaşık 50 mg/l) ve rumen mikroorganizmalarının gelişimi yavaşlayacaktır. Sonuç olarak karbonhidratların parçalanması duracaktır. Diğer taraftan protein sindirimi sentezinden daha hızlı olursa amonyum rumen sıvısına karışır ve optimum konsantrasyon aşılmış olur. Bu olduğunda ise amonyum kan tarafından absorbe

edilir, karaciğere taşınır ve üreye dönüştürülür. Bu ürenin bir kısmı tükrük yoluyla tekrar rumene dönmekte ve hatta rumen duvarına geçmekte ancak büyük bir kısmı idrar ile atılmakta ve böylece boşa gitmektedir. Rumen sıvısındaki amonyumun optimum konsantrasyonu 85 ile 300 mg/l arasında değişmektedir. Eğer rasyon yetersiz miktarda protein içerirse ve rumen sıvısındaki amonyum konsantrasyonu düşük olursa N kandan rumene üre olarak dönmektedir (McDonald ve ark 2001, Reynolds and Kristensen 2008).

### 1.2.3. Rasyonda Protein Azlığı

Erişkin ruminantlarda rumen mikroorganizmaları sayesinde protein niteliğinde olmayan azotlu bileşiklerden (NPN) aa ve protein sentezlenebilmektedir. Protein eksikliği, aa dengesizliği sonucu şekillenebileceği gibi yetersiz beslenme veya protein / enerji dengesizliğinden de kaynaklanabilmektedir. Rasyon protein ve esansiyel aa bakımından yetersiz olduğunda yemin değerlendirilme derecesi azalmakta, büyüme hızı düşmekte, döl verimi azalmakta, anemi, enzim aktivitesinde aksama ve dolayısıyla metabolik bozukluklar ve hastalıklara duyarlılık gibi bazı genel semptomlar gözlenebildiği bildirilmektedir (Yalçın 2001, Cheeke 2005).

### 1.2.4. Rasyonda Protein Fazlalılığı

İhtiyacının üzerinde protein alan hayvanlarda kan ve rumen sıvısında üre ve amonyak ($NH_3$) miktarı yükselir ancak yükselen $NH_3$ miktarı toksik düzeye ulaşmaz. Çok yüksek oranda protein içeren rasyonlarla beslenen hayvanlarda herhangi bir patolojik bulgu görülmemesine karşılık yem tüketimi azalmakta ve su tüketimi artmaktadır. Rumen mikroorganizmaları proteinlerin büyük bir kısmını ve protein olmayan azotlu bileşikleri (NPN) hatta besin karbonhidratlarını fermente ve modifiye edebilmektedir. Mikroorganizmalar tarafından sindirilen besinlerdeki nitrojenler N kaynağı olarak kullanılmakta ve rumende sindirilebilir ham protein (RDP) olarak tespit edilmektedir. Rasyon gerçek proteinlerinin farklı fraksiyonları bulunmakta geri kalanlar ise sindirilemeyen veya bir kısmı sindirilebilen proteinler olarak adlandırılmaktadır. Bu fraksiyonlar kalın barsaklara geçmekte ve mikrobiyal proteinlere bağlanarak barsak sindirimine maruz kalmaktadır. Diyet yönetimi ve besleme standartlarına göre bu fraksiyon da 'kaçan protein', "*bypass protein*", veya "*sindirilemeyen diyet proteini*" (UDP) olarak adlandırılmaktadır. RDP kaynakları

bitki veya mikrobiyal proteazlar tarafından dekarboksilasyon ve/veya deaminasyonla ilk olarak peptidlerine ve son olarak amino asitlerinden amonyum ve kısa zincirli yağ asitlerine (SCFA) ayrışmaktadır. Bu fermentasyon, diyet NPN kaynaklarının rumen mikroorganizmaları tarafından aminler veya üre gibi farklı derecelerde asimile edilmesine yol açmakta veya enzim formlarına ve yapısal proteinlere dönüştürülmektedir. Mikroorganizmalardaki katabolik (protein ve karbonhidrat sindirimi) ve anabolik (yeni protein oluşumu, polisakkarit ve nükleik asit formasyonları) işlemlerinin kendiliğinden ve farklı türlerde farklı derecelerde gerçekleştiği bildirilmektedir (Yalçın 2001, Cheeke 2005). Ruminantlar için protein değerlendirme sisteminde proteinler, sindirilme ve metabolize olma durumuna göre sınıflandırıldığında rumende sindirilebilir proteinler (RDP) ve rumende sindirilemeyen proteinler (RUP) olarak ikiye ayrılmaktadır. Rumende sindirilebilir proteinlerin mobilizasyonunun tek başına ruminantlarda reprodüksiyon üzerine negatif etkisinden bahsedilemez. Ancak proteinler rumende fazlaca sindirildiğinde veya enerji kaynağı olarak kullanıldığında $NH_3$ ve üre gibi metabolik kalıntıları fazla miktarda açığa çıkmaktadır. Bu rezidülerin ise reprodüksiyon ve fertilite üzerine olumsuz etkileri olabileceği bildirilmektedir. Amonyumun ovulasyon öncesi olumsuz rolünden bahsedilirken, ürenin genel olarak fertilizasyon sonrası olumsuz etkilerinden bahsedilmektedir. Bununla birlikte amonyumun negatif enerji dengesini daha da kötüleştirdiği ve siklusun başlamasını geciktirerek fertiliteyi düşürdüğü bildirilirken, ürenin uterus sıvısının pH'sını düşürdüğü ve buna paralel olarak folliküler gelişim ve embriyonik gelişim üzerine olumsuz etkisi olduğundan bahsedilmektedir (Tamminga 2006).

Ürenin kandan gastrointestinal kanala (GIT) geçişi birçok memelide görülmektedir. Ancak ruminantlarda N mikroorganizmalar tarafından kullanılarak farklı aa'lar de sentezlenebilmektedir. Bu durum ruminantların iyi olmayan besleme şartlarında da hayatlarını sürdürülebilmelerini sağlayacak bir avantaj oluşturmaktadır. Fizyolojik değişiklikler, böbreklerde azalan plazma filtrasyonu ve böbreklerin iç medullar duktusunda üre absorbsiyonunun artmaya başlaması özellikle düşük N diyeti ile beslenen hayvanlarda görülmekte böylece üre ekskresyonu da artmaktadır (Marini ve Van Amburgh 2003).

Emilmiş nitrojen elementlerinin geniş anlamıyla değerlendirilmesi düşünüldüğünde ruminantlarda besleme yönetiminde amaç, atılan uçucu azot gazı

miktarını azaltmakla birlikte yine uçucu üriner üre azotunu azaltmaktır. Sütçü ineklerde N atılımını azaltıcı yöntemler; yem miktarının azaltılması, döngü içerisindeki N'in mikrobiyal proteinlere dönüştürülerek değerlendirilebilirliğinin artırılması ve emilebilir aa miktarının artırılması olarak düşünülmektedir. Mikrobiyal protein sentezinde kullanılan amonyumun değerlendirilebilirliğinin artırılması için diyet karbonhidrat ve protein miktarı ve tipinin ve sindirilebilirliğinin değiştirilmesi düşünülmekte ve öngörülmektedir. Uzun yıllardan beri ruminantların rumenden amonyağın önemli bir kısmını absorbe ettiği ve bunun primer sonucu olarak proteinlerin mikrobiyal indirgenmeye maruz kaldığı düşünülmektedir. Amonyağın bir kısmı mikrobiyel protein sentezinde kullanılmak üzere salınırken portal ven ve sonuç olarak karaciğer tarafından absorbe edilmektedir. Karaciğer tarafından alınan amonyağın büyük bir kısmı üreye çevrilmekte veya glutamattan glutamin sentezinde kullanılmaktadır (McDonald ve ark 2001, Cheeke 2005, Sunny ve ark 2007).

Plazma üre konsantrasyonu (PUN) arttıkça rumen $NH_3$ konsantrasyonu da artmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda koyunlarda düşük protein diyeti ile beslemenin rumen $NH_3$ konsantrasyonu ve kan üre infuzyonu ile birlikte barsaklardan üre emilimini de artırdığı bildirilmektedir (Reynolds ve Kristensen 2008).

Kohn ve ark (2005), BUN konsantrasyonu ile üriner N konsantrasyonu arasındaki bağlantıyı ve farklı türlerde önemli değişiklikler gösteren BUN konsantrasyonun matematik hesaplamaları üzerine çalışmış ve araştırma sonucunda BUN konsantrasyonu ile üriner N çıkışı arasında doğrusal bir ilişki bulunduğunu belirlemişlerdir. Böbreklerden üre atılımı klirensi domuz ve ratlarda herbivorlara göre daha yüksektir. Kan üre konsantrasyonu, vücut ağırlığı, günlük süt üretim kapasitesi, günlük besin alımı, üriner N çıkışı, fekal N çıkışı ve N'un sindirimde kullanılma oranı ile ilişkilidir.

### 1.2.5. Ruminantlarda Optimum Reprodüktif Verim İçin Besleme Standartları

Reprodüksiyon, hayvanların besin ihtiyaçlarını artırmakta ve bununla birlikte hayvanların besin maddesi alımları onların reprodüktif süreçlerini etkileyebilmektedir. Beslemenin reprodüksiyon üzerine etkisi erken yaşlarda başlamaktadır. Bununla bağlantılı olarak genç yaşlardaki hayvanların besleme

statüleri pubertasa ulaşma yaşını da etkilemektedir. Ergin hayvanlarda yetersiz besleme oosit ve spermatozoa üretimini veya kalitesini azaltabilmektedir. Yetersiz besleme sonrası dişi hayvanlarda reprodüktif verim azalmakta, konsepsiyon oranı düşebilmekte ve normalden daha az sayıda yavru alınmasına neden olmaktadır. Gebelik durumunda gebeliğin sürdürülmesi ve fötusun büyüyebilmesi için ise bazı spesifik besin ihtiyaçlarının karşılanması gerekmektedir. Memelilerde oosit ve spermatozoanın üretimi için gerekli besin gereksinimi az miktardadır ve dolayısı ile çok fazla önem arzetmemektedir. Örneğin bir koç her bir ejakulasyonda 1,5-2,5 ml ejakulat çıkarmakta ve bunun için 0.4 Mj ME enerjiye ihtiyaç duymakta ancak bu miktar günlük metabolizma için gerekli enerjinin (23.8 Mj ME) yüzde ikisini oluşturmaktadır. Kanatlılarda bir yumurtanın üretimi için gerekli besin ihtiyacı ise diğer türlere göre yüksek olmasına karşın gebelik durumunda memelilerde fötusun büyümesi için gerekli besin miktarı toplam ihtiyacın çok az bir kısmını oluşturmaktadır. Örneğin her biri 7 kg ağırlığında ikiz yavruya sahip gebe bir koyunun günlük besin ihtiyacının fötus ve diğer dokular (plasenta gibi) için 1,4 g protein olduğu tüm gebelik boyunca ise günlük ortalama 10 g proteinden daha az olduğu hesaplanmıştır. Koyunların beslemesinin önemli bir bölümünü otlamak oluşturmaktadır. Bundan dolayı diğer türlerden farklı olarak koyunlarda otlatmanın yapılandırılması ve maksimize edilmesi ve dolayısı ile konsantre yem kullanımının minimize edilmesi için bir efor sarfedilmesi gerekmektedir. Türkiye'de bir çok bölgede otlatma mevsimi geçici otlatma ile, yatık otların veya anızların (ekin kalıntılarının) otlatılması ile uzatılabilemektedir. Enerji ve protein ihtiyaçları etçi sığırlara benzeyen koyun ve keçiler, sığırlara göre düşük kaliteli otlarla beslenip hayatta kalabilmelerine rağmen sığırlarınkinden daha iyi mera şartlarına gereksinim duyarlar. Bir başka ifadeyle küçük ruminantlar daha yüksek besleme gereksinimine ve sığırlardan daha yüksek kaliteli yemlere ihtiyaç duyarlar. Bundan dolayı sadece karışım halindeki, pelet veya konsantre yemlerle beslendiklerinde bile sığırlardan daha yüksek kalitede besine ihtiyaç duyarlar. Koyunlar aşım sezonunda besleme statülerinin yükseltilmesine veya flushinge iyi yanıt verirler. Ancak koyunların flushing'e yanıtları değişebilmektedir. Yetiştiriciler flushing ile kuzulama oranının %10-20 oranında artmasını beklerler. Aşımdan iki hafta önce taze otlar veya diğer iyi kaliteli yemlerle besleme ya da çiftleştirmeden 2-3 hafta önce koyun başına günlük 250-500 g tane yem verilmesi gibi yöntemler flushing amacıyla kullanılabilmektedir. Kızıl yonca gibi bazı östrojenik içerikli yemlerin verilmesinin ise bilinenin aksine

fitoöstrojen içerdiklerinden dolayı fertiliteyi düşürdüğü bildirilmektedir (Robinson 1996, Cheeke 2005, Scaramuzzi ve ark 2006, Ashworth ve ark 2009).

Beslemenin fertilite üzerine etkisi, fetal gonadların oluşumu ve postnatal gelişimlerine, pubertasa ulaşma yaşına ve çoklu ovule olan türler için ovulasyon oranlarına etkisini kapsamaktadır. Yine doğumdan yeniden üremeye kadar geçen süreç, ovum kalitesi, embriyo gelişimi ve embriyo yaşama gücünün de fertilite için diğer bazı majör belirleyiciler olduğu bildirilmektedir. Nitekim koyunlarda yapılan son çalışmalar göstermiştir ki annenin beslemesine oldukça duyarlı olan fetal ovaryumların erken dönemdeki gelişimi yaşam boyu ovulasyon kabiliyetleri üzerine de etkilidir. Nitekim ovaryumdaki primordiyal folliküler havuzdan çıkmaya başladıkları dönemdeki (koyunlarda yaklaşık olarak ilk ovulasyondan 6 ay önce) besleme, koyunlarda ovulasyon oranlarını ve sığırlarda oosit kalitesini etkilemektedir (Robinson ve ark 2006).

Dişi hayvanlarda fertilitenin ve üreme kabiliyetinin primer belirleyicisi ovaryumdan atılan oosit sayısı ile ya da bir başka deyişle ovulasyon oranı ile doğru orantılıdır. Sığırlarda bu oran normalde ortalama bir iken koyunlarda ortalama 1-3 arasında ve domuzlarda ise 15-25 arasında bulunmaktadır. Ancak tüm oositler fertilize olamamakta ve hepsi sağlıklı yavru oluşturamamaktadır. Örneğin 100 koyunluk bir sürüde tek bir östrus siklusunda ortalama 220 oosit atılmakta ancak sadece 190 tanesi fertilize olabilmekte ve bunların 175 tanesi ilk 15 günlük erken gebelik sürecinden sonra hayatta kalmakta ve plasentaya tutunmaktadır. Buna karşın ancak 170 tanesinin tüm gebelik sürecini tamamlayabildiği ifade edilmektedir. Uzun süren bir aşım periyodundan 3-4 hafta önce yağlandırılan veya yoğun bir besi programına alınan koyunların daha yüksek oranlarda konsepsiyon oluşturdukları, ikiz ve üçüz yavru oluşturma oranlarının zayıf kondüsyondaki hayvanlara göre daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu hayvanların düşük kondüsyondan daha yüksek düzeyli besleme ile yüksek kondüsyona alınma durumu ise flushing olarak adlandırılabilmektedir. Gonadotropik hormon (GnRH) ve Luteinleştirici hormon (LH) oositlerin maturasyonu ve ovulasyon için gereklidir. Bununla birlikte düşük besleme düzeyinin LH salınım sıklığını azalttığı bildirilmektedir. Flushing ise bu durumu engelleyerek ovulasyon oranını artırmaktadır. Flushing etkisinin bir başka endokrinolojik açıklaması da glikoz alımını ve kan insulin seviyelerini artırması ve buna bağlı olarak ovaryumdan steroid sentezini artırması ile açıklanmaktadır. Ayrıca

beslenmenin ovaryum üzerine direkt etkisi bulunmakta ve koyunlarda intra-venöz (iv) glikoz sağaltımı oositlerin daha hızlı büyümesine neden olmaktadır. Ancak ovulasyon zamanında koyunlarda çok uygun bir besleme dengesi oluşturulması gerekmektedir. Zira yüksek düzeyde besleme oosit kalitesini ve fertilizasyondan sonra oluşacak embriyo kalitesini de olumsuz etkileyebilmektedir. Bu durumun nedenlerinden bir tanesi yüksek besin düzeyinin progesteron ($P_4$) metabolizmasını uyarması olarak düşünülmektedir. Ancak kan $P_4$ düzeyini iki olay belirler. Hayvan gebe değil ise veya erken gebe ise; ilki Cl'den salınan $P_4$, diğeri ise beslenmeye bağlı olarak hepatik temizlenme ile karaciğerden metabolize edilen $P_4$ düzeyidir. $P_4$ kolesterolden sentezlendiği için hepatik temizlenme artınca $P_4$ düzeyi de buna bağlı olarak düşer. Bununla birlikte bu durumu egale edebilmek için özellikle aşımdan sonra besleme düzeyleri günlük ihtiyacı karşılayabilecek seviyelere çekilmelidir. Sığırlarda tohumlama sonrası yüksek düzeyde besleme koyunlara göre daha az zarara neden olmaktadır. Protein yetersizliğinin ruminantlarda reprodüksiyonu olumsuz etkilediği çünkü yem alımını azalttığı bildirilmektedir. Diğer taraftan son yapılan çalışmalarda rumendeki UDP'nin (sindirilemeyen protein) sığırlarda ve koyunlarda ovulasyon oranını artırdığı bildirilmektedir. Yüksek miktarda RDP (sindirilebilir protein) verilen ineklerde kan amonyum seviyelerinin de değiştiği buna bağlı olarak endometriyumdaki iyon akışının etkilendiği ve buna paralel olarak embriyoların canlılık oranının da azaldığı bildirilmektedir (McDonald ve ark 2001).

Periferal $P_4$ konsantrasyonu ile besleme arasındaki ilişki de birçok şeyi açıklamaktadır. Yüksek enerji ile beslenen koyunlarda karaciğerin metabolik kapasitesi arttığından steroidlerin katabolizması da artmakta ve $P_4$ bundan olumsuz etkilenmektedir. Buna bağlı olarak da yüksek enerjili rasyonla beslenen koyunlarda embriyo mortalitesi artmaktadır (Lozano ve ark 2003). Ancak tüm bunlarla birlikte negatif ve pozitif enerji dengesinin de değerlendirilmesi gerekmektedir (Scaramuzzi ve ark 2006). Nitekim enerji dengesi ile reprodüksiyon arasındaki ilişki Çizelge 1.4'de özetlenmeye çalışılmıştır.

**Çizelge 1.4.** Enerji dengesi ile reprodüksiyon arasındaki bazı ilişkiler (Scaramuzzi ve ark 2006).

| Metabolik statü/durum | Metabolik sonuç | Reprodüksiyona etkisi |
|---|---|---|
| Negatif enerji dengesi | Kilo kaybı | GnRH sekresyonunun inhibisyonu |
| | Yağ depolarının azalması | LH dalgalarının yokluğu |
| | Kas zayıflığı | Düşük FSH konsantrasyonu |
| | Hipoinsulinemi | Follikülogenezisin inhibisyonu |
| | Hipoglisemi | Düşük östradiol |
| | BHBA ve NEFA artışı | Yüksek negatif feedback duyarlılığı |
| | GH artışı | Anovulasyon |
| | Düşük Leptin | Anöstrus |
| | Metabolik ısı kaybı | Gecikmiş pubertas |
| | IGF sisteminin baskılanması | |
| | Üre artışı | |
| Pozitif enerji dengesi | Uzun süreli kilo artışı | Normal GnRH sekresyonu |
| | Yağ depolarında artış | Normal LH dalgalanması |
| | Hiperinsülinemi | Artan FSH konsantrasyonu |
| | Hiperglisemi | Follikülogenezisin uyarımı |
| | Düşük ßOH bütirat ve NEFA | Azalan östradiol |
| | Düşük GH | Negatif feedback etkisinin azalması |
| | Leptin artışı | Ovulasyon |
| | Metabolik ısı artışı | Östrus |
| | IGF sisteminin stimulasyonu | Maksimum doğal ovulasyon oranı |
| | Eğer nitrojen yüksekse üre de yükselebilir | Pubertasın erken gelişmesi |

Luteolizisten sorumlu temel hormon $PGF_{2\alpha}$ olmakla birlikte interferon tau (IFN-τ)'nun ruminantlarda temel embriyonik antiluteolitik sinyalde görevli olduğu bilinmektedir. IFN-τ'nun, östrojen ve oksitosin reseptör genlerinin koyun endometriyumundan transkripsiyonunu engellediği bildirilmektedir (Spencer ve Bazer 1996). Böylece dolaşımdaki oksitosine yanıt olarak $PGF_{2\alpha}$, PGE'ye dönüştürülmekte ve böylece luteolizis de engellenlenmektedir (Asselin ve ark 1997). IFN-τ trofoektoderm hücreleri tarafından gebeliğin 11-20. günleri arasında sentezlenmekte ve 15. günde maksimal sentez seviyesine ulaşmaktadır. Embriyo kalitesindeki değişimin de IFN-τ sekresyonunu etkileyebileceği bildirilmektedir (Lozano ve ark 2003).

Koyunlarda oosit/embriyo kalitesi aşım döneminde ve öncesinde besleme durumundan etkilenmektedir. Perikonsepsiyon beslemesinin koyunlarda ovulatör performansla birlikte reprodüktif verimde önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. Örneğin östrus siklusunun başlamasından önce mera otlamasının üç haftadan fazla artırılması veya altı günden uzun bir süre yüksek protein diyetiyle besleme siklusta ovulasyon oranını artırmaktadır. Diğer taraftan beslemenin oosit ve embriyo kalitesi üzerine etkisi ise daha az bilinmektedir. Ancak yapılan çalışmalar besin takviyeleri ile ovulasyon oranının artırılmasının oosit ve embriyo kalitesi üzerine zararlı etkilerinin olabileceğini göstermiştir. Beslemenin oosit ve embriyo kalitesi üzerine etkisi genellikle süperovule edilen hayvanlarda çalışılmıştır. Nitekim McEvoy ve ark (1995)'nın yaptıkları çalışmada süperovule edilen koyunlarda günlük ihtiyacın 2,3 katı fazla yemle beslenen koyunlarda 0,6 katı fazla beslenenlere göre toplam canlı embriyo sayısı önemli oranda daha yüksek iken her bir koyundan elde edilen embriyo sayısı ve ovulasyon oranları açısından ise önemli bir fark bulunamadığı bildirilmiştir.

Creed ve ark (1994) ise yaptıkları çalışmada superovulasyon çalışmasından 12 gün önce flushing beslemesi yapmış ancak ovulasyon oranları ve toplanan embriyo sayılarının değişmediğini bildirmiştir. Ancak yüksek oranda flushing yapılan koyunlarda flushingten 2 gün sonra daha az sayıda oosit toplanabildiğini görülmüştür. Bu bulgular embriyo kalitesinin nelerden etkilendiği ile ilgili iki soruyu akla getirmektedir. Birincisi; beslemenin etkileri gelişen oositte mi yoksa embriyoda mı daha çok olmaktadır? Yapılan çalışmalarda sonuç olarak oositin bu durumdan bir miktar etkilendiğini gösterdiği bildirilmektedir (Webb ve ark 2012). Bununla birlikte Lozano ve ark (2003) düşük beslemeye göre ad-libitum beslemeden oositin, morfolojik sınıflandırma ve blastosiste ulaşma oranları ölçüt alındığında daha olumsuz etkilendiğini bildirmişlerdir. Benzer olarak Papadopolous ve ark (2001), günlük ihtiyacın iki katı beslenen koyunlardan toplanan oositlerde in vitro blastosiste ulaşma oranlarının daha düşük olduğunu buna karşın günlük ihtiyacın yarısı besinle beslenenlerde ise blastosist veriminde bir azalma olduğunu bildirmişlerdir (Borowczyk ve ark 2006).

Beslenme ve reprodüksiyon arasındaki ilişki bireylerde ve sürülerde reprodüktif performansı etkileyen önemli bir etkendir. Ancak arkasındaki fizyolojik mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir. Yüksek kaliteli kaba yemle adlibitum

olarak beslenen hayvanlarda genellikle reprodüktif bir problemle karşılaşılmadığı varsayılmaktadır. Değişken besleme ortamlarında en başarılı strateji özellikle reprodüktif aktivitenin yoğun olduğu dönemde hayvanların iyi besleme şartlarına maruz bırakılmalarıdır. Nitekim reprodüktif aktivitenin yüksek olduğu dönemde ilave besin uygulamasının reprodüktif performansa olumlu etkisinin olacağı düşünülmektedir (Kakar ve ark 2005).

Koyunlarda follikül maturasyonu için altı haftalık bir periyoda gereksinim duyulduğu belirtilmektedir. Bu nedenle reprodüktif performansı artırma girişimleri için diyet düzenlemelerine aşımdan altı hafta önce başlanması gerektiği düşünülmektedir. Ancak iyileştirilmiş besleme şartlarının bile follikül atrezisini tam olarak engelleyemediği gözlenmektedir. Yine bununla birlikte diyet düzenlemelerinin özellikle kritik aşamada atrezi olasılığını azalttığı bildirilmektedir (Lindsay 1976, Robinson ve ark 2002).

**Beslenme östrus ilişkisi**

Yetersiz beslemenin koyunların bir kısmında östrus davranışlarının gözlenmemesine, ovulasyonun aksamasına veya östrussuz (suböstrüs) ovulasyonlar görülmesine neden olabildiği düşünülmektedir. Ancak, aşım esnasında yetersiz besleme nedeniyle zayıflayan koyunların normal VKS'ye sahip koyunlardan benzer östrus gösterme oranlarına sahip olduğunu göstermiştir. Fakat koyunların östrus semptomu göstermemelerinin aşım sezonu öncesi ve esnasında ciddi kondüsyon kayıplarına uğramalarıyla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (Jainudeen ve Hafez 1993).

**Beslenme ovulasyon ilişkisi**

Ovulasyon oranı ile besleme arasında uzun zamanlardan beri sürekli değişen bir ilişki kurulmaktadır. İlk olarak "Underwood ve Shire (1941)" aşımdan altı hafta önce artan besin miktarının ikizlik oranının artmasına neden olduğunu göstermiştir. "Moule (1962)" artan besin miktarının koyunlarda canlı ağırlık ve ikizlik oranlarının artışına neden olduğunu bunların birbiriyle pozitif ilişki içerisinde bulunduğunu bildirmiştir. Bir çok araştırmacı koyunlarda kötü besleme şartlarına bağlı olarak yoğun canlı ağırlık kaybı sonucunda ovulasyonun olmayacağını da bildirmişlerdir (Lindsay 1976).

Besin alımındaki ani düşüşlerin koyunlarda embriyo kalitesini artırdığı düşünülmekte, bununla birlikte ovulasyon oranında ise azalma olmaktadır. Sığırlarda ise ovulasyondan önce kısa süreli yem sınırlamaları izleyen gebelik oranlarını artırmaktadır. Sonuç olarak süperovulasyon sağaltımından kısa süre önce ve esnasında düşük enerjili yemle beslemenin daha çok sayıda follikül sağladığı ve embriyo kalitesini (ICM, hücre sayısı ve blastosist sayısı) artırdığı bildirilmektedir (Nolan ve ark 1998).

**Beslenmenin embriyo üzerine etkisi**

Besleme durumunun embriyo yaşama gücü üzerine önemli zararlı etkileri olabilmektedir. Vitaminler, iz elementler ve proteinler gibi spesifik besleme gruplarının embriyo üzerine zararlı etkileri bulunmaktadır. Retinoidler hepsi embriyonun hayatta kalmasıyla ilişkili olan, temel vitamin A metabolitleri olup hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında, büyüme faktörlerinin ekspresyonunda, gen transkripsiyonunda ve steroidogeneziste görev almaktadır. Folik asit de vitamin C metaboliti olup nükleik asit sentezi, luteal fonksiyon ve steroidogeneziste kofaktör rolü oynaması nedeniyle erken gebelik sürecinde etkisi vardır. Selenyum yetersizliğinin giderilmesi embriyo mortalitesini azaltmakta ve uterus kontraksiyonlarını artırmak ve sperm transportu yoluyla fertilizasyon oranını artırmak gibi etkileri bulunmaktadır. Son zamanlarda yüksek proteinin sütçü ineklerde fertiliteyi olumsuz etkilemesinin mekanizması araştırılmış ve artan protein düzeyi ile birlikte artan amonyum ve azot miktarının uterus pH'sını düşürdüğü ve endometriyal iyon değişiminin ve dolayısı ile embriyo yaşama gücünün bundan etkilendiği bildirilmektedir (Robinson 1996).

**1.3. Uterus pH' sı Beslenme ve Reprodüksiyon İlişkisi**

Sığırlarda süt üretimini artırmak amacıyla rasyona aşırı protein yüklemesi yapılabilmektedir. Aşırı protein yüklemesi fertilite düşüklüğü ile sonuçlanır. Proteinin zararlı etkisi RDP ile ilişkilendirilmiş ve yine yüksek proteinin luteal evrede uterusun iyonik kompozisyonunu değiştirdiği bildirilmektedir. Östrusta uterus pH'sı semen pH'sı ile aynı düzeyde 6,8 olarak ölçülmüştür. Yine erken luteal evrede ise biraz daha yüksek (7,1) iken, luteal evrede uterus lumenindeki Mg, K ve P iyonları artışına bağlı olarak yükselmektedir. Nitekim yüksek düzeyde proteinle

beslenen hayvanlarda pH'nın da belirgin olarak azaldığı belirtilmektedir (Elrod ve Butler 1993).

### 1.4. Koyunlarda Reprodüktif Anatomi, Fizyoloji ve Seksüel Sikluslar

Başlangıçta tüm dişi ve erkek reprodüktif primordiyal hücreleri aynı formasyondadır ve gelişimin bu aşamasında primordiyal, diferensiye olmamış gonadlar ve mezonefrik ve paramezonefrik kanallar adını alan iki kanal yapısından oluşmaktadır. Bu kanallardan mezonefrik kanal (Wolffian kanalı) dişilerde dejenere olup erkek genital kanalını oluştururken, paramezonefrik kanalın (Müllerian kanalı) ise dişi genital kanallarına dönüştüğü bildirilmektedir (Contatinescu 2007).

Dişi genital organları, ovaryumlar, oviduktlar, uterus, cerviks uteri, vagina ve eksternal genital organlardan oluşmaktadır. İnternal genital organlar geniş bir ligamentle desteklenmektedir. Bu ligament ovaryumu destekleyen mezovaryum, oviduktu destekleyen mezosalpinks ve uterusu destekleyen mezometriyumdan oluşmaktadır. Sığır ve koyunlarda bu geniş ligament, ilium'un dorsolateraline bağlanmakta bu sayede uterus bir koç boynuzunu andırmaktadır. Ovaryum, ovidukt ve uterus primer olarak otonom sinirlerle innerve edilmektedir. Pubik sinirler sensorik lifleri beslemekte ve parasempatik liflerin de vagina, vulva ve klitorisi beslediği bildirilmektedir (Dursun 1998). Ovaryum testisten farklı olarak abdominal kavite içerisindedir ve hem ekzokrin (oosit atılımı) hem de endokrin (steroidogenezis) fonksiyonları yerine getirmektedir. Ovaryum'un predominant dokusu kortekstir. Preovulatör periyotta ovaryum kaynaklı kan akımının dağılımı önemli değişimler göstermektedir. Koyunlarda ovaryumun venöz kan akımı ovulasyondan 73 gün önce 8 ml/dakika'dan östrus esnasında 2 ml/dakika'ya kadar düşmektedir. Ovaryum kaynaklı arterial kan akımındaki azalma ile birlikte lenf akımı da azalmaktadır. Ovaryumlara doğru arterial kan akımı luteal aktivite ile doğru orantılıdır. Hemodinamik değişimler Corpus luteum (Cl)'un yaşam ömrünün ve fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli göreve sahiptir. Luteolizis esnasında ovaryum kaynaklı kan akımında azalma olurken ovaryum içerisindeki arterio-venöz şantlarda da azalma olmaktadır. Cl'de, ovulasyon esnasında follikülün kollapsı ile meydana gelmektedir. İç tabaka makroskobik ve mikroskobik kıvrımlarla sentral kaviteye doğru göç etmektedir. Bu kıvrımlar stromal dokudan oluşan sentral bir boşluk ve genişlemiş kan damarlarından oluşmaktadır. Hücreler ovulasyondan bir

kaç gün önce oluşmakta ve ovulasyondan sonra tüm teka hücreleri gelişmiş derecede dejenerasyona maruz kalmaktadır. Luteal hücrelerden granül halinde $P_4$ sentezlenmekte ve bu süreç koyunlarda siklusun 10. gününde başlayıp 12. gününde tamamlanmaktadır. Sekretorik aktivite ise 14. gün civarında dereceli olarak azalmaktadır. Yaşlı hayvanlarda foliküler hücrelerin hormonal uyarımlara duyarlılığının azalması nedeniyle Cl'nin fonksiyonu azalmaktadır. Eğer fertilizasyon olmazsa Cl regresyona uğramakta ve diğer büyük folliküllerin olgunlaşmasına izin vermektedir. Bu luteal hücrelerin dejenere olması ile tüm ovaryum boyut olarak küçülmekte, Cl beyaz veya soluk kahverengi renge dönmekte ve Corpus albicans (CA) olarak adlandırılmaktadır. Östrojen tarafından indüklenmiş luteolizis, uterustan salgılanan $PGF_{2\alpha}$ tarafından uyarılmakta ve Cl'nin normal regresyonundan sorumlu tutulmaktadır. Koyunlarda aşımdan sonra Cl'nin sürdürülebilmesi için aşımdan sonraki 12-13. günlerde uterusta embriyo bulunması gerekmektedir. Gebeliğin maternal tanınması 12-13. günlerde gerçekleşmektedir. Gebelik oluştuktan sonra Cl, Corpus luteum verum (Clv) olarak adlandırılmakta ve Corpus luteum spurium (Cls)'a göre daha büyük olduğu bildirilmektedir (Gürler ve Fındık 2002, Schatten ve Constantinescu 2007a).

Ovaryum ve ovidukt arasında derin bir anatomik ilişki bulunmaktadır. Çiftlik hayvanlarında ovaryum açık bir bursa içerisinde bulunmakta ve kolaylıkla görülebilmektedir. Oviduktlar ise, mezosalpinkse asılmış ve dört fonksiyonel segmente ayrılmıştır. Bunlardan ilki parmak şeklindeki uzantılarıyla fimbria adını almakta ve fimbria ovaryum yakınında abdominal bir açıklık içermektedir. Daha distalde ampulla ve bunu izleyerek dilate olan ampulla ve uterus lumenine bağlanan ishtmus'tan oluşmaktadır. İnfundibulum'un çapı türe ve yaşa göre değişmekle birlikte yüzey alanı koyunlarda 6-10 $cm^2$'dir. İnfundibulum'un açıklığı, ostium abdominale olarak adlandırılmaktadır. Ovidukt mukozası primer, sekonder ve tersiyer katlardan oluşmaktadır. Ampulla mukozası ise kalındır, katlara ayrılmıştır ve ishtmus'a doğru incelmektedir. Mukoza tek katlı kolumnar epitelden oluşmakta altındaki submukoza ise ince kas lifleri ve lenf ve kan damarlarıyla çevrili bağ dokudan oluşmaktadır. Epitel siliar ve siliar olmayan hücrelerden meydana gelmektedir. Siliar hücreler ince motil sillerden (kinosilyum) oluşmakta ve aktivitesi hormonlardan etkilenmektedir. Nitekim ovulasyondan hemen sonra siliar aktivitenin

maksimuma ulaştığı beliritilmektedir (Hafez 1993a, Schatten ve Constantinescu 2007a).

Oviduktun temel fonksiyonu spermatozoa ve oositin birbirine ters yönde hareketini sağlamaktadır. Ovidukt sıvısı fertilizasyon ve blastosist bölünmesi için uygun bir ortam oluşturmakta ve bu sıvının akümülasyonu hormonlar tarafından kontrol edilmektedir. Uterus ise iki cornudan, bir corpustan ve bir cerviksten oluşmaktadır. Ergin koyunda folliküler havuzdan her gün 3-4 primer folikül, folikül havuzuna geçmektedir. Luteinize edici hormon (LH) reseptörleri teka hücrelerinde bulunurken, follikül uyarıcı hormon (FSH) reseptörleri folliküler gelişmenin erken safhalarında granuloza hücrelerinde bulunmaktadır. Erken foliküler aşamada follikülogenezis esnasında koyunlarda 1-2 mm'lik antral foliküller gonadotropin bağımsız gelişmektedir (Senger 2003a, Noakes 2003).

Uterusun (protein sentezi ve hücre bölünmesi) büyümesi östrojen tarafından indüklenmektedir. Oositin uterotubal birleşim yerinden geçişi esnasında da endometriyum metabolizmasında hızlı değişimler olmaktadır. Uterustaki dilatasyon veya irritasyon siklik Cl'nin normal fonksiyonunu ve gelişimini inhibe etmektedir. Bu mekanizma özellikle reprodüktif verim azalmalarında önemli bir noktayı oluşturmaktadır. Uterus östrus siklusunun erken dönemlerinde Cl'nin regresyonunu hızlandırmakta ve vaktinden önce östrusa neden olabilmektedir. Uterusun uyarımı lumene küçük bir yabancı dokunun konulmasıyla başlatılabilmektedir. İzleyen östrus yabancı dokunun konuluş zamanına, büyüklüğüne ve doğal yapısına bağlı olarak kısalabilmekte veya uzayabilmektedir. Bununla birlikte intrauterin aygıtlar da (IUDs) bir çok evcil hayvanda fertilite düşüklüğüne sebep olabilmekte ancak bu etki çok farklı varyasyonlar gösterebilmektedir. Nitekim koyunlarda IUDs sperm transportunu ve fertilizasyonunu inhibe edebildiği bildirilmektedir (Senger 2003a).

Cerviks sperm transportu için bir bariyer görevi gören, ince duvarlı, sert, sfinkter benzeri çoğunlukla fibröz bağ dokusundan ve çok az kas katmanından oluşan bir organdır. Cerviksin fonksiyonel karakteristiği ekstrasellüler matriksin durumu, konnektif dokunun tipi ve miktarına bağlı olarak değişmektedir. Cerviks ince duvarlı, sıkıştırılmış lumenle karakterizedir. Ayrıca cerviksin yapısı çiftlik hayvanları arasında farklılık götermektedir. Küçük ruminantlarda transversal veya spiral, birbiri içine kilitlenen, ayrıca annular halka olarak bilinen yapılardan

oluşmaktadır. İneklerde ve koyunlarda bu birbirini kapatan veya kilitleyen dört halkadan meydana gelmektedir. Cerviks östrus dışında sıkıca kapalıdır ve östrusta hafifçe açılmakta spermin uterusa transportuna izin vermektedir. Cerviks stromasının fibröz yapıtaşı ve hücresel elementlerden meydana geldiği bildirilmektedir (Senger 2003a, Schatten ve Constantinescu 2007b).

Vagina, eksternal ostium uteriden üretranın girişine kadar olan kranial reprodüktif kanalı oluşturur. Vaginal duvar yüzey epiteli, kas katmanı ve serozadan meydana gelmektedir. Vaginanın muskular katmanı uterus kadar iyi gelişmemiştir ve ince sirküler tabaka ile kalın longitudinal bir katman içermektedir. Yüzey epiteli bezsiz, strafiye olmuş, skuamoz epitel hücrelerden oluşmaktadır. Östrus esnasında türler arasında birtakım farklılıklar bulunmakta ve bu değişikliklerin büyük olasılıkla östrojen ve $P_4$ sekresyonundaki ve nihai olarak gonadotropinlerin sekresyonuyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Vaginal hücrelerin yüzeyi çok sayıda longitidunal veya dairesel uzanan mikro kabartılardan oluşmaktadır. Vagina fonksiyonel olarak kopulasyonu sağlamak, spermin cerviksten geçene kadar depolanmasını sağlamak, servikal mukus ve endometriyal sekresyonların dışarı akmasını sağlamak gibi görevleri vardır. Eksternal genital organlar, vestibulum, labia majör, labia minör, klitoris ve vestibular glandlardan meydana gelmektedir (Alaçam 1999, Gürler ve Fındık 2002).

### 1.5. Pubertas

Pubertas, ilk seksüel aktivitenin gerçekleştiği zamandır ve reprodüktif yaşam üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır. Pubertas dişi hayvanlar için, ovulasyon yeteneği ve östrus gösterme kabiliyeti kazanmasıdır. Pubertasın başlangıcı hayvanların belirli bir yaşa veya olgunluğa ulaşmasıyla ilişkili olmakla birlikte çevre şartlarına ve genetik kapasite veya biyolojik saate de bağlıdır. Hayvanlar pubertasa ulaştıklarında genital organlar da boyut olarak büyümektedir. Pubertas öncesinde genital organların büyümesi diğer organlara paralel gerçekleşmektedir. Ancak pubertasla birlikte genital organlar oldukça hızlı bir ivmeyle büyümeye başlamaktadır. Bir çok hayvanda pubertasa ulaşma mevsime bağlı olarak gelişmese de koyunlarda pubertasın sezonla bağlantılı olduğu bilinmektedir. Pubertasın başlamasından en çok sorumlu tutulan hormon LH'dır. Erişkin koyunlarda normal çifltleşme sezonunda bazal LH konsantrasyonu, LH dalga salınım frekansı ile birlikte

her saatte bir artmakta ve maksimum folliküler gelişime neden olmaktadır. Bu folliküler gelişim artışı aynı zamanda östradiol üretim kapasitelerini de artırmakta, östradiol LH salınımını uyarmakta ve ovulasyonla birlikte Cl formasyonu gözlenmektedir. Prepubertal kuzularda LH dalgaları aynı genişlikte olmakla birlikte daha düşük frekanslarda (2-3 saatte bir) salınım gerçekleşmektedir. Sonuç olarak bu salınım, folliküler gelişim, folliküler maturasyon veya ovulasyon için gerekli LH dalgasını aktive etmek için yetersiz kalmaktadır. Prepubertal koyunların ovulasyona gidememelerinin nedeni östradiolün yüksek pozitif feedback etkisinden ve dolayısıyla LH dalgasını uyaramamasından kaynaklanmaktadır. Diğer faktörler LH salınım frekansının aynı zamanda hipotalamusta sinirsel kontrol altındaki GnRH salınım merkezindeki salgı üretim kapasitesine ve dolayısıyla hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormon miktarına (GnRH) bağımlı olmasıdır. Beyin morfolojisindeki ve sinirsel hücresel yapıda yaşa bağımlı değişimler GnRH salınım etkinliğini etkileyen temel faktörlerdendir. Ek olarak yaşa bağlı olarak opioid peptidlerin LH sekresyonu üzerine inhibitör etkisi de azalmakta ve bunun da hipofizin pubertasla birlikte östradiolün feedback duyarlılığını açıkladığı bildirilmektedir (Souza 1997, Senger 2003b, Gimenez ve Rodning 2007).

İlk östrusun gizli ya da sakin gerçekleşmesinin nedeni olarak, hayvanların östrusun davranışsal belirtilerini göstermeden önce sentral nervöz sistemin $P_4$ tarafından tetiklenmesi gerektiğine bağlı olduğu bildirilmektedir. Birçok evcil hayvanda pubertas yaşı canlı ağırlık ile yakından ilişkilidir. Bundan dolayı besleme, pubertası belirleyen önemli faktörlerdendir. İyi beslenen ve hızlı büyüyen hayvanlar kötü beslenen ve yavaş büyüyen hayvanlara göre daha erken pubertasa ulaşmaktadır. Ancak ne kadar kötü beslenirse beslensin mutlaka belirli bir yaşa ulaştığında tüm hayvanlar pubertasa ulaşmaktadır. Bütün evcil hayvanlar belirli bir periyotta seksüel olarak aktif oldukları bir kabul dönemi ya da östrus dönemi yaşamaktadır. Koyunlar ırka bağlı bazı farklılıklar olmakla birlikte mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır. Ancak gün ışığına bağlı değişimlerin az olduğu bölgelerde yıl boyu östrus gösterirler. Koyunların mevsimsel östrus göstermelerinin adaptasyon mekanizmalarıyla açıklanan asıl nedeni, doğumların yeni doğan kuzuların besin ihtiyaçlarını karşılayabilmelerini ve uygun hava koşullarında yetişmelerini sağlamak amacıyla optimal mevsim koşullarında, genellikle de baharda meydana gelmesini

garantilemektir. Bununla birlikte ırk bazında da bazı ırkların yıl boyu östrus gösterebildikleri de bildirilmektedir (Senger 2003b, Rawlings ve ark 2003).

### 1.6. Fizyolojik Endokrin Düzen ve Hormonlar

Sağlıklı reprodüksiyon, beyin, hipofiz ve gonadlardan düzenleyici sinyallerin başarılı bir şekilde alınması ve bu organlar arasındaki sağlıklı ilişkiye bağlıdır. FSH ve LH gibi hipofizer gonadotropinlerin salınımı ovulasyon ve spermatogenezis için kritik öneme sahiptir ve birbirlerini hipofiz üzerinden beyine feedback etkisi ile kontrol ederler. Spesifik olarak gonadal steroidler negatif feedback ile LH ve FSH' nın tonik salınımlarını kontrol etmekte ve steroidogenezis ve gametogenezisi düzenlemektedir. Koyunlar, yıllık reprodüktif sikluslarında sezona bağlı olarak çiftleşen memelilerdir. Bu da kısa gün fotoperiyodunda, GnRH nöronları ile ve LH sekresyonlarının uyarımı ile gerçekleşmektedir. Morfolojik olarak GnRH nöronlarında sezona bağlı bir değişiklik olmazken çevresel sinirlerin GnRH regülasyonu üzerine etkisi kritik öneme sahiptir. Gerçekten de sinaptik girişteki GnRH nöronlarının koyunlarda sezonal regülasyona maruz kaldığı bildirilmektedir (Smith 2008).

Östrus siklusu, hipotalamusta üretilen GnRH tarafından düzenlenen ve hipofiz tarafından üretilen FSH, LH ve oksitosin; ovaryan antral follikül tarafından salgılanan östrojen ve inhibin; Cl tarafından salgılanan $P_4$ ve oksitosin; ve endometriyum tarafından salgılanan $PGF_{2\alpha}$ arasındaki olayların sıralanmış bir ilişkisi ile yönetilmektedir. Ovaryan follikül gelişimi ve maturasyon, steroidogenezis, ovulasyon ve Cl formasyonu primer olarak hipofizer gonadotropinler tarafından kontrol edilmektedir. Sekresyonun regülasyonu ve gonadotropinlerin biyoyararlanımı birçok eksternal ve internal faktörün kompleks interaksiyonu sonucu gerçekleşmektedir. İnternal faktörler, lokal olarak üretilen aa'lar ve peptid/protein hormonlar, ovaryan steroidler ve diğer inhibin, aktivin ve follistatin gibi folliküler hormonlar, nörotransmitter ve nöromodulatörler ve uterus tarafından üretilen diğer ürünlerden oluşmaktadır. Eksternal faktörlerin ise fotoperiyodik sinyaller, erkek feromonları, besleme ve stres olduğu ve hipotalamo-hipofizer-ovaryan eksende etki gösterdiği bildirilmektedir. Düzenleme direkt olarak GnRH etkisi ile veya indirekt olarak hipofizin GnRH'ye yanıtının değiştirilmesi ile veya gonadotropinlerin

ovaryan duyarlılığı, LH/FSH heterojenitesi, lokal kan akımı veya lenfatik ve kan dolaşımında hormonların değişimi ile mümkün olmaktadır (Bartlewski ve ark 2011).

### 1.6.1. Gonadotropik Hormonlar

GnRH'nin preovulatorik salınımı ve izleyen FSH ve LH salınımı ovulasyondan 14 saat önce pik yapmaktadır. Bu gonadotropin dalgası östrus siklusunun sonunda azalan $P_4$ ve artan Östradiol ($E_2$) ile uyarılmaktadır. GnRH tarafından uyarılan ritmik LH salınımları tüm reprodüktif konumu değiştirmektedir. LH salınım dalga ve frekansındaki artış preovulatör LH dalgasının da habercisidir. $P_4$ ve $E_2$ uyum içerisinde $_{LH}$ dalgasını ve pulsatil salınımını değiştirmektedir. Metöstrus ve erken diöstrus bazal serum LH konsantrasyonunun ve LH salınım frekansının dereceli olarak azaldığı dönemdir. LH dalga genişliği büyük ovaryan follikülün gelişme evresinin sonunda erken luteal evrede artmakta ve LH dalga genişliği ve frekansı da artmaktadır. Ortalama ve bazal serum FSH konsantrasyonu folliküler dalga başlangıcı ile birlikte artmaktadır. Büyük antral follikülün gelişme evresi olan erken diöstrusta ilginçtir ki FSH salınım frekansı da artmaktadır. Ancak Cl formasyonu, bazal ve ortalama FSH konsantrasyonu azalışı ile ilişkilidir. Siklus sonunda LH salınım frekansı azalan $P_4$ konsantrasyonu ile artmakta ve ortalama ve bazal FSH konsantrasyonu ise folliküler dalganın çıktığı gün, son folliküler dalganın interovulatör periyodundan iki gün sonra bazal seviyelere ulaşmadan önce pik konsantrasyona ulaşmaktadır. FSH'nın salınım frekansı iki ardışık dalgadan meydana gelmektedir. Bu dalgalardan birincisi preovulatör LH dalgası ile aynı zamana denk gelmekte ve ikincisi ise bundan 20-36 saat sonra gerçekleşmektedir. İkincil FSH salınımının dalga boyu düşük ancak prevoulatör FSH salınımına (11-12 saat) göre daha uzun sürelidir (20-24 saat). Preovulatör FSH salınımı önceki salınımlarına göre göreceli olarak düşük FSH salınımlarını izlemekte ve bu sırada serum LH, $E_2$ ve inhibin konsantrasyonları da artmaktadır. Bu bize preovulatör FSH dalgasının GnRH'nın inhibitör etkisinden kurtulduğunu göstermektedir. İkinci FSH yükselmesi ise ovulasyondan sonra gerçekleşmekte ve etkili bir şekilde folliküler FSH inhibitörleri tarafından sonlandırılmaktadır (Karsch ve ark 1997, Bartlewski ve ark 2011).

**Follikül stimulan hormon (FSH)**

FSH ovaryum kaynaklı folliküllerin gelişimini ve maturasyonunu uyarmaktadır. FSH tek başına ovaryumdan östrojen sekresyonuna neden olamamakta ancak LH varlığında hem testislerden hem de ovaryumlardan östrojen üretimini uyarmaktadır. Erkeklerde FSH testislerin seminifer tubullerinin germinal hücrelerine etki etmekte aynı zamanda sekonder spermatositlere kadar spermatogenezisi uyarmaktadır. Kadınlarda menapoz sonrası steroid sentezinin çok düşmesine bağlı olarak FSH atılımı da oldukça artmaktadır. Bu artan FSH böbreklerden direkt geçerek idrar yoluyla atılmakta "*human menapausal gonadotropin*" (hMG) olarak adlandırılmaktadır. hMG'nin biyolojik aktivitesi FSH yönünden daha yüksektir ve FSH gibi folliküler gelişimin uyarılması, multiple ovulasyon ve embriyo transferi amacıyla koyunlarda kullanılabilmektedir (Campbell ve ark 1999).

FSH piklerinin sayısı ve periyodikliği ile ilgili iki farklı mekanizmanın sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bunlardan birincisi, GnRH'nın, LH ve FSH'nın anterior hipofizden salınım ve sentezlerini uyardığı ve GnRH salınımı düşük olduğunda FSH sekresyonunun LH'ya göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bundan dolayı luteal $P_4$ etkisi altında FSH duyarlılığının GnRH salınımını artırdığı ve maksimal FSH sekresyonuna neden olduğu düşünülmektedir. İkinci olarak dolaşımdaki P4 konsantrasyonunun dolaşımdaki FSH'nın temizlenme oranını indüklediği bildirilmektedir. Hipofizden salgılanan FSH'nın birçok izoformu bulunmakla birlikte asidik izoformları daha çok $P_4$ yokluğunda ve kısa ömürlü üretilmektedir. Bundan dolayı $P_4$ erken dönemde FSH piklerini indüklemektedir. Yüksek $P_4$ konsantrasyonu (her siklusta dört folliküler dalga gösteren koyunlarda görülür) FSH oranını daha asidik olan izoformlarının lehine değiştirir ve böylece FSH metabolik yıkılımı azalır. Bu folliküler seçim için eşik değerini korumasına izin verir. Alternatif olarak düşük $P_4$ konsantrasyonu (üç folliküler dalga gösteren koyunlarda kaydedilmiştir) FSH'nın daha az asidik formlarının oranını yükseltmekte ve bu da FSH'nın hızla metabolik yıkımına sebep olmaktadır. Sonuç olarak pik FSH konsantrasyonuna ulaşmada daha düşük frekansta tekrarlanmaktadır (Souza ve ark 1996, Bartlewski ve ark 2011).

**Luteinleştirici hormon (LH)**

Glikoprotein yapısındaki, $\alpha$ ve $\beta$ alt ünitelerinden oluşan, moleküler ağırlığı 30.000 dalton ve yarılanma ömrü 30 dakika olan bir hormondur. Tonik veya bazal seviyeleri FSH ile bağlantılı olarak büyük ovaryum kaynaklı folliküllerden östrojen sekresyonunu uyarmaktadır. Preovulatör LH dalgası ile follikül duvarı ruptura uğramakta ve ovulasyon gerçekleşmektedir. Ovaryum ve testislerin intersitisyel hücreleri LH tarafından uyarılmaktadır. Erkeklerde LH stimülasyonu sonrası interstisyel hücrelerden (Leydig hücreleri) androjen salgılanmaktadır. Tonik LH ve FSH salınımı her iki cinsiyette de olmakta ve tonik LH salınımları negatif feedback ile gonadlardan kontrol edilmektedir. Tonik LH salınımları durağan olmamakla birlikte her saatte bir dalgalanma göstermektedir. Serum LH seviyeleri kısırlaştırılmış dişi ve erkeklerde azalmaktadır. LH ve FSH dalgaları aynı zamanda ovulasyondan hemen önce metafaz II'ye kadar oosit maturasyonunu indüklemektedir. Ovulasyon genel olarak maksimal gonadotropin konsantrasyonu dalgası başlangıcından 24-30 saat sonra gerçekleşmektedir. Ovulasyon anında ise $E_2$, $P_4$ ve LH seviyeleri düşüktür. İkinci önemli LH ve FSH salınım şekli ise preovulatör LH ve FSH dalgası olarak adlandırılmakta ve dişi hayvanlarda ovulasyondan önce şekillenmektedir. Preovulatör LH ve FSH dalgası yaklaşık olarak 6-12 saat sürmektedir. Preovulatör LH dalgası hipotalamus üzerine pozitif etki ile LH salgılatıcı (LH-RH) hormonu indüleyerek ve dolaşımdaki östrojen artışı ile başlamakta ve oluşmaktadır. Nitekim $E_2$-17β uygulanan anöstrustaki koyunlarda 15-16 saat içerisinde LH ve FSH dalgaları oluşumunu uyarılabilmektedir. Östrojenin etkisi anterior hipofiz üzerinedir (Campbell ve ark 1999, Nagatani ve ark 2000, Bartlewski ve ark 2011).

**Prolaktin**

Prolaktin luteotropik özelliklerinden (rodentlerde Corpus luteumun devamlılığını sağlar) dolayı gonadotropik hormon olarak da adlandırılmaktadır. Evcil hayvanlarda temel luteotropik hormon LH olmakla birlikte prolaktinin de az da olsa luteotropik etkinliği bulunmaktadır. Prolaktinin ayrıca sentral nervöz sistemde maternal davranışları indüklediği bildirilmektedir (Bertram ve ark 2010). Yine Goff ve ark (2013), koyunlarda dolaşımdaki prolaktin düzeyinin sezondan etkilendiğini ancak doğal fotoperiyot altında prolaktinin östrus davranışlarındaki sezonal

varyasyonun gösterilemediği ve prolaktinin mutlaka genetik kontrol altında olduğunu ancak kesin olarak sezona bağlı reprodüktif olaylarda rolü olup olmadığının bilinemediğini bildirmişlerdir.

**Büyüme hormonu**

Büyüme hormonu somatik hücreler üzerindeki düzenleyici rolünden dolayı somatotropik hormon (STH) olarak da bilinmektedir. Özellikle büyüme döneminde olmak üzere tüm yaşam boyunca gerekli olan bir hormondur. Vücuttaki tüm hücrelerde protein sentezi oranını artırmakta, yağ asitlerinin mobilizasyonunu ve bu yağ asitlerinin enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağlamakta ve vücudun glikoz alımını azaltmaktadır. Büyüme hormonunun salgılandığı özel bir hedef doku bulunmamakla birlikte vücutta bir çok dokuyu etkilemektedir. Büyüme hormonunun sekresyonu büyük oranda hipotalamus tarafından kontrol edilmektedir. Büyüme hormonu ile reprodüktif organların gelişimi arasında güçlü bir bağlantı olduğunu bildiren bir çok çalışma bulunduğu, özellikle erkeklik hormonlarının salgılanmasında önemli rolü olduğu, genç erkek hayvanlarda östrojenin büyüme hormonu salınımını artırdığı bildirilmiştir. Kısıtlanmış beslemenin de bireysel stresle ilişkili olarak konsepsiyon oranlarını düşürdüğü ve bu mekanizmanın azalan seks steroid reseptörleri ve değişen steroid hormon seviyeleri ile ilişkili olduğu ve aynı zamanda büyüme hormonu seviyeleri üzerine de olumsuz etkisinin olduğu bildirilmektedir (Sejian ve ark 2011, Wankowska 2012).

**Oksitosin**

Oksitosin ve vazopressin hipotalamusta sentezlenmekte ancak nöro-hipofizde depo edilmektedir. Bu hormonlar nöro-hipofizinler denen taşıyıcı proteinler ile hedef dokulara taşınmaktadır. Oksitosin ayrıca Cl'de de sentezlenmektedir. Oksitosinin bir çok fonksiyonu bulunmakla birlikte uterus kaslarında kontraksiyon, oviduktun kontraksiyon frekanslarını artırarak dişi ve erkek gametin oviduktta transportunu sağlamak ve sütün indirilmesini sağlamak gibi görevleri bulunmaktadır. Östrojen düz kasların oksitosine yanıtını değiştirmektedir. Dişilerin emzirilmeleri veya sağılmaları görsel ve dokunsal uyarılarla oksitosinin dolaşıma salınımını uyarmakta ve miyoepitel kaslarda uyarıma neden olmaktadır. Luteal oksitosin endometriyumda $P_4$ salınımını uyararak, luteolitik etkiyi indüklemektedir (Bertram ve ark 2010).

### 1.6.2. Plasental Hormonlar

Plasenta memeli reprodüksiyonunda önemli yeri olan, gebe kısrak serum gonadotropini (eCG veya PMSG), plasental laktojen (PL) ve protein B gibi bir takım hormonlar sentezlemektedir (Hafez 1993b).

**Gebe kısrak serum gonadotropini (eCG)**

Gebe kısrak serum gonadotropini (eCG), LH ve FSH'ya benzer şekilde $\alpha$ ve $\beta$ alt ünitelerine sahip, ancak özellikle sialik asitten oluşan yüksek karbonhidrat içeriği olan bir hormondur. Bu yüksek sialik asit içeriği eCG'nin uzun yarılanma ömrüne sahip olmasını sağlamaktadır. Böylece hedef organlarda bir haftadan uzun süre etkinlik gösterebilmektedir. Bu plasental gonadotropin, kısrak uterusunda, gebeliğin 40. gününden sonra oluşan endometriyal kaplardan üretilmekte yaklaşık 85. güne kadar salgılanmaya devam etmektedir. eCG, FSH etkisiyle ovaryum kaynaklı folliküllerin gelişimini, LH etkisiyle ovulasyonu uyarmakta ve böylece kısraklarda oluşan bu aksesör Cl'ler gebeliğin devamını sağlamaktadır. eCG hem FSH hem de LH etkisi taşımasına karşın FSH etkisi dominanttır. Bu nedenle ruminantlarda süperovulasyon uygulamalarında sıkça kullanılmaktadır (Murphy 2012).

**İnsan koryonik gonadotropini (hCG)**

Glikoprotein yapısında bir hormon olan insan koryonik gonadotropini (hCG) de $\alpha$ ve $\beta$ alt üniteleri barındırmaktadır. hCG'nin $\alpha$ alt ünitesi, insanlardaki, domuzlardaki, koyunlardaki ve sığırlardaki LH hormonu alt ünitesi ile benzerdir. Bu hormon primat plasentasının sinsityotrofoblastik hücrelerinden sentezlenmekte ve kan ve idrarda aynı anda bulunmaktadır. Konsepsiyondan sekiz gün sonra duyarlı radioimmunoassay (RIA) teknikleri ile idrarda tespit edilebilmektedir. Bu hormonun LH benzeri etkinliği ruminantlarda kistik folliküllerin tedavisinde kullanılmasını sağlamaktadır. Yine aynı zamanda çoklu ovulasyonlarda ovulasyonu uyarmak amacıyla da kullanılabilmektedir (Lapthorn ve ark 1994).

**Plasental laktojen**

Plasental laktojen kimyasal özellikleri prolaktin ve büyüme hormonu ile benzer olan bir proteindir. Plasental laktojen plasental dokulardan sentezlenmekte, ancak gebeliğin son çeyreğine kadar serumda gözlenenememektedir. Büyüme

hormonu benzeri özellikleri prolaktin benzeri etkilerine göre daha kuvvetlidir ve bu sayede fötal gelişmede önemli yer tutmaktadır. Plasental laktojenin süt üretiminde de önemli role sahip olduğu, yüksek süt verimli ineklerde süt üretiminin yüksek olmasıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Noel ve ark 2003).

**Protein B**

Uzun bir yarılanma ömrüne sahip olan protein B, sığır plasentasından izole edilmiş ve gebe sığır serumunda gebeliğin 22. gününden itibaren tespit edilmesine bağlı olarak bir gebelik tanı yöntemi olarak kabul edilmiştir. Bu teknik sonradan koyunlara da uyarlanmıştır. Bu plasental hormone, sığırlarda ilk basit assay gebelik değerlendirme testi olması nedeniyle de önem taşımaktadır (Hafez 1993b).

Koyun plasentasında ayrıca gebeliğin farklı periodlarında salgılanan identifiye edilmiş ve 11 adet farklı cDNA tarafından kodlanmış gebelik ilişkili glikoproteinler (ovPAG-1'den ovPAG-11'e kadar) bulunmaktadır. Barbato ve ark (2009)'un yaptıkları bir çalışmada PAG konsantrasyonun çoklu doğumlarda daha yüksek olduğu, nitekim gebeliğin 18. gününde tekli gebeliklerde 1,6 ng/ml ve çoklu gebeliklerde 4,4 ng/ml olarak ölçüldüğünü bildirmektedir. Yine aynı çalışmada gebeliğin 18. gününde kandan yapılan RIA ile PAG analizinin duyarlılığının % 95 gibi oldukça yüksek seviyelerde seyrettiği ve 24. günden sonra % 100 kesinlik ve duyarlılıkta olması dolayısı ile rutin olarak kullanıma uygun olduğu bildirilmektedir. $P_4$ analizleri ile karşılaştırıldığında ise $P_4$'ün Cl tarafından salgılanmasına bağlı olarak hydrometra, pyometra ve erken embriyonik ölüm gibi patolojik durumlarda ve özellikle erken gebelikte östrusun luteal evresi gibi fizyolojik durumlarda da yanlış pozitifliğe yöneltebileceği, bu nedenle PAG analizlerinin daha kesin sonuçlar verebileceği bildirilmiştir (Barbato ve ark 2009).

### 1.6.3. Gonadal Steroid Hormonlar

Steroid hormonlar, ovaryum, testis, plasenta ve adrenal korteksten salgılanmakta ve siklopentanoperhidrofenantren halkası denen temel bir halka içermektedir. "*International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*" karbon sayılarına göre steroidleri sınıflandırmış ve 18 karbonlu steroidlerin östrojen aktivitesinde olduğunu, 19 karbonlu steroidlerin ise $P_4$ özelliği taşıdığını, ayrıca 27 karbonlu bir steroid olan kolesterolün ise aradaki zincir kırıldığında 20 karbonlu

pregnolona dönüştüğünü, pregnolonun da $P_4$ ve/veya östrojen ve androjenlere dönüştüğünü bildirmişlerdir (Nett ve ark 2002, Schams ve Berisha 2002).

Anterior hipofizin, follikülogenezis, folliküler maturasyon, ovulasyon ve Cl formasyonu gibi ovaryum kaynaklı fonksiyonlar üzerine etkisi bulunmakta aynı zamanda ovaryumun da anterior hipofiz ve hipotalamus üzerine etkisi bulunmaktadır. Bu etki, olgun folliküller tarafından salgılanan $E_2$ ve Cl tarafından salgılanan $P_4$ sayesinde düzenlenmektedir. Hipotalamusun episodik/tonik salınım merkezi $E_2$ ve $P_4$'ün negatif feedback etkisinden etkilenmektedir. İnek, koyun ve domuzlarda FSH sekresyonu bazı ovaryum kaynaklı peptid hormonlar tarafından da kontrol edilmektedir. Bu hormonlardan ilk karakterize edileni inhibin büyük antral folliküllerin granuloza hücreleri tarafından üretilmekte ve folliküler sıvıdan izole edilebilmektedir. Bu hormon ayrıca testis ve seminal plazmadan da izole edilebilmektedir. İnhibin ve $E_2$ birlikte hareket ederek FSH sekresyonunu baskılamaktadır. Antral folliküllerden salgılanan inhibin uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir ve tüm negatif feedback olaylarını düzenlemekte ve bu antral folliküllerden salgılanan $E_2$ ovulasyon için bir potansiyel oluşturmaktadır. Ovaryum kaynaklı folliküler sıvıdan izole edilen diğer peptid hormonlar aktivin ve folistatindir ve bu hormonlar FSH sekresyonu üzerine baskılayıcı etki yapmaktadır (Hafez 1993b, Schams ve Berisha 2002).

**Östrojenler**

Östrus siklusu esnasında koyunlarda $E_2$ konsantrasyonu 3-4 majör artış sergilemektedir. İlk artış luteolizisten sonraki gün olmakta ve bu artış LH salınım frekansına eşlik etmektedir. Devam eden artışlar folliküler evre esnasında preovulatör folliküller üzerine LH reseptör yoğunluğunun artmasını işaret etmektedir. Preovulatör LH dalgası sırasında (16-24 saat süresince) folliküler sıvıda $E_2$ konsantrasyonu minimal değerlere düşerken $P_4$ konsantrasyonu artmaktadır. Serum LH konsantrasyonu ~5 ng/ml'yi geçtiğinde ise büyük ovaryan folliküller artık LH etkisiyle üretilen $E_2$'ye yanıt veremez hale gelmiştir. İzleyen artışlar luteal evre sırasında 3-4 gün arayla gerçekleşmektedir. Diöstrusta non-prolifik koyun ırklarında $E_2$ dalgalanmalarının genişliği çıkan non-ovulatör dalgalanmalarla ilişkilidir ve preovulatör östradiol artışlarından farklı değildir. Prolifik koyunlarda ise preovulatör

dönemdeki $E_2$'nin pik değerleri östrus siklusunun luteal evresine göre belirgin olarak daha yüksektir (Hafez 1993b).

**Progestagenler**

Progesteron Cl'deki luteal hücreler tarafından, plasentadan ve adrenal korteksten sentezlenmekte ve diğer androjenler gibi kanda globulin ile birlikte taşınmaktadır. Progesteron sentezi primer olarak LH tarafından stimüle edilmektedir. Progesteron endometriyumu implantasyon için hazırlamakta, endometriyumdaki sekretorik aktiviteyi uyararak ve myometriyumun motilitesini inhibe ederek gebeliğin devamını sağlamaktadır. Östrojen ile sinerjik çalışarak östrusun davranışsal belirtilerinin oluşmasını sağlamaktadır. Yine meme bezlerinin sekretorik dokularının (alveoller) oluşmasını sağlamaktadır. Progesteronun yüksek seviyeleri östrusu ve ovulatör LH dalgasını inhibe etmektedir. Progesteron etkisi altında uterus düşük frekanslı ve yüksek dalga boylu kontraksiyonlara maruz kalmaktadır. Progesteronlar gebelikte yetersiz endojen sekresyona bağlı olarak gelişen abortları engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca kadınlarda en çok LH dalgasını ve ovulasyonu engelleyerek gebeliğin kontrolünde kullanılmaktadır. Yine sentetik progesteronlar ruminantlarda östrusları senkronize etmek amacıyla kullanılabilmektedir. Melengestrol asetat (MGA) ruminantlarda ağırlık artışı sağlamak amacıyla da kullanılmaktadır (Hafez 1993b, Ataman ve ark 2006).

Baby ve Bartlewski (2011)'nin yaptığı çalışmada siklik Rideau Arcott x Poll Dorset melezi koyunlarında luteal faz ortasında metöstrustaki $P_4$ konsantrasyonunun ilk post ovulatör FSH piki zamanını kısaltmakta ve yeni bir folliküler dalga oluşmasına neden olmaktadır. Ek olarak siklik Western White Face koyunlarının dört folliküler dalga sergiledikleri ve üç dalga gösterenlere göre daha yüksek $P_4$ ve düşük FSH konsantrasyonuna sahip oldukları bildirilmektedir. Bu nedenle $P_4$ serum periyodik FSH konsantrasyonu artışı ve folliküler dalga artışı için anahtar endokrin sinyal olarak çalıştığı tahmin edilmektedir (Bartlewski ve ark 1999).

**Relaksin**

Polipeptit yapısında olan relaksin $\alpha$ ve $\beta$ alt üniteleri bulunan bir hormondur. Gebelik esnasında primer olarak Cl tarafından salgılanmaktadır. Ek olarak bazı türlerde plasenta ve uterusta bir miktar relaksin salgılayabilmektedir. Relaksinin

temel biyolojik görevi doğumdan önce vagina ve cerviksin dilatasyonunu sağlamaktır. Ayrıca uterus kontraksiyonlarını inhibe etmekte ve $E_2$ ile bağlantılı olarak verildiğinde meme bezlerinin gelişimini de sağlamaktadır (Hafez 1993b).

**İnhibin**

İnhibin hipofiz hücre aktivitesini inhibe eden steroid bir yapıdır. İlk olarak 1932'de testis ekstraktından izole edilmiştir. Heterodimerik glikoprotein yapısındaki inhibin bir $\alpha$ ve bir çok ß alt ünitesinden meydana gelmekte ve aktif formları inhibin A ve B olarak adlandırılmaktadır. Memelilerde folliküler gelişme esnasında granuloza hücreleri tarafından üretilmektedir. Reprodüktif verimi artırmak amacıyla başta koyun, keçi ve inek olmak üzere bir çok türde kullanılmış olan inhibin koyunlarda aktif veya pasif immunizasyon tekniği uygulanarak negatif feedback ile hipofizden FSH salınımını düzenlemektedir. İnhibin tabanlı immunojenlere karşı aktif immunizasyon non-prolifik koyunlarda ovulasyon oranını artırmak amacıyla kullanılabilmektedir. Yine rekombinant inhibin de genç kuzulara verilerek inhibin antikorlarının artmasını sağlamakta ve böylece ileri dönemlerde ovulasyon oranını artırmaktadır. Bundan başka inhibin ile immunize edilen koyunların daha fazla sayı da olgun follikül oluşturduğu, daha yüksek ovulasyon oranlarına ve kuzulama oranlarına sahip olduğu bildirilmektedir (Bingöl ve ark 2012).

İnhibin, özelllikle de inhibin A, büyük oranda preovulatör folliküllerden (ve primatlarda Cl'den) üretilen negatif feedback yoluyla FSH sekresyonunu baskılayan bir glikoproteindir. Follistatin ile birlikte aktivinin oto parakrin etkisine karşıt etki göstererek bir çok süreçte rol oynamaktadır (Knight ve ark 2012).

**Prostaglandinler**

Prostaglandinler (PG) ilk olarak aksesör seks bezleri sıvısından elde edilmiş ve prostat ile ilişkisinden dolayı bu ismi almışlardır. Vücudun hemen hemen bütün dokularından sentezlenebilmektedirler. PG'ler araşidonik asit içermektedir. $PGF_{2\alpha}$ östrus siklusunun doğal luteolitik ajanı olmakla birlikte fertilizasyonun gerçekleşmemesi durumunda luteal fazı sonlandırmakta ve corpus luteumu lize etmektedir. PG'ler salgılandığı dokudan çok daha uzaktaki hedef dokuya kan yoluyla taşınmakta ve etkisini göstermektedirler. PG'ler 6 adet alt gruba çok sayıda alt metabolite ayrılmakta ve çok farklı ve geniş farmakolojik etkiler gösterebilmektedir.

Kan basıncının, lipolizisin, gastrik sekresyonun, kanın pıhtılaşması ve böbrek ve solunum sistemi fonksiyonları ile ilgili diğer fizyolojik süreçleri kontrol etmektedir. Kandaki düzeyleri normalde düşük olmakla birlikte, özellikle doğum zamanı gibi bazı özel durumlarda yükselmektedir. PG'ler kanda hızla parçalanmaktadır ve kısa ömürlüdürler. PG'lerin prekürsörü olan ve esansiyel bir yağ asidi olan araşidonik asit reprodüksiyonla ve özellikle $PGF_{2\alpha}$ ve $PGE_2$ ile oldukça ilgilidir. PG'ler reprodüktif ve gastrointestinal sistemdeki düz kasların kasılmasını, ereksiyonu, ejakülasyonu, sperm transportunu, ovulasyonu, Cl formasyonunu, doğumu ve süt çıkışını sağlayan ve bir çok fizyolojik ve farmakolojik olayı düzenleyen hormon denebilecek kimyasal yapılardır. PG'ler ovulasyonu sağlamaktadır. Örneğin koyunlarda indometazin uygulaması PG sentezini inhibe etmekte ve ovulasyon bloke edilmektedir. Bu hayvanlarda LH salınımı etkilenmemektedir dolayısı ile PG'lerin ($PGF_{2\alpha}$ veya $PGE_2$) sentez ve etki mekanizmasındaki bir farklılıktan dolayı bu durum gelişmektedir. Östrojen artışı miyometriyal gelişime neden olmakta ve böylece $PGF_2\alpha$ sentez ve salınımı artmaktadır. Gebe hayvanlarda embriyonun uterusa gönderdiği bazı sinyal mekanizmaları ile PG salınımı engellenebilmektedir. Ayrıca insanlarda semendeki PGE azlığı infertilite ile ilişkilendirilmektedir. PGE ayrıca uterus kontraksiyonlarını uyarmakta, kan damarlarını dilate etmekte ancak herhangi bir luteolitik etkisi bulunmamaktadır. $PGF_{2\alpha}$ uterus kaslarını kontrakte ederek sperm transportuna yardımcı olmakta, kan damarlarında kontraksiyona neden olmakta ve evcil hayvanlarda luteolitik etki göstermektedir. $PGF_{2\alpha}$'nın vazokonstriksiyon etkisi hipoksiyi indüklemekte ve böylece luteolizise öncülük etmektedir (Weems ve ark 2006).

**Aktivin**

Aktivinlerin, kök hücre yaşamı, primordiyal follikül havuzunun oluşumu, preantral aşamadan orta antral aşamaya kadar follikül gelişimi, tekal androjen üretiminin baskılanması, granuloza hücre proliferasyonunun desteklenmesi, FSHR ekspresyonu, oosit gelişim kabiliyetinin geliştirilmesi, luteolizis kapsamında follikül luteinizasyonunun ve/veya atrezisinin geciktirilmesi gibi bir çok intraovaryan rolleri bulunmaktadır (Knight ve ark 2012).

Aktivin, inhibin gibi TGFß süper ailesinden kemik morfogenetik proteinleri (BMPs), myostatin ve büyüme ve farklılaşma faktörü (GDFs) gibi 40 alt ünitesi

bulunan bir glikoproteindir. Foliküler sıvıdan izole edilmiş olan aktivin normal ve başarılı bir follikül gelişimi için gerekli bir glikoproteindir. Aktivin A ve aktivin B homodimerlerini oluştururken, aktivin ßA ve ßB alt üniteleri de bulunmaktadır. Aktivinin etkisi folistatine (aktivin bağlayıcı protein) ve reseptörlerine bağlanarak inhibin tarafından antagonize edilmektedir. Aktivinin etkisini araştırmak amacıyla genellikle fare modelleri kullanılmıştır. Aktivin B yetersizliği bulunan farelerde erkek fareler normal fertilite gösterirken dişi farelerde hem üreme isteğinde yetersizlik hem de doğan yavrularında perinatal ölümler gözlenmektedir. Aktivin ßA geni etkisizleştirilmiş farelerde fertilitede düşüklük görülürken aktivin B'nin dişi fertilitesi için gerekli olduğu gözlenmiştir (Young ve ark 2012).

### 1.7. Koyunlarda Östrus Siklusu ve Folliküler Dalga

Koyun ve keçi gibi bazı ruminantlar sezonal reprodüktif siklus göstermektedir. Bu türlerin evcilleştirilmesi sezonal özelliklerini modifiye edememiştir. Ergin koyunlarda reprodüktif siklus iki dönemden oluşmaktadır. Bunlardan biri 16-17 gün uzunluğundaki östrus siklusu, diğeri ise ovaryan siklusun yıllık akivitesi içerisinde olan sezona bağlı anöstrus veya ovulatör ovaryan siklusun restorasyonu evresidir. Seksüel sezon Kuzey Yarım Küredeki koyunlarda normal olarak sonbahar, kış aylarında görülmektedir. Östrus siklusunun uzunluğu seksüel sezonun dönemi ile oldukça ilişkilidir. Farklı ırklar arasında ve farklı yaş grupları arasında ise siklus uzunluğu bir günden fazla değişmemektedir. Bazen siklusun aralıksız iki kez tekrarı da gözlenebilmekte ve böyle sikluslarda genellikle davranışsal östrus ve/veya ovulasyon bozuklukları görülme olasılığı da yüksek olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar koyunlarda uzayan östrusların Cl'nin yaşam siklusunun uzaması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Kısa süren östrusların ise sezon başlangıcında ve post partum dönem sonunda gözlenebileceği bildirilmiştir. Böyle sikluslarda oluşan Cl'lerde kısa ömürlü ve/veya yetersiz luteinizasyona sahip olabilmektedir (Bartlewski ve ark 2011, Abecia ve ark 2012).

Diğer bir çok memeli hayvanda olduğu gibi koyunlarda da prenatal dönemdeki follikülogenezis ve erken folliküler gelişim, ovaryan köken hücrelerinin ve somatik hücrelerin mitoz ve mayoza girişi ile başlamaktadır. Mayotik profazın diploten aşamasına giriş ile oosit, tek katlı yassı pre-granulosa hücreleri ve sayıları koyunlarda 40.000 ile 300.000 arasında olan rezerv promordiyal folliküller ile

çevrilmektedir. Kesin olarak açıklanamayan nedenlerle gebelik ortasından doğuma kadar koyun ovaryumlarında primordiyal follikülleri içeren yoğun bir apoptotik hücre ölümü (yaklaşık 20 kat) gerçekleşmektedir ve izleyen post natal hayatta da bu hücre ölümü (yaklaşık 35 kat) devam etmektedir. Primer folliküller oositi çevreleyen tek katlı kübik granuloza hücreleri ile karakterizedir. Follikül sekonder follikül haline geldiğinde ise iki veya üç katlı kübik hücrelere dönüşmektedir. Olgun antral follikül (tersiyer veya graaf follikülü) aşamasında teka hücreleri farklılaşmaya başlamakta genişleyen follikül içerisinde bir kavite oluşarak içi sıvı dolmaktadır. Follikülogenezisin erken dönemlerinde ovaryan follikül gonadotropinlere duyarlı hale gelmeye başlamaktadır. Pubertasa ulaşmayla birlikte graaf follikülleri preovulatör aşamaya geçmekte ve bu sırada mayoz devam ederek oosit metafaz II aşamasına geçmektedir. Follikül çapı yaklaşık 1-2 mm çapa ulaşmakta ve ovaryan ultrasonografi (USG); antral follikül kinetiği, ovulasyon ve Cl formasyonunu takip etmek amacıyla uygun bir araç haline gelmektedir. Yani folliküler gelişimi izlemek kolaylaşmaktadır. Primordiyal follikül aşamasından preovulatör follikül aşamasına geçişin koyunlarda 6 aydan daha uzun sürdüğü tahmin edilmektedir. Primordiyal follikülden erken preantral aşamaya (~0.2 mm çapta) geçiş ise yaklaşık 130 gün kadar sürmektedir. Follikülün izleyen süreçte 0,5 mm çapa ulaşması için ek olarak 24-35 gün daha gerekmekte ve ek 5 gün daha sonra 2,2 mm çapa, yaklaşık olarak dört gün sonra ise preovulatör aşamaya (4 mm çapta) ulaşmaktadır (Bartlewski ve ark 2011).

Koyunlarda folliküler dalga ile her iki ovaryumda da serum FSH konsantrasyonundaki yükselmeyi izleyerek 1-4 adet antral follikülün senkronize olarak dışarıdan gözlenebilir olan ovulatör boyuta geliştiği açıkça izah edilmiştir. Folliküler dalga modeli koyunların pubertasa ulaşmaları ile başlamakta ve yalnızca gebelik esnasında ve erken postpartum dönemde fasıla vermektedir. Her folliküler dalga pre-pubertal kuzularda serum pik FSH konsantrasyonu öncesi başlamakta ve ergin koyunlarda anöstrusa giriş folliküler dalga oluşumunu engellemektedir. Koyunlarda östrus siklusu büyük oranda üç veya dört folliküler dalga içermektedir. Östrus siklusunun süresi (17 gün) farklı ırk ve yaşlarda nispeten aynı olmakla birlikte dört dalgalı folliküler gelişim gösteren koyunlarda her bir interovulatör periyotta folliküler gelişmeye karşın, siklus süreleri ineklerdeki gibi ekstra bir folliküler dalga oluşumuna neden olmamakta ancak ovulasyona giden başarılı folliküler dalga

aralıklarını kısaltabilmektedir. Koyunlarda periyodik FSH sekresyonu ve dalga çıkışı, folliküler üretim tarafından yönlendirilmemekte veya folliküler üretime bağlı olmamakta ve büyük ovaryan folliküllerin, küçük antral folliküllerin gelişimi üzerine sığır ve diğer ruminantlarda görülenin aksine herhangi bir inhibitör etkisi (folliküler dominantlık) bulunmamaktadır. İzleyen iki folliküler dalganın follikülü özellikle prolifik koyunlarda birlikte ovule olabilmekte ve folliküler dalganın ekzojen olarak uyarılması FSH piklerini ve izleyen folliküler gelişmeyi baskılamamakta veya ertelememektedir. Ovaryan antral follikülün gelişimi ve ovulatör çapa ulaşması, seksüel sezonun her aşamasında ve baştan sona sezonal anöstrus esnasında folliküler dalgada farklılıklar göstermektedir. Koyunlarda seksüel sezonda hem prolifik hem de non-prolifik ırklarda her bir interovulatör dönemde üç veya dört folliküler dalga açığa çıkmaktadır. Antral follikül gelişiminin bu özelliği günlük serum FSH konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir. Geçici ve günlük FSH konsantrasyonu artışları folliküler dalga çıkışından hemen önce olmaktadır ve böylece folliküler dalga ile serum $E_2$ konsantrasyonu artışı arasında da bir bağlantı kurulmakta ve başarılı bir folliküler dalgadaki en büyük follikül, pik serum $E_2$ konsantrasyonuna ulaşmaktadır. Koyunlarda folliküler dalga ile FSH sekretorik aktivitesi arasında FSH'nin kontrol ettiği antral follikül gelişiminin başlangıç aşamasını izleyen folliküler gelişim ile ilgili FSH dalgalanmalarından bağımsız bir ilişki bulunmaktadır. Koyunlarda her folliküler dalgada benzer final gelişim aşamasına ulaşmış ya da aynı büyüklükte 1-4 follikül bulunmaktadır ve antral follikül sondan bir önceki dalgada ovule olmaktadır. Aslında tek bir folliküler dalgada bir follikülden fazla follikül ovulatör büyüklüğe ulaşmakta ve koyunlarda folliküler dominantlık zayıf olduğu için izleyen dalgalarda da aynı anda birden fazla ovulasyon olabilmektedir. Bundan başka siklik veya sezonal anovuler koyunlarda folliküler dalganın büyüyen en büyük follikülü iki folliküler dalga arasında verilmiş fizyolojik doz FSH ile indüklenmiş yeni bir folliküler dalganın çıkmasını inhibe edememektedir. En büyük follikülü indüklemek için kullanılan fizyolojik dozdaki ekzojen ovine FSH, ritmik endojen FSH sekresyonunu veya bir sonraki folliküler dalganın çıkışını etkilememektedir (Driancourt ve ark 1986, Evans ve ark 2000).

Yapılan bir çalışmada non-prolific Western White Face (Duggavathi ve ark 2004) koyunlarda ortalama dalga çıkış zamanları (follikülün 3 mm'den başlayıp 5mm ve daha büyük hale geldiği zaman hesaplanarak belirlenir) ovulasyondan

sonraki 0, 5, 9 ve 12. günler olarak ve yine prolifik Finn koyunlarında 1, 6, 10, ve 13. günler olarak belirlenmiştir. Ayrıca Finn koyunlarında en küçük antral follikülün maksimum çapa ulaştığı ve önceki tüm folliküler gelişimlerin folliküler seçilimden folliküler dalgaya kadar bu küçük follikülle devam ettiği bildirilmektedir. Prolific ve non-prolific genotiplerde folliküler dinamik ile ilgili yapılan çalışmalar prolific koyunlarda follikülerin daha küçük çaplarda olgunlaştığını göstermiştir (Souza ve ark 1997).

Yine başka bir çalışmada non-prolifik Western White Face koyunlarında son folliküler dalgada çıkan ovulatör folliküllerin %23'ü atreziye uğramış ancak prolifik Finn koyunlarında %100 ovulasyon gözlenmiştir (Scaramuzzi ve ark 1993, Souza ve ark 1997).

Koyunlarda östrus siklusu ve luteogenezis, luteinize edici hormonun temel etkisi altında, ruptur olan folliküldeki granuloza ve teka hücrelerinin fonksiyonel ve fenotipik değişimleriyle oluşmaktadır. Cl gelişimi ve hücresel başkalaşım için LH desteği zorunludur. Ovulasyondan 3-4 gün sonra koyun Cl'si 6-8 mm çapındadır ve yaklaşık olarak altı gün sonra maksimum çapı olan 11-14 mm'ye ulaşmaktadır. Bazı koyunlardaki bireysel luteal atrofi durumları ovulasyondan sonraki 12-15. günde ve 2-3 gün içerisinde aniden gerçekleşmektedir. Koyun Cl'si dört majör hücre tipinden meydana gelmektedir, bunlar; küçük luteal hücreler, büyük luteal hücreler, fibroblastlar ve kapillar endotelyal hücrelerdir. Küçük ve büyük steroidogenik luteal hücreler göreceli olarak teka ve granuloza hücrelerinden kök almaktadır. Bununla birlikte koyunların LH ile sağaltımı küçük luteal hücrelerin büyük luteal hücrelere dönüşümünü teşvik etmektedir. Küçük ve büyük luteal hücreler birlikte östrus siklusunun luteal fazında total luteal dokunun artmasına neden olmaktadır. Büyük luteal hücreler siklusun dört ve 12. günleri arasında artmakta ancak sayıları lutelozise kadar sabit kalmaktadır. Buna karşın küçük luteal hücrelerin boyutları değişmemekte ancak mitotik bölünme nedeniyle sayıları siklusun 4-8. günleri arasında artmaktadır. Kapillar endotelyal hücreler ve luteal fibroblastlar ise göreceli olarak siklusun 4-12. günleri ve 8-16. günleri arasında sayıca artmaktadır. Ayrıca mutlak koşullarda fibroblastlar küçük luteal hücrelere farklılaşmakta ki bu durum mikroskopik morfolojik olarak küçük luteal hücreler ile fibroblastlar arasında olan luteal bezdeki luteal hücrelerin varlığını da açıklamaktadır (Bartlewski ve ark 2011).

Endometriyal bezlerden salgılanan $PGF_{2\alpha}$ ruminantlarda luteolitik faktördür. Lokal pasaj ile uterus ven ve lenfatik damarlarından ovaryan arterlere ve ovaryumlara geçmektedir. Luteal fazın sonunda folliküler östradiol varlığı sekresyonunu artırmakta ve endometriyal reseptörleri oksitosine duyarlı kılmaktadır. Fonksiyonel luteolizis esnasında dolaşımdaki $P_4$ konsantrasyonundaki azalma oksitosin reseptörlerinin sayısında ve dolayısı ile pulsatil sekresyonunda artmaya neden olmaktadır. Endometriyal oksitosin reseptörleri seviyesindeki artış $P_4$ etkisinin kalkmasından en erken altı saat sonra tespit edilebilmektedir. Sonuç olarak luteal oksitosin ve posterior hipofiz orijinli oksitosin koyunlarda sekresyonunu kontrol eden mekanizmalarda önemli roller oynamaktadır (Dorniak ve ark 2011).

Koyunlarda seksüel sezon, ırka, iklime ve bölgelere göre değişmekle birlikte, Türkiye'de Temmuz-Kasım ayları arasında gün ışığı süresinin azaldığı günlerde görülmektedir. Seksüel sezon gün ışığının azalmaya başlaması ile uyarılmaktadır. Seksüel sezonun uzunluğu yüksekliğin artması ile de azalmaktadır. Nitekim ekvatorda koyunlar yıl boyu östrus gösterebilmekte, buna karşın kuzey ve güney yarım kürede yüksek yerlerde seksüel sezon daha kısa olmaktadır. Seksüel sezon uzunluğu ırk bazında da değişebilmektedir. Nitekim Dorset ırkı koyunlar diğer koyunlara göre daha uzun seksüel sezon geçirmektedir. Ancak yüksek yerlerin ırkları olan Welsh Mountain ve Scottish Blackface ırkı kısa bir seksüel sezon geçirmektedir. Orta Avrupa'nın lokal ırkları ve Avustralya'nın Merinos koyunları ise yıl içerisinde bir anöstrus sezonu göstermeyebilmektedir. Bununla birlikte İngiltere'de ki lokal ırklardan Clun Forest düşük bir sezonal aktivite göstermekte ve yılın her ayında çiftleştirilebilmektedir. Seksüel sezonun başlangıcı çeşitli hormon uygulamaları ve fotoperiyod müdaheleleri ile öne alınabilmektedir (Deveci 1999, Akçapınar 2000, Ataman ve ark 2009).

Sezona bağlı reprodüksiyon özellikle yüksek yerlerde yaşayan koyunlarda fotoperiyoda bağlı olarak yönlendirilmektedir. Yıllık fotoperiyodik siklusları düşünüldüğünde koyunların gün ışığı süresinin yüksek olduğu ilkbahar ve yaz aylarında sezon dışında oldukları ancak devam eden tüm ritimde bu dönemin kritik öneme sahip olduğu ve sezon başlangıcının genel olarak yaz sonu gibi görüldüğü bilinmektedir. Günlük ve sezonal senkronizasyonun ardında ve uykunun kontrolünde melatoninin önemli etkisinin olduğu ve bu hormonun duyusal süreçten farklı seviyelerde etkilendiği Guesdon ve ark (2013) tarafından bildirilmektedir. Bir başka

açıdan melatonin sekresyonunun stres deneyimlerinin kontrolü altında olduğu da söylenebilmektedir. Stresin fare gibi nokturnal aktif hayvanlarda gecelik melatonin salınımını baskıladığı ancak yarı diurnal ve diurnal türlerde gecelik melatonin salınımını artırdığı bilinmektedir. Ek olarak strese maruz kalma gündüz melatonin salınımını artırmakta, ancak gece salınımı azaltmaktadır. Koyun gibi diurnal türlerde ise tersi durum bildirilmiştir. Diğer taraftan melatoninin davranış, endokrin ve nörobiyolojik stres yanıtı üzerine günün dönemine göre etkisinin olduğu bildirilmektedir. Melatoninin geceleri anksiyete benzeri davranışları azalttığı ve gece uygulandığında birçok kronik stres etkisi geliştirdiği bildirilmektedir. Bundan başka melatonin sağaltımının maternal deprivasyonu olan ratlarda hipokampal hasarı engellediği de bildirilmiştir (Guesdon ve ark 2013).

Sezona bağlı seksüel aktivite gösteren koyunlarda melatonin hormonunun ise fotoperiyodik uyarım sonucu gonadotropin salınımını uyararak ovaryum aktivitesini başlattığı ileri sürülmektedir (Baştan ve Küplülü 1995).

Geleneksel olarak östrus siklusu birkaç faza ayrılmaktadır (Kalkan ve Horoz 1999).

### 1.7.1. Proöstrus

Östrustan hemen önceki fazdır. Reprodüktif sistemde belirgin değişikliklerle karakterizedir. Bu faz folliküler gelişme ve önceki siklusun Cl'sinin regresyonu ile karakterizedir. Uterus bir miktar büyümekte, endometriyum konjesyone ve ödematöz olmakta ve endometriyal bezler artan bir sekretorik aktivite göstermektedir. Vaginal mukoza hiperemik bir hal alırken, epitel hücre tabakası sayısı artmakta ve süperfisiyal tabaka kornifiye olmaktadır (Kalkan ve Horoz 1999, Canoğlu ve Sarıbay 2012).

### 1.7.2. Östrus

Erkeği kabul dönemidir. Hayvanlar genellikle erkeğin önünde durmakta ve atlamasına izin vermektedirler. Uterus, cervikal ve vaginal bezler artan miktarlarda mukus salgılamaktadır. Vaginal epitel ve endometriyum hiperemik ve konjesyone bir hal almaktadır ve cerviks gevşemiş durumdadır. Ovulasyon inek hariç tüm evcil memelilerde bu fazda gerçekleşmektedir. Yine kedi, tavşan ve deve hariç tüm evcil

memelilerde ovulasyon spontan olarak meydana gelmektedir. Östrus ve proöstrus esnasında folliküler gelişme mevcuttur ve Cl mevcut değildir. Salgılanan ve üretilen temel hormon östrojenlerdir. Proöstrus ve östrus kollektif olarak değerlendirildiğinde folliküler faz olarak adlandırılmaktadır. Östrus süresi immatür dişilerde 10 saat ve matür dişilerde 30 saat kadar sürmektedir. Ancak Merinoslarda bu süre 48 saate kadar uzayabilmektedir. Ovulasyon östrusun sonuna doğru gerçekleşmekte ve östrus siklusunun ortalama uzunluğu 17 gün kadar sürmektedir (Kalkan ve Horoz 1999, Canoğlu ve Sarıbay 2012).

**Östrus semptomları ve çiftleşme davranışları**

Östrustaki koyunlar sürekli hareket halindedir. Erkeğe kendini göstermek istemektedir ve erkeğin hareminin bir parçası gibi davranmaktadır. Erkek hayvan bu gruptaki dişileri ön ayağıyla eşeleme hareketi yaparak, diliyle yalama hareketi yaparak ve tüylerini ayağıyla yolarak seksüel uygunluk yönünden test etmektedir. Uygun olmayan dişiler kaçmakta, ancak tamamen östrusta bir koyunsa beklemekte, kuyruğunu sallamakta ve yana çekmektedir. Vulva belirgin olarak ıslak ve konjesyonedir ve temiz mukus akışı mevcuttur. Koç atlama hareketinden sonra ritmik pelvik hareketleri yapmakta ve ejakülasyondan sonra inmektedir. Aşımlar genellikle sabah erken saatlerde ve akşamları gerçekleşmektedir (Kalkan ve Horoz 1999; Canoğlu ve Sarıbay 2012).

**Ovaryumdaki değişimler**

Koyunların ovaryumları ineklerinkinden küçüktür ve görünümü hemen hemen küreseldir. Anöstrusta boyutları yaklaşık olarak 1,3-1,1-0,8 cm boyutlarındadır ve en büyük follikülün çapı yaklaşık olarak 0,2-0,6 cm aralığındadır. Follikülogenezis çalışmaları sığırlarınkinden veya kısraklarınkinden daha zordur. Buna karşılık ultrasonik veya laparoskopik yöntemle yapılan çalışmalar koyunların folliküler dalgasının ineklere benzer olduğunu ve her östrus siklusunda üç ya da dört folliküler dalga geçirdiğini, eğer üç folliküler dalga varsa ikisinin luteal faz esnasında ve birinin folliküler fazda oluştuğu bildirilmektedir (Noel ve ark 2003, Leyva ve ark 1995). Dominant follikül ya da folliküllerin çıkışı ile ilgili daha az kesinlik bulunmaktadır. Hatta anöstrus esnasındaki follikül çapı bazen siklik aktivite esnasında var olan follikül çapına ulaşabilmektedir (Bartlewski ve ark 1999).

Östrusun başlarında bir ya da daha fazla sayıda follikül bir cm çapa ulaşmaktadır. Folliküllerin duvarları ince, şeffaf ve follikül içi sıvı mor renktedir. Ovulasyondan 24 saat önce follikül yüzeyinde bir papilla oluşmakta ve bu aynı zamanda östrus başlangıcından 24 saat sonraya denk gelmektedir. Cl'nin gelişimi hızlı olmaktadır ve ovulasyondan sonraki ikinci günden 12. güne kadar lineer bir görüntü çizmektedir. Cl diöstrusun beşinci gününde 0,6 cm çapına ulaşmakta ve sonraki günlerde maksimum çapı olan 0,9 cm'ye ulaşmakta ve ortasında bir kavite oluşmaktadır. Diöstrus başlangıcında rengi kan kırmızısından soluk pembeye doğru değişmektedir. Çapı bir sonraki östrusa kadar sabit kalmakta ve eğer regresyon hızlı gelişirse rengi önce sarıya daha sonra kahverengi sarıya dönüşmektedir. Luteolitik mekanizma sığırlarınkine benzer gelişmekte ve $E_2$ ve $P_4$ artışı ile birlikte uterin oksitosin reseptörlerinde artış olmakta ve aynı zamanda luteal oksitosin uterustan $PGF_{2\alpha}$ sekresyonunu uyarmaktadır (Mann ve Lamming 1995). İlk Cl'ler sezonun başlangıcında ilk ovulasyondan sonra şekillenmekte ve kısa yaşam ömrüne sahip olmakta, sezon içerisinde tekrar ovulasyonlar şekillenmektedir. İkiz ovulasyonlarda Cl'ler aynı ovaryumda veya karşı tarafta şekillenebilmektedir. Gebelik esnasında Cl 0,7-0,9 cm çapında olmaktadır. Rengi soluk pembe olmakta ve sentral kavitesi kaybolmakta ve yerini beyaz renk almaktadır. Östrus semptomları gözlenmeksizin ovulasyondan sonra Cl formasyonunun gelişmesi durumu, özellikle anöstrusta şekillenebilmektedir ve bunlar yalancı ovulasyonlar olarak adlandırılmaktadır. Östrusta atılan oosit sayısı genetik ve besleme faktörlerine bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin İngiltere'de yüksek yerlerde yaşayan dağ koyunu genellikle bir kuzu doğurmaktadır. Ancak bu koyun sezondan önce merası zengin alçak alanlara indirildiğinde ikizlik oranları artmaktadır (Noakes 2003).

**Östrus siklusu esnasındaki endokrin değişimler**

Östrus başlangıcından hemen önce periferal östrojenlerde özellikle de östradiol-17β konsantrasyonunda bir artış gözlenmektedir. Bunu ovulasyondan 14 saat önce bir LH piki izlemekte ve rastlantısal olarak FSH konsantrasyonunda da bir artış şekillenmektedir. Ovulasyondan 2 gün sonra 2. bir FSH piki şekillenmektedir. Cl'deki fiziksel değişikliklerle birlikte $P_4$ konsantrasyonu da artmakta ancak ineklerdekinden düşük (2.5-4 ng/ml) seyretmektedir. Prolaktin östrus siklusu boyunca dalgalanmalar göstermekte ancak konsantrasyonu östrus ve ovulasyon

esnasında artmakta ve bu hormonun Cl formasyonunda görevli olduğu düşünülmektedir (Noakes 2003).

### 1.7.3. Metöstrus

Koyunun çifltleşmeyi reddetmesi ile başlayan bir yada daha fazla Cl oluşmasına kadar geçen veya başarılı bir östrustan sonraki dönemdir. Yaklaşık olarak iki gün sürmektedir. Koyunlarda luteinizasyon ovulasyondan hemen sonra hızlı bir şekilde, iki gün içerisinde şekillenmektedir. Ovule olan folliküldeki granuloza hücreleri luteal hücrelere dönüşmektedir. Böylece $P_4$ seviyesi de kısa süre içerisinde kanda belirlenebilir düzeylere ulaşmaktadır. Bu dönemde ayrıca servikal, vaginal ve endometriyal salgılarda da belirgin bir azalma olmaktadır (Kalkan ve Horoz 1999, Canoğlu ve Sarıbay 2012).

### 1.7.4. Diöstrus

Bu evre siklusun en uzun dönemi olmakla birlikte silusun 3-4. günlerinde başlayıp 12-14 gün kadar sürmektedir. Cl'nin bulunduğu evredir. Uterus bezleri hiperplaziye ve hipertrofiye uğramakta, cerviks sıkılaşmakta ve kapanmakta ve genital kanal sekresyonları azalmakta ve yapışkan bir hal almaktadır. Vaginal mukoza solgun bir hal almaktadır. Bu faz esnasında Cl tamamen fonksiyoneldir ve büyük miktarlarda $P_4$ salgılamaktadır. $P_4$ konsantrasyonu 4-8 ng/ml seviyelerine ulaşmaktadır. Eğer gebelik oluşmadıysa PG etkisiyle Cl 13. günden itibaren regrese olmaya başlamakta ve kısa süre içerisinde siklus sona erip progesteronun feedback etkisinin ortadan kalkmasıyla yeni bir siklus başlamaktadır (Kalkan ve Horoz 1999, Canoğlu ve Sarıbay 2012).

### 1.7.5. Anöstrus

Seksüel dinlenme dönemi olarak da adlandırılan bu dönemde genital organlar tam bir dinlenme halindedir. Folliküler gelişme minimumdur ve Cl belirlenebilmesine karşın regrese olmuştur ve fonksiyonel değildir. Koyunlarda anöstrustan sezona geçişte folliküler dalga çıkışı geçici olarak baskılanmış ve FSH sekresyonuna karşın FSH pikleri başlayamamaktadır. Bu anöstrusa geçiş ayrıca $E_2$ üretiminin deprese edilmesine ve sezon ortasına göre azalmış luteal $P_4$ konsantrasyonuna neden olmaktadır. Folliküler dalga çıkışı ile FSH piki arasındaki

senkron ve azalan $E_2$ üretimi koyunlarda anöstrusa geçişi işaret etmekte FSH sekresyonundaki değişimle ilgili bulunmamaktadır ve belki de ovaryumun gonadotropinlere duyarlılığı azalmaktadır. Anöstrusta LH salınım sıklığı üç saatte bire düşmekte ancak üreme sezonu öncesi LH preovulatör dalga benzeri bir salınım göstermekte ancak bu salınım östrus ve ovulasyon için yetersiz kalmaktadır (Kalkan ve Horoz 1999, Bartlewski ve ark 2011, Canoğlu ve Sarıbay 2012).

Sezondaki ilk ovulasyondan önce bazı koyunlarda herhangi bir luteal yapı gözlenmemesine ve bazılarında ise anovule folliküller gözlenmesine karşın $P_4$ konsantrasyonunda belirgin bir artış görülmektedir. Ancak bu değişim folliküler dalga gelişimini etkilememektedir. Bundan ötürüdür ki östrus davranışlarının indüklenmesi, preovulatör LH ile birlikte senkronize etmek ve takip eden luteal fazda prematüre luteolizisi engellemek amacıyla özellikle bir önem arzetmektedir. Günlük FSH konsantrasyonundaki dalgalanmalar anöstrusun sonlanmasından etkilenmemekte ve FSH pikleri folliküler dalgayla yakından ilgili bulunmaktadır. Östradiol sekresyonunun anöstrustaki koyunlarda azalmakta olduğu, ancak seksüel sezonun ilk luteal fazının büyük follikülünün gelişimi ile birlikte tamamen yok olmadığı bildirilmiştir (Bartlewski ve ark 2011).

### 1.8. Siklik Reprodüktif Aktivitenin Kontrolü

Çiftlik hayvanlarında siklik reprodüktif aktivitenin kontrolü östrusun luteal veya folliküler fazına manipülasyonunu gerektirmektedir. Koyunlarda ve keçilerde, daha uzun süreli olduğundan ve manipülasyona daha duyarlı olduğundan luteal fazda kontrol imkanı daha yüksektir. Dolayısı ile stratejiler de ekzojen progesteron uygulamaları ile bu fazın uzatılması veya var olan Cl'nin prematüre regresyonu yoluyla kısaltılması üzerine odaklanmaktadır. Yöntemin başarısı yalnızca dar bir senkronizasyon zamanı yaratmakla kalmamalı ayrıca doğal aşım veya suni tohumlama sonrası kabul edilebilir fertilizasyon oranlarına ulaşmayı da sağlamalıdır (Wildeus 2000).

Östrus ve ovulasyonun nedensel olarak birbiri ile ilişkili olduğu söylenemez, ancak iki olayda da östrus döngüsünün folliküler fazında meydana gelmektedir. Tüm östrus senkronizasyon teknikleri hormonal dengesinin değiştirilmesi esasına dayanmaktadır. Siklik aktivitenin düzenlenmesi temel olarak hipotalamus-hipofiz-

ovaryum üçlü ekseninin kontrolünde gerçekleşmektedir. Bu eksende bir taraftan serebral korteks, talamus ve orta beyin gibi ekstrahipotalamik merkezlerin ışık, koku ve dokunma gibi merkezlerle ilişkisi ve diğer taraftan uterusun ovaryum üzerine etkisi bu düzenleyici görevde rol alan elementlerdir. Hipofiz özellikle sezona bağlı siklik aktivite gösteren türlerde reprodüksiyonun kontrolünde önemli bir merkezdir ve pubertasın zamanlanmasında FSH, LH ve prolaktin salınımını düzenlemektedir. Senkronizasyon veya siklik reprodüktif aktivitenin kontrolü progestagen terapisi veya luteolitik PG'lerin kullanımı ile luteal fazın sonlandırılması ve yeni bir folliküler fazın başlatılması esasına dayanmaktadır (Scaramuzzi ve ark 1988).

### 1.8.1. Hormonal Olmayan Metodlarla Kontrol

**Gün ışığı düzenlemeleri / fotoperiyodun düzenlenmesi**

Kısrak, koyun, keçi ve kedide siklik aktivitenin başlangıcı gün ışığı süresi ile de ilişkilidir. Kısrak ve kedide fotoperiyodun uzaması keçi ve koyunda ise fotoperiyodun kısalması seksüel siklus üzerine uyarıcı etki yapmaktadır. Koyunlarda, barınma ortamlarında kontrollü ışık uygulamaları çiftleştirme sezonunu sonbahar ve kış aylarından ilk bahar ve yaz aylarına çekmeyi mümkün kılabildiği bildirilmektedir (Kalkan ve Horoz 1999).

Koyunlarda gün uzunluğunun suni olarak azaltılmasının amacı sonbahardaki gün uzunluğuna benzer koşulların sağlanarak ovaryum aktivitesinin uyarılmasıdır. Kontrollü ışık uygulamaları ile gün uzunluğu tedricen azaltılabilecği gibi, kısaltılıp östruslar gözleninceye kadar sürdürülebilmektedir. Kontrollü ışık uygulamaları yapılan koyunlarda östruslar aylar sonra da gözlenebilmektedir. Bireysel farklılığa bağlı olarak ilk östrus gösteren ile son östrus gösteren arasında oldukça uzun sürenin geçmesi, ışık uygulama binaları, ventilasyon ve artan yem maliyetleri gibi dezavantajlarından dolayı uygulama alanı sınırlı kalmaktadır. Ancak ışık ile melatoninin kombine uygulamalarının bu güçlükleri ortadan kaldırabileceği bildirilmektedir (Chemineau ve ark 1992).

Stellflug ve Nett (1988), normal aşım sezonunun sonunda suni ışık uygulamasına ilave olarak melatonin, suni ışık ve kontrol gruplarındaki gebelik oranlarını sırasıyla %54, %45 ve %24 olarak bildirmelerine karşın anöstrus

dönemindeki uygulamalardan elde ettikleri sonucu %54, %10 ve %6 olarak bildirmişlerdir.

Anöstrus döneminde suni ışık programlarında en iyi sonuç sekiz saat ışık 16 saat karanlık uygulamalarından alındığı bildirilmiştir. Işık programı uygulamaları kısa gün uzunluğundakine benzer şekilde etki ederek, melatonin düzeylerini artırmakta ve ovaryumu daha kısa sürede uyarabilmektedir (Bittman ve Karsch 1984).

**Besleme / Flushing**

Beslemenin sezona bağlı östrus gösteren ırklarda reprodüktif aktiviteyi artırıp artırmadığı çok açık değildir. Ancak iyileştirilmiş beslemenin olgun ve ovule olabilecek folliküllerin sayısını artırarak ovaryum kaynaklı fonsksiyonlar üzerine önemli olumlu etkisi bulunmaktadır. Sezon öncesi uygulamalarda bu etki flushing etkisi olarak da tanımlanmaktadır. Günlük rasyon miktarının artırılması özellikle de rasyon protein ve enerji düzeyinin artırılması doğacak kuzu sayısını artırabilmektedir. Nitekim kısa süreli besleme manipülasyonları senkronizasyon amacı ile intravaginal sünger uygulamalarını takiben uygulandığında ovulasyon oranlarını artırmaktadır. Yapılan bir çalışmada merinos koyunlarında 14 günlük FGA uygulamasının son altı gününde ilave baklagil tane yemleri ile beslemenin ovulasyon oranlarında %64 oranında bir artışı beraberinde getirdiği bildirilmiştir (Pearse ve ark 1994).

Başka bir çalışmada yine baklagil tane yemi ile ek besleme yapılan koyunlarda sezonda ovulasyon zamanının geciktirdiği ancak anöstrüsta herhangi bir etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Ryan ve ark 1992).

**Diğer hormonal olmayan yöntemler**

Erkek hayvanın varlığı da, dişi hayvanların seksüel aktivitesini uyarabilmektedir. Bu durum özellikle koyunlarda belirgindir. Örneğin seksüel sezon öncesinde vazektomize koçlar östrusun erken başlamasını uyarabilmektedir. Koyunlarda ve keçilerde östrus anöstrustaki hayvanlarda genç erkek veya kastre edilmiş hayvanların stratejik etkisi ile indüklenebilmektedir. Bu etki anöstrus sezonunun zamanı ile ve 2-3 gün içerisinde gerçekleşen ilk ovulasyon ile ilişkilidir.

Anöstrusta bulunan koyunlarda ve keçilerde, erkek etkisi ile hipotalamustan pulsatil GnRH salınımı tonik LH salınımlarını uyarmakta ve ovulasyonların senkronizasyonunu düzenlenmektedir. Anlık temasların aynı ağıl içinde barındırmaya göre daha etkili olduğu bildirilmektedir. Olfaktorik sistemin büyük oranda erkek hayvanın yapağısı tarafından uyarıldığı ve bununla birlikte daha önce hiç seksüel tecrübesi olmayan hayvanlarda erkek etkisinin de oldukça düşük olduğu bildirilmektedir. LH dalgasının sürü içine erkeğin konduğu andan itibaren bir kaç dakika içerisinde yükseldiği ancak FSH veya prolaktinin böyle hızlı bir değişim göstermediği ve erkek ile temas devam ettirilirse yaklaşık 36 saat içerisinde preovulatör LH salınımının oluştuğu bildirilmektedir (Gelez ve Fabre-Nys 2004).

Anöstrus döneminde koçların ses, görüntü ve kokularından bir süre izole edilen ve sonra koyunların yanına koçların ovulasyonu uyardığı bildirilmekltedir. İlk defa Underwood ve ark tarafından 1944 yılında bir dönem izole edilmiş koyunların arasına koçların katılması sonucu koyunların ovulasyon gösterdiği ortaya konmuş ve bu olay "*koç etkisi*" olarak isimlendirilmiştir. Koyunların koçları uyarmadaki en önemli rolü androjenler oynamaktadır. Androjenler tarafından uyarılan derideki yağ bezleri ya da viskoz koku bezlerinin feromon olarak adlandırılılan salgıları koyunlarda seksüel siklusun uyarılmasında esas rolü oynamaktadır. Koçların herhangi bir bölgesinden kesilen yün veya ekstraktlarının da aynı şekilde uyarı oluşturduğu bildirilmektedir. Koçların kokuları, koyunları uyarmada tek faktör olmamakla birlikte yeterli olacağı, görme, ses ve fiziksel temasın gerekli olmadığı, ancak feromonların alınmasına yardımcı oldukları bildirilmektedir (Rekwot ve ark 2001).

Olfaktör sinyaller ve feromonlar gibi sosyoseksüel faktörler veya uyarılar koyunlarda reprodüktif siklusu etkileyen olgulardır. Koç etkisine karşı endokrin yanıt, hipofiz ön lobundan salgılanan LH'nin tonik salınımında artış şeklinde oluşmaktadır. Bu uyarımda temel başlatıcı rolü oynayan GnRH feromonal sinyalleri nöral aktivasyon ile olfaktorik uyarım olarak algılamakta ve hipotalamusun uyarımı neticesinde salgılanmaktadır. Hipofiz ön lobundan salınan FSH ve prolaktin hormonları ise koç etkisinden ani olarak etkilenmemektedir. Prolaktin, fotoperiyod ya da laktasyona göre değişirken; FSH, yalnızca GnRH'nin salınım sıklığının artması ve dolaşımdaki steroidlerin değişimine bağlıdır. Anöstrus dönemindeki koyunlarda LH salınımlarının frekansı sık olmayıp, bu dönemde LH, düşük östrojen düzeylerinin

negatif feedback etkisine bağlı olarak kontrol edilmektedir. LH salınım frekanslarını kontrol eden fotoperiyod ve $E_2$'nin sinerjik inhibitör etkileri koç etkisi ile tersine çevrilmektedir.Anöstrus döneminde siklik faaliyetlerin olmamasının nedeni olarak, ovaryum steroidlerinin negatif feedback etkisine hipofiz ve hipotalamusun duyarlılığının artması gösterilmektedir. Merinos ve Dorset ırklarında, LH dalgarının frekansı kalıtsal olarak diğer ırklardan daha yüksektir. Bu nedenle anöstrusun ortasında bile koç etkisi ile bu ırklarda siklik aktivite uyarılabilmektedir. Koç etkisi ile 10-20 dakika içerisinde LH'nin tonik pulsatil salgısı, ovaryum steroidlerinin negatif feedback etkisinden bağımsız olarak hipotalamus ve hipofiz üzerine etki ederek artırılmaktadır. Daha sonra normal aşım sezonundaki östrus siklusuna benzer şekilde ovulasyon öncesi LH piki, ilk kontaktan 24-30 saat sonra meydana gelmekle birlikte, 6-54 saate kadar yayıldığı bildirilmektedir. Bu sırada FSH salınımı da artmaktadır. Koç etkisi uygulamalarında 48-72 saate kadar koyunların çoğunun ovulasyon sergilediği bildirilmektedir. Ancak koyunlar ovulasyon öncesi $P_4$ etkisi altında bulunmadıklarından şekillenen ilk ovulasyonda östrus semptomları gözlenmemekte ve normal Cl oluşmamaktadır. İlk ovulasyon sonrası koyunların %50'sinin de kısa ömürlü bir Cl'ye sahip oldukları belirtilmektedir (De Bond ve ark 2013).

### 1.8.2. Hormonal Yöntemlerle Kontrol

Bir çok farklı hormon preparatı evcil hayvanlarda siklik aktivitenin uyarılması amacıyla kullanılabilmektedir. Bunlar; anterior hipofiz hormon salınımını uyaranlar, anterior hipofizdeki gonadotropinleri taklit edenler, östrojenler, progestagenler, PG'ler ve melatonin olmak üzere altı gruba ayrılmaktadır (Scaramuzzi ve ark 1988).

**Anterior hipofiz hormonları salınımını uyaran preparatlar**

Ovaryum kaynaklı steroid hormonlar, özellikle de östrojenler anterior hipofiz ve hipotalamus üzerine pozitif feedback ile etki göstermektedir. Çok sayıda östrojen, veya östrojenin sentetik ve doğal türevleri, östrusu indüklemek amacıyla uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Östrojenler ya direk olarak östrus davranışlarını uyararak ya da genital sistemde değişikliklere neden olarak etki göstermektedir.

Ayrıca sentetik, kısa etkili veya depo GnRH preparatları da endojen gonadotropin salınımını uyarmak amacıyla kullanılabilmektedir (Alaçam 1999).

## Östrojenler

Folliküler dalganın kontrolü amacıyla ortaklaşa tasarlanmış teknikler (yani, USG rehberliğinde folliküler aspirasyon veya ekzojen $P_4$-$E_2$ sağaltımı) ile ineklerde folliküler dalganın herhangi bir zamanında başlayan süperovulasyon sağaltımına bağlı oluşabilecek varyasyonlar önemli oranda azaltılabilmektedir. Ancak koyunlarda folliküler dalga esnasında oluşan büyük antral folliküllerin progestagen-$E_2$ ile alınması için herhangi bir erken girişim metodu bulunmamaktadır. Buna karşın son zamanlarda yapılan çalışmalar, medroksiprogesteron asetat (MAP) salan intravaginal sünger sağaltımı yapılan anöstrustaki koyunlarda tek enjeksiyon $E_2$-ß (350 µg/koyun) uygulmasının büyük antral follikülün regresyonunu uyardığı ve enjeksiyondan yaklaşık 6 gün sonra senkronize bir folliküler dalga çıkışına neden olduğu bildirilmektedir. Sentetik veya doğal östrojenler anöstrustaki hayvanlarda östrusu uyarmak amacıyla kullanılabilmektedir. Bir çok açıdan östrojenlerin tubuler genital organlar ve davranış üzerine direkt etkileri bulunmaktadır. Östrojenlerin ovulasyonu ve ovaryum kaynaklı aktiviteyi başlattığı konusu şüphe taşımaktadır. Bununla birlikte yüksek doz östrojenin hipofiz inhibisyonuna neden olduğu da bilinmektedir (Barrett ve ark 2004).

## Progestagenler

$P_4$ ve progestagen komponentleri bir çok evcil hayvan türünde östrus siklusunun kontrolü veya bir grup dişi hayvanın senkronizasyonu amacıyla geleneksel olarak kullanılmaktadır. Genel olarak kullanımlarındaki prensip ekzojen progesteronun Cl gibi davranması, anterior hipofizi negatif feedback etkisi ile baskı altına alması ve siklik aktivitenin inhibe edilmesi esasına dayanmaktadır. $P_4$ kaynağı kaldırıldığında veya etkisi sonlandırıldığında ise siklik aktiviteye hızlı bir dönüş olmaktadır. Progestagenler koyunlarda reprodüksiyonun kontrolü amacıyla yalnız başına ya da diğer hormonlarla birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Anöstrustaki koyunlarda sezon dışında östrusun indüklenmesi amacıyla, yine siklik koyunları grup halinde senkronize etmek amacıyla da kullanılabilmektedir. Sünger, spiral ya da tampon birçok progestagen içeren aygıt intravaginal yoldan uygulanabilmektedir. Bu

doğrultuda konulan progestagen kaynağının yeterli miktarda veya yoğunlukta progesteron içermesi ve böylece yeterli negatif feedback oluşturabilmesi beklenmektedir. $P_4$ kaynağı olarak genellikle sünger içerisinde florogeston asetat (FGA) ve medroksiprogesteron asetat (MAP) gibi potansiyel kısa etkili progesteron analogları kullanılmaktadır. İntravaginal süngerler genellikle 9-19 gün aralığında kullanılmaktadır. İntravaginal aygıtlar sezon dışında kullanıldığında eCG gibi bir gonadotropin kaynağı ile birlikte kullanılması yüksek geri alım oranlarına ulaşılmasını sağlamaktadır. Kullanılan eCG dozuna bağlı olarak östrus ve ovulasyonu uyarabildiği gibi süperovulasyona da neden olabilmektedir. Uygulama farklılıkları eCG enjeksiyonun zamanlamasına göre değişmektedir. En iyi sonuçların süngerin kaldırılmasından 48 saat sonra görüldüğü bildirilmektedir. Koyunlar ilk sekronize östrusta çiftleştirildiklerinde fertilizasyon oranları da düşmektedir. Bunun nedeni $P_4$'ün süngerden yeterince emilememesi olabileceği gibi, spermin taşınmasında veya yaşama gücündeki azalmayla veya steroid dengesindeki bir anormallikle ilişkili de olabilmektedir. Ancak koyun eğer ilk senkronize östrusta gebe kalmazsa ikinci östrusta iyi bir senkronizasyon yakalamakta ve daha iyi konsepsiyon oranlarına ulaşılabilmektedir. Erken postpartum dönemde veya emzirme döneminde koyunlarda östrusu indükleme girişimleri ise sonuçsuz kalmaktadır (Vinoles ve ark 1999, Wildeus 2000).

**Prostaglandinler**

İki östrus arasındaki süre bir çok evcil hayvanda Cl'nin yarı ömrüyle kontrol edilirken, $PGF_{2\alpha}$ veya analogları ile prematüre lizis normal siklik aktiviteyi değiştirebilmektedir. Cl ancak ovulasyondan sonra aktif hale gelebilmektedir. Dolayısı ile ovulasyon öncesinde ekzojen PG uygulamaları Cl'yi etkilememektedir. Diğer taraftan Cl'nin kendi kendine regresyona maruz kalabilmesi için endojen luteolizininin etkisinde olması gerekmektedir ve bunun nasıl hızlandırılabileceği ve sürenin nasıl kısaltılabileceği ile ilgili yeterli bir bilgi bulunmamaktadır. Bir çok evcil havanda ve koyunlarda Cl siklusun 9-13 günü aktif olarak kalmaktadır. Koyunlara PG'ler veya analogları verildiğinde Cl'nin de duyarlı olduğu dönemde enjeksiyondan 36-46 saat sonra östrus gözlenmektedir. Bir grup koyunun senkronizasyonu isteniyorsa tek doz PG enjeksiyonu veya 9-11 gün arayla iki kez PG enjeksiyonu sonrası yaklaşık 36-48 saat arasında östruslar gözlenebilmektedir (Weems ve ark 2006).

PG tabanlı östrus senkronizasyonu sistemleri Cl'nin regrese edilerek luteal fazın sonlandırılması esasına dayanmaktadır. Bu metot yalnızca siklik koyunlarda kullanılmakta bundan dolayı da sınırlı bir kullanım alanına sahip olduğu bilinmektedir. Östrus siklusunun her aşamasında kullanılamaması nedeniyle 11 gün arayla kullanımı en yaygın kullanım alanına sahiptir. Östrus %95-100 oranında uygulamadan 46-48 saat sonra gözlendiği bildirilmektedir (Wildeus 2000).

**Melatonin**

Melatoninin keşfi (1958) ile birlikte reprodüktif sezona bağlı reprodüktif aktivite gösteren türlerde yeni bir çalışma alanı oluşturmuştur. Melatonin implantları koyunlarda keçilerde anöstrus sezonunda geniş kullanım alanı bulmuştur. Her günün 24 saati geceleri endojen melatonin salınımı baskılanmadan yüksek oranda melatonine maruz bırakılan hayvanlarda hipofiz bezi kısa gün etkisiyle sezondaymış gibi uyarılmaktadır. Melatonin implantları 18 mg hormon taşımakta ve genellikle 60 gün uygulama sürdürülmekle birlikte 100 güne kadar salınım yapabileceği bilidirilmektedir. Günlük salınım mikatarının da koyunlarda ve keçilerde 100 pg/ml civarında olduğu düşünülmektedir. Melatonin uygulamaları için başvurulan protokoller basit olup öncelikle sürüdeki her bir koça üç adet melatonin implantı kulak dibine enjekte edilmekte ve yedi gün sonra sürüdeki koyunlara benzer şekilde tek doz melatonin implant enjekte edilmektedir. Koyunlara implant takılmasından 40 gün sonra koçlar koyunların arasına konmakta ve östrus indüklenmektedir. Melatonin implantın kullanım zamanı iyi bir etkiyi garanti altına almak adına önem taşımaktadır. N45º'den daha kuzeyde ve S45º'den daha güneyde olan yerler için en uygun zaman yaz ayları iken N40º'den daha güneyde ve S40º'den daha kuzeyde olan yerler için ise ilkbahar en uygun implant yerleştirme zamanıdır. Akdeniz ülkelerinde ise kış öncesi zaman melatonin implantların kullanımı için en uygun zaman olarak düşünülmektedir (Abecia ve ark 2012).

Memelilerde fotoperiyodik sinyaller çoklu sinaptik yollarla retinadan hipofize taşınmaktadır. Yıllık ışık değişimleri hipofizer bir hormon olan melatoninin ritmik sentezinde değişimlere neden olmaktadır. Bu indolaminin sentez ve salınımı sirkadian (24 saatlik) bir ritim izlemekte, kanda ve serebrospinal sıvıda geceleri yüksek gündüzleri ise düşük seviyelerde seyretmektedir. Gecelik melatonin salınımındaki değişimler memelilerde endokrin bir mesajcı olarak görev görmekte ve

reprodüksiyon, besin alımı, yağlanma ve vücut ısısı gibi bir çok fizyolojik süreç düzenlemektedir. Bireyler arasındaki gecelik plazma melatonin sekresyonu farklılıkları insan, at, koyun ve keçi gibi bir çok memelide tanımlanmıştır. Koyunlarda bu bireysel farklılıkların genetik kontrol altında olduğu ve artan katabolizmayla ilişkili olmadığı ve yüksek melatonin konsantrasyonunun bireysel hipofiz bezi büyüklüğü ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Hipofiz bezinden melatonin salınımı yaşla birlikte progresif olarak azalmaktadır. İnsanlarda melatonin salınımının düzenlenmesinin yaşla bağımlı olduğu düşünülmekte ve günlük sirkadian ritmin düzenlenmesi, serbest radikallerin uzaklaştırılması, uykunun düzenlenmesi ve immun sistemin uyarılması gibi birçok faktörün de bununla ilişkili olduğu hipotezi varsayılmaktadır. Çiftlik hayvanları üretiminde evcil hayvanlar kısa bir yaşam siklusuna sahip olmakta, bununla birlikte melatonin sekresyonun yaşla bağlantılı sonuçları pek gözlenememektedir. Bununla birlikte koyunlarda yaşlanmaya bağlı reprodüktif aktivite azalmasının ekzojen melatonin tedavisi ile giderilebildiği bildirilmektedir (Carcangiu ve ark 2013).

**Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH)**

Gonadotropinler genellikle rutin olarak intravaginal senkronizasyon uygulamalarına ek olarak anovuler koyunlarda veya ovulasyonu indüklemek amacıyla kullanılmaktadır. Nitekim GnRH'nin farmakolojik dozlarda kullanımı intravaginal sünger uygulaması ile ilgili olarak Robin ve ark (1994)'ın sütçü keçilerde yaptıkları çalışmada MAP (60 mg, 14 gün) içeren süngerin çıkarıldığı gün tek doz (125 µg) GnRH enjeksiyonu ve 48 saat ara ile (125 µg x2) iki kez GnRH uygulamasının, alternatif olarak PMSG ile sağaltılan keçilere göre östrus başlangıcının ve ovulasyonla ilgili diğer endokrin olayların gecikmesine neden olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında yine merinos koyunlarında süngerin çıkarılmasından (MAP, 12 gün) 24 saat sonra GnRH (100 µg) enjeksiyonunun sezondaki koyunlarda ovulasyon zamanına olumlu etkisinin olduğu, ancak anöstrus sezonundaki koyunlarda bir etkisinin bulunmadığı bildirilmektedir (Ryan ve ark 1992).

**Hipofiz gonadotropinlerine ek olarak veya yerini alacak şekilde kullanılan preparasyonlar**

FSH ve LH'nin hipofizden ekstrakte edilmesi mümkündür. Ancak pahalı olması veya rutinde ne kadar kullanılacağını hesaplamak için gereken sürenin uzun olması nedeniyle rutin kullanım yerine sadece süperovulasyon ve embriyo transferi gibi özel tekniklerde kullanımı uygun görülmektedir. Bundan başka Bovine Spongioform Ensefalopati (BSE) gibi hastalıkların taşınması gibi riskleri de beraberinde getirmektedir. Ne yazık ki sadece iki farklı hazır preparatları bulunmaktadır. Bunlardan biri eCG'dir ve gebe kısrak serumundan elde edilir ve temel olarak FSH etkisi göstermekle birlikte az da olsa LH benzeri etki de göstermektedir. Diğeri ise insan koryonik gonadotropini olan hCG'dir ve gebe insanların idrarlarından elde edilmektedir. Bu hormon ise daha çok LH benzeri etki göstermekle birlikte az da olsa FSH benzeri etki de göstermektedir (Hafez 1993b, Özyurtlu ve Bademkıran 2010).

Amerika'da ve sadece veteriner hekimliği kullanımına sunulan PG-600, PMSG kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu preparat 400 IU PMSG ve 200 IU hCG kombinasyonunu içerdiği bildirilmektedir (Özyurtlu ve Bademkıran 2010). Nitekim Rowe ve East (1996) sütçü keçilerde yaptıkları çalışmada norgestomet implantın kaldırılmasından 36 saat önce 300 IU PMSG ve implant çıkarıldığında Cloprostenol (125µg) enjeksiyonuyla senkronizasyon sonrası östrus yanıtlarının önemli bir farklılık göstermediğini ancak gebelik ve kuzulama oranlarının PG-600 sağaltımında daha iyi olduğu bildirmiştir.

**İmmunizasyon protokolü**

Koyun sürülerinde ikizlik oranının artırılması ile verimlilik önemli oranda artmaktadır. Bu artışa, ovulasyon oranının artırılmasına dayanan birçok yöntemle ulaşılabilirken alternatif sağaltımlarla elde edilen bir batında elde edilen kuzu sayısı farklılık göstermektedir. İkizlik oranını artırma girişimlerinde kullanılan alternatif yöntemlerden bazıları, aşımdan bir kaç hafta önce flushing uygulamaları, Andrestenoidon (Fecundin®) ile immunizasyon'dur. İmmunizasyon ile ovulasyonun uyarılması ilk olarak Scaramuzzi ve arkadaşları tarafından 1977 yılında gösterilmiştir. Daha sonra ise ticari bir preparat olan Fecundin® (Croker ve ark

1987) geliştirilmiştir. İmmunojen kullanımı ile de kuzulama oranının artırılması mümkündür (Wilkins 1997).

### 1.9. Senkronizasyon

Koyunlarda reprodüktif siklusun senkronizasyonu amacıyla birçok ekzojen hormon uzun yıllardır etkin olarak kullanılabilmesine karşın sezon dışında veya anöstrusta bu hormonların etkinlikleri sınırlıdır. Seksüel siklusların senkronizasyonu amacıyla koyunlarda en uygun yöntem hormonal yöntem olmakla birlikte, oral, enjeksiyon, deri altı implant ve progestagen içeren aygıtların intravaginal yolla kullanılması uygulama yollarını oluşturmaktadır. Bu amaçla kullanılan; $P_4$, MAP, FGA, megestrol acetate (MA), melengestrol acetate (MGA), chlormadinone acetate (CAP), norethandrolone (NEA) ve norethisteron acetate (NET), içeren farklı ticari progestagen preparatları bulunmaktadır. Siklik koyunlarda östrus ve ovulasyonların senkronizasyonu amacıyla genel olarak en çok üç metot kullanılmaktadır. Bunlar progesteron emdirilmiş süngerlerin 12 günlük uygulamaları; progesteron içeren silikon kontrollü ilaç salan aygıtların 12 günlük vaginal uygulamaları ve luteal faz ortasında tek doz 125 µg $PGF_{2\alpha}$'nın sentetik analoglarının intramuskuler kullanımından oluşmaktadır (Scaramuzzi ve ark 1988, Gottfredson 2001).

Aşım sezonunda ve Avustralya Merinosu koyunlarında yapılan geleneksel $P_4$-eCG tabanlı senkronizasyon uygulamasının yedi gün ara ile iki doz $PGF_{2\alpha}$ sağaltımı ile karşılaştırıldığı çalışmada her iki sağlatımda da birbirine yakın ve %80 civarında östrus senkronizasyon oranları yakalanırken $PGF_{2\alpha}$ sağaltımında fertilite ve fekundite oranlarının $P_4$-eCG kombine sağaltımına göre daha düşük olduğunun gözlendiği bildirilmiştir (Olivera-Muzante ve ark 2011).

Martemucci ve D'Alessandro (2011) çalışmalarında birinde doğal aşım yaptırdıkları ve diğerinde AI yaptıkları iki farklı deney grubu oluşturmuş, ilk deney grubu ya da GrupFe (kontrol) adını almış olan gruba ve 14 gün FGA süngerlerinin takılmasına ilave olarak süngerin çıkarılacağı gün 200 IU im eCG enjeksiyonu yapılmış, Grup Fpe olarak adlandırdıkları gruba beş günlüğüne 40 mg FGA içeren vaginal süngerler takılmış ve beşinci gün 100 µg im $PGF_{2\alpha}$ ve 200 IU im eCG enjeksiyonu yapılmıştır. Buna ilaveten GrupPFe olarak adlandırdıkları gruba 40 mg FGA süngerin takıldığı gün aynı önceki grupla aynı miktar $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu

yapılmış ve beşinci gün 200 IU eCG uygulanmıştır. GrupPFG grubuna da süngerin uygulandığı gün $PGF_{2\alpha}$ enjekte edilmiş ve süngerin çıkarıldığı gün eCG uygulamasından 30 saat sonra bu gruba 100 µg GnRH analoğu im olarak verilmiştir. GPe grubuna da son olarak sıfırıncı gün GnRH uygulamasından sonra 5. gün $PGF_{2\alpha}$ ile birlikte öncekilerle aynı miktarda eCG im olarak verilmiştir. İkinci deney gruplarında ise; FP olarak adlandırılan ilk gruba 40 mg FGA içeren sünger takıldıktan sonra süngerlerin çıkarıldığı 5. gün $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu yapılmıştır. İkinci gruba yani FPG grubuna 5 gün FGA ve 5. gün $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonuna ilave olarak süngerin çıkarılmasından 30 saat sonra 100 µg GnRH enjeksiyonu yapılmış ve son gruba (FpeG) beş gün FGA, beşinci gün $PGF_{2\alpha}$ ve eCG'ye ilave olarak 30 saat sonra GnRH enjeksiyonu yapılmıştır. Senkronizasyonun başarısının belirteci olan östrus gösterme oranları karşılaştırıldığında en yüksek Fe (%93.3) grubunda ve sırasıyla PFe (%92.2), GPe (%91.7), FPe (%86.7) ve PFG (%66.6) gözlendiği bildirilmiştir. Sonuç olarak PFG grubunun sezonda kabul edilebilir fertilite ve kuzulama oranlarına ulaşmayı sağladığı bildirilmiştir.

Anöstrustaki, farklı dozlarda, 15, 30, 45, veya 60 mg MAP içeren intravaginal sünger uygulanan koyunlarda ovule olan koyun oranında (%96,8) veya ovulasyon oranında (1,25) herhangi bir farklılık olmadığı ve dozun geleneksel olan 60 mg MAP kullanımında herhangi bir etkinlik farkı yaratmayacağı bildirilmiştir (Iglesias ve ark 1997).

Kontrollü internal ilaç salan aygıtlar (CIDR) $P_4$ ile doyurulmuş medical silikon elastomerlerden oluşmuştur ve Yeni Zelanda'da geliştirilmiştir. Küçük ruminantlar için bugün en çok kullanılan tipleri CIDR-S ve CIDR-G'dir. Progesteron içerikleri %9 ile 12 arasında değişmektedir (330 mg P4). Daha çok kullanılan ve geleneksel olan FGA içeren intravaginal süngerlerle CIDR aygıtlarının karşılaştırıldığı çalışmada ikisi arasında östrus, fertilite ve gebelik oranları açısından bir fark bulunamamış ancak CIDR sağaltımında tohumlama zamanının 10 saat kadar geciktiği belirlenmiştir (Wildeus 2000).

Mellado ve Valdez (1997)'in senkronizasyon amacıyla yapılan, kullanılmışlığa bağlı olarak farklı dozlardaki yeni ve kullanılmış norgestomet kulak implantların (Synchro-Mate B, SMB) keçilerde senkronizasyondaki etkinliklerini araştırdıkları çalışmada 1/5 oranındaki SMB'nin sağaltımının bile östrus gösterme

oranları bakımından kullanılmamış SMB ile aynı etkinliği gösterebildiği ve senkronizasyon oranlarının (%59, %64, ve %67) ise birbirine yakın olduğu bildirilmiştir.

Gazal (2010)'ın Assaf koyunlarında anöstrusta 14 gün süre ile ve yedi gün süre ile iki kez olmak üzere MAP içeren vaginal süngerle senkronizasyon yapılan ve süngerin çıkarıldığı gün 300 IU veya 600 IU PMSG kullanımıyla oluşan östrus yanıtını, östrus başlangıcı ve süresini, kuzulama oranlarını, doğum ağırlıklarını, erken östrusta ve erken gebelikte serum $P_4$ konsantrasyonlarını ölçtükleri çalışmada $P_4$ süresinin ve PMSG seviyesinin test edilen parametrelerin hiçbirine etkisinin olmadığı ve düşük PMSG uygulamasının özellikle yerel koyun çiftliklerinde ekonomik kazanca neden olduğu anlaşıldığı bildirilmiştir.

Vinoles ve ark (1999) Polwarth koyunlarında altı gün ve 12 gün progestagen tedavisiyle eCG kullanılarak veya kullanılmadan folliküler dinamik, östrus senkronizasyonu ve gebelik oranı, üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, süngerin çıkarılmasından 96 saat sonra uzun sureli (12 gün) $P_4$ sağaltımı yapılan koyunlarda daha yüksek oranda östrus oluşumu saptanmıştır. Buna karşın tüm gruplarda süngerin çıkarılmasından sonraki 96-144 saatler arasında yoğunlaşmıştır.

Kalkuhi koyunlarında erken anöstrus sezonunda farklı senkronizasyon metotlarının etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında Yadi ve ark (2011) A grubu olarak adlandırdıkları ilk grupta 60 mg MAP içeren intravaginal süngerler 14 gün boyunca vaginada tutulmuş, B grubunda intravaginal CIDR (1,38 g progesteron) takılarak 12 gün boyunca vaginada tutulmuş ve CIDR'in çıkarılmasından sonra 500 IU PMSG im olarak uygulanmıştır. C grubu olarak adlandırdıkları son gruba ise 11 gün arayla iki doz PG (Lutealyse 3 cc, im) uygulanmış ve tüm koyunlar fertil koçlarla çiftleştirilmiştir. Östrus oranları degerlendirildiğinde A ve B gruplarında %45, B grubunda %35 ve C grubunda %70 olarak verilmiştir.

Dorset ve Rambouliet x Dorset melezlerinin telemetrik "*HeatWatch*" östrus tespit sistemi ve transrektal USG ile kontrol edilerek norgestomet (6 mg) implant sağaltımı ile östrus ve ovulasyon zamanlarının değerlendirildiği bir çalışmada ek olarak PMSG (500 IU) yapılan koyunlarda sadece implant takılan koyunlara göre

östrusa gelme zamanının 79.8 saatten 68.6 saate ve ovulasyon zamanının da 46.0 saatten 32.6 saate gerilediği bildirilmiştir (Cardwell ve ark 1998).

MGA, entansif yetiştirilen sığırlarda östrusu baskılamak amacıyla gelişitirilmiş oral olarak aktif bir sentetik progestagen preparatıdır. Ancak fertil östrusların indüksiyonu amacıyla sezonal anovular koyunlarda da kullanılmaktadır. Bu ürünün kullanımı MGA içeren besin takviyeleri ile koyunların günde bir ya da iki kez 8-14 gün aralığında beslemesi yoluyladır. MGA ile senkronizasyon protokolleri genellikle yardımcı sağaltımlarla örneğin PG-600 (PMSG/hCG) ve/veya Ralgro (Zeranol) ek kullanımı ile yapılmaktadır. Zeranol ticari olarak ulaşılabilir büyümeyi uyarıcı, LH ve FSH üzerine östrogenik etkili ve MGA sağaltımının başlangıcında veya sonunda kullanılabilen bir üründür (Wildeus 2000).

### 1.10. Süperovulasyon

Koyun ovaryumlarında da diğer birçok memelide olduğu gibi fötal ve neonatal hayatları boyunca asla fertilize olamayan binlerce oosit üretilmektedirler. Bu üretimde kullanılamayan oositlerin kullanımı amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir ve bu yöntemler birçok potansiyel avantajı da beraberinde getirmektedir. Bunlar, jenerasyon aralıklarının kısaltılması, projeni testi yapılmış dişilerin eldesi, donör olarak üstün dişilerin kullanımı, her bir dişinin kontrollü çoklu doğumu için projeni testini mümkün kılması, seçilmiş genetik karakterlerin embriyolarla uzun mesafelere taşınmasını kolaylaştırması, genetik deneyleri kolaylaştırması, prenatal ve maternal etkilerin izolasyonunu sağlaması, normal gelişim ve optimum fertilizasyon için ihtiyaçların araştırılması ve gebeliğin başlangıcında veya devamında farklı stres kaynaklarının etkilerini çalışmayı kolaylaştırması gibi faydaları bulunmaktadır. Süperovulasyonun en önemli amacı donör başına normal fertil oosit veya embriyo sayısını artırmaktır. Elde edilen oosit veya embriyo sayısı süperovulasyon sağaltımının başarısını gösteren en önemli kriterdir ve bu sıklıkla literatürlerde sağlıklı hayvanlar için optimum koşullarda elde edilen sonuçları göstermektedir (Hafez 1993c, Alaçam 1999, Forcada ve ark 2010).

Süperovulasyon uygulamaları günümüzde de azalan dozlarda FSH uygulamaları veya tek doz eCG uygulaması gibi geleneksel yöntemlerle domuz, inek, kısrak ve koyun gibi birçok hayvan üzerinde yapılmaktadır. Basitçe folliküler

gelişimin FSH'nin im ve sc uygulaması ile uyarılması esasına dayanmaktadır. Bu aktiviteyi uyarmak amacıyla domuz hipofiz ekstraktı, koyun hipofiz ekstraktı veya gebe eCG, hMG ya da kısrak hipofiz ekstraktı gibi birçok hormon kullanılabilmektedir. Süperovulasyon etkisi açısından eCG ile benzer olmasına karşın hMG prematüre luteal regresyon dezavantajı nedeniyle rutin olarak kullanılmamaktadır. eCG 1960'lardan beri koyunlarda yalnız başına veya FSH ile kombine olarak süperovulasyon amacıyla kullanılmaktadır. Ancak ovulasyonların senkronize olmaması nedeniyle FSH daha fazla kullanım alanı bulmaktadır. Yine ovaryan follikülün gelişimi ve steroidogenezis üzerine olumsuz etkisi de yadsınamayacak derecededir. Nitekim germinal kompartımanların prematüre aktivasyonuna neden olurken yaşlanmış ve anormal oositlere de sebep olabilmektedir. Ek olarak antikor oluşumu da eCG kullanımının oluşturduğu sekellerden birisidir. Ticari olarak ulaşılabilir hipofizer ekstraklardan hazırlanan FSH preparasyonları kaçınılmaz olarak uniform kompozisyonda değildir. Farklı LH içerikleri ovaryan yanıt, fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesi derecesinde süperovulasyon yanıtını da ister istemez etkilemektedir. Her ne kadar FSH tarafından indüklenmiş folliküler gelişmede bazal LH konsantrasyonu zaruri olmakla birlikte LH konsantrasyonunun destekle yükselmesi, endojen atrezi önleme mekanizmalarını hızlandırmakta, preovulatör LH dalgasını bozmakta ve ovulasyon ve fertilizasyon proseslerini olumsuz etkilemektedir (Amiridis ve Cseh 2012).

Süperovulasyon sağaltımına alınan birçok hayvan endojen LH salınımı nedeniyle beş gün içerisinde östrus oluşmakta ve ovulasyonşekillenmektedir. Ancak ovulasyonu garantilemek amacıyla genelikle iv ya da im LH ya da hCG ile ek uyarım da yapılabilmektedir (Foote ve Onuma 1970).

Süperovulasyon ile elde edilen embriyoların donör hayvanlardan toplanması pratik anlamda embriyonun gelişim aşamaları açısından birçok engel taşımaktadır. Son 30 yılda birçok gonadotropin farklı koyun ırklarında sezonda veya sezon dışı uygulamalarla süperovulasyonu uyarmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak protokoller, tekrarlayan birçok uygulamayı gerektirmesi, uygulamaların zaman alması ve sadece sağlıklı hayvanlara uygulanabilmesi gibi birtakım zorluklar barındırmaktadır. Bu nedenlerle süperovulasyon protokollerinin basitleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Tek doz FSH uygulaması süperovulasyon uygulamasını basitleştirmek amacıyla kullanılabilir ancak bu durumda prematüre luteal regresyon sıklıkla karşımıza

çıkabilmektedir. Lopez-Sebastian ve ark (1993), FSH'nın tek doz olarak yağlı bir araçla verilmesi durumunda emilimin yavaşladığını bildirmişler, ancak bu durumla ilgili yeterince araştırma yapılmamıştır. Bunun yanında tek doz eCG uygulaması uzun yarılanma ömrü nedeniyle sıkça uygulama alanı bulabilmekte, ancak fiyatı düşük olmasına karşın yüksek dozlarda eCG'nin hormonal denge, ovulasyon, fertilizasyon, embriyo eldeleri ve canlılık oranları üzerine zararlı etkilere neden olması gibi dezavantajları da yanında taşıdığı söylenebilir.

Bir çok nedene bağlı olarak bir süperovulasyon prosedürü sonrası ovulasyon oranları oldukça farklılık gösterebilmektedir. Hormonal sağaltımın hassasiyetine, doz ayarlamasının veya senkronizasyon tekniğinin uygun olmasına karşın, süperovulasyon sonrası ovulasyon oranlarının düşük olmasının nedenlerinden birini, ovulasyon oranlarındaki yüksek çeşitlilik ve gebelik oluşturma kapasitelerinin farklı oluşudur. Düşük süperovulasyon yanıtının nedenlerinden bir diğeri de ovaryan folliküler gelişimde folliküller arasında bir hiyerarşinin söz konusu olmasından kaynaklanmaktadır. Bir çok follikülün ovulasyon için uyarımı ve her bir follikülün sağaltım başlangıcında fonksiyonel olarak farklı bir statüde olması, ovulasyon anında folliküllerin farklı statüde olmalarına ve dolayısıyla ovulasyon oranlarının da farklı olmasına neden olmaktadır (McNatty ve ark 2010).

Ovulasyon oranının çeşitliliği, gonadotropinlerin kaynağı, saflığı ve uygulama biçimi gibi ekstrinsik faktörlere ve ırk, yaş, besleme, genetik, sezon ve reprodüktif durum, gibi intrinsik faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Başarılı süperovulasyon sağaltımlarında embriyo toplama oranları sağaltımın başarısıyla orantılı olarak genellikle düşmekte, ancak transfer edilebilir embriyo sayıları etkilenmemektedir. Yine doğal östrus gösteren koyunlarda embriyo toplama oranları ve transfer edilebilir embriyo oranları hormon ile indüklenerek östrus gösterenlere göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Quan ve ark 2011, Amiridis ve Cseh 2012).

Ovaryum kaynaklı uyarımda FSH/LH oranı da önemli bir yer tutmaktadır. Ancak kullanılan hormonun LH içeriği ile, ovulasyon oranı veya embriyo üretimi arasındaki bağlantılar henüz tanımlanamamıştır. Sığırlarda yapılan birçok çalışma FSH preparatlarındaki yüksek LH içeriğinin ovaryum yanıtın olumsuz etkilediğini ve daha düşük ovulasyon oranları, fertilizasyon ve düşük embriyo kalitesine neden

olduğu bildirmektedir. Ancak az miktarda bir LH'nin da faydalı olduğu ve saflaştırılmış FSH preparatlarının düşük süperovulasyon yanıtına neden olabileceği bildirilmiştir. Bundan başka FSH/LH oranının endojen olarak da luteal regresyondan preovulatör LH pikine kadar olan dönemde azaldığı bildirilmektedir. Bununla birlikte domuz hipofizinden alınan ekstraktla hazırlanan preparasyonda FSH/LH oranının 6/1 olduğu belirlenmiştir (D'Alessandro 1997, D'Alessandro ve ark 2005).

Süperovulasyon protokolleri temel olarak PMSG, pFSH ve oFSH gibi ekzojen gonadotropinlerin kullanımına göre sınıflandırılmaktadır. GnRH ise genellikle intravaginal aygıt veya sünger çıkarıldıktan sonra ovulasyon oranını artırmak amacıyla farklı dozlarda kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar CL'nin regresyonunu garantiye almak amacıyla $PGF_{2\alpha}$ analoğu da kullanılabilmektedir (Caroline ve Summers 1999).

Rekombinant sığır somatotropinin (rbST) çiftleştirme sezonunda fertil ve düşük fertiliteli koyunlarda süperovulasyon amacıyla uygulandığı çalışmada Mejia ve ark (2011) ovulasyon oranı, embriyo verimi ve embriyonik gelişimi değerlendirmeye almışlardır. Uygulama sonrası fertil koyunlarda ovulasyon oranının önemli oranda arttığı ve embriyonik gelişimin fertilitesi düşük koyunlara göre daha iyi olduğu sonucuna varmışlardır.

### 1.11. Koyunlarda Çiftleştirme ve Tohumlama Yöntemleri

Suni tohumlama dünya çapında hayvan yetiştiriciliğinde büyük önemi olan bir yardımcı üreme tekniğidir. Sığır ve domuzda suni tohumlamanın başarısı açısından uzun bir geçmişi vardır. Koyunlarda ise projeni testi ile bağlantılı olarak koyunun genetik gelişimine katkıda bulunmaktadır. Ancak koyunlarda diğer türlere göre sadece fertilite sonuçlarının düzensiz ve düşük olması açısından değil uygulamanın zorluğu ve dondurma-çözdürmede oluşan kayıp nedeniyle kullanımı oldukça sınırlıdır. Koyunlarda da dondurulmuş, çözdürülmüş sperma ile servikal tohumlamada fertilite oranları düşüktür. Bu nedenle günümüzde bir çok yetiştirme programı tohumlamadan birkaç saat önce toplanıp buzdolabında depolanan ve süperfisiyal intracervikal olarak tohumlamayı daha uygun görmektedir. Ancak, koyuna bağlı faktörler, tohumlama mevsimi, teknisyen, çiftlik koşulları ve erkek

hayvana bağlı koşullar gibi bir çok faktörün tohumlamanın başarısını ve dolayısıyla fertiliteyi etkilediği düşünülmektedir (Palacin ve ark 2012).

Dondurulmuş spermanın suni tohumlamanın üstün genetik bireylerin üretiminde önemli rolü vardır. Sperma depolama tekniklerinden biri olan trans servikal suni tohumlama, "*Guelph sistemi*" olarak ta bilinmektedir. Bu yöntem servikal penetrasyon da ve tohumlama sonrası kuzulama oranında oldukça yüksek başarı sağlamaktadır. Ancak bu yöntemin koyun cerviksinin kompleks anatomik yapısından (uzun, fibröz, tubuler sarmal yapısı ve lumeninin burgulu yapısı) ve ekzantrik yerleşmiş altı annular halkadan ve küçük halka açıklıklarından dolayı sınırlayıcı faktör olduğu düşünülmektedir (Rashidi ve Cedden 2013).

Dondurulmuş çözdürülmüş sperma ile servikal orifisyumdan tohumlama ve spermanın cerviks önünde depolanması yöntemiyle tohumlamalarda fertilite oranı düşüktür (%20-30). Ancak yine dondurulmuş çözdürülmüş spermanın laparoskopik intrauterin depolanması fertiliteyi oldukça artırmaktadır (%60-80). Bununla birlikte yapılan çalışmalar, koyunlara ve koça bağlı bireysel farklılık, çiftlik şartları, yıllar ve diğer bilinmeyen faktörlere bağlı olarak fertilizasyon oranı intrauterin tohumlamada da %30 ile %85 arasında değişmektedir (Fukui ve ark 2010). Laparoskopik intrauterin tohumlamada laparoskopi cihazı altında görüntülenen uterus cornularının distal kısmına $100x10^6$ motil sperm içeren 1 ml dilüe edilmiş semen aktarılmaktadır (Azawi ve Al-Mola 2011).

Koyunlarda yapılan bir çalışmada yüksek doz $100x10^6$ ve düşük doz $25x10^6$ sperma ile laparoskopik olarak tohumlanan hayvanlarda fertilizasyon oranları karşılaştırıldığında yüksek dozda sperma ile tohumlanan koyunların daha çok sayıda embriyo verimine neden olduğu gözlenmiştir (Forcada ve ark 2012).

Östrusta olduğu belirlenen koyunlar belirlendikten sonra elde sıfat, rastgele çiftleştirme gibi yöntemlerden biri ile doğal aşımla, intraservikal ya da laparoskopik intrauterin tohumlama ile tohumlanabilmektedir. Laparoskopik tohumlama yapılacak koyunlar 24 saat öncesinden su ve yem kısıtlamasına gidilerek ve transfer edilecek olan taze spermanın fertilitesi kanıtlanmış koyunlardan motilite, konsantrasyon ve PBS ile uygun dilusyonlarda sulandırılması ile sağlanmaktadır. pH'sı 6,8-7,2 ve 270-310 mOs osmotik basınçta olacak ve her 1 ml'de $100x10^6$ motil spermin olduğu

dilusyonlar hazırlanmaktadır. Bununla birlikte intrauterin inseminasyon süngerin çıkarılmasından 44-46 saat sonra cornuların laparoskopik görüntülenmesinden sonra 1 ml semenin her bir cornunun distal porsiyonuna iletilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Laparoskopik tohumlamadan sonra kanül, $CO_2$ ve dikiş bölgesinden alınmaktadır (Azawi ve Al-Mola 2011).

### 1.12. Embriyo Toplama

Embriyo toplama için kullanılan metodoloji uterus cornularında bir akıntı oluşturacak bir medumun enjekte edilmesi esasına dayanmaktadır. Yaygın kullanılan medyum fosfat bufferlı solusyon (PBS) içerisine %10 inaktif sığır, koyun veya keçi serumu eklenmesi ile elde edilmektedir (Gibbons ve Cueto 2011).

Ruminantlarda cerrahi ve cerrahi olmayan yöntemlerle embriyo toplanabilmektedir. Her iki yöntemde de maksimum sterilizasyon kurallarına uyulması gerektiği bildirilmektedir (Kanagawa ve ark 1995).

#### 1.12.1. Cerrahi Yöntemle Embriyo Toplama

Bu yöntem laparoskopik olarak reprodüktif organların açığa çıkarılması esasına dayanmaktadır. Uterusun distal 1/3'ü pens, baş parmak veya işaret parmağı ile bloke edilir. Bu kısma sıvı enjekte edilir bu sırada uterusa hafif masaj uygulanır ve sıvının infundubuluma ulaşması sağlanır. Alternatif başka bir prosedür de corpus uterinin cornulara yakın kısımdan kapatılması utero-tubal birleşme yerinden sıvı verilmesi ve embriyoların toplanması esasına dayanmaktadır. Bu prosedürler çok sayıda embriyo toplanmasına olanak sağlamaktadır. Ancak uterusta yaratılan travma ve sonrasında oluşan yapışmalar nedeniyle bu yöntemin tekrarlanabilirliği sınırlıdır. Koyun embriyoları östrustan yaklaşık dört gün sonra uterusa ulaşmaktadır. Dolayısıyla embriyo toplama, yarılma (hatching) da göz önüne alınarak östrus bitiminin altı veya yedinci gününde yapılmaktadır. Embriyoların bu günlerde toplanmasının diğer nedenleri ise; bir zona pelusidanın varlığı sebebiyle sanitasyon işlemlerine daha dayanıklı olmaları ve hızlı veya yavaş dondurma işlemlerinin sadece compact morula ve blastosist aşamalarında yapılabiliyor olmasıdır (Kanagawa ve ark 1995).

Koyunlar genel olarak hareketli veya yarı hareketli operasyon masalarında baş aşağı eğimli pozisyon verilerek sabitlenip, abdomen traşlandıktan ve dezenfeksyionu sağlandıktan sonra ventral orta hattan laparotomi ile girilip ve uterus açığa çıkarılır. Süperovule olduğu belirlenen yani her iki ovaryumunda üçten fazla luteal yapı bulunan koyunlarda uterusa 3-5 mm çapında küt bir ensizyonla foley kateteri (8Fr/Ch, 5 ml) ile her bir cornuya girilmekte cornuya girilerek diğer ucundan Tom Cat kateteri (3,5 Fr) oviduktun anterior ampulla bölgesine konur ve buradan flushing yapılır. Bazı koyunlarda 23G'lik 20 ml enjektörle 45 ml (37 ºC) 45 ml medyumla utero-tubal birleşme yerinde yıkama yapılır ve (60x15) petrilere uterus sıvısı alınır ve embriyolar stereo mikroskopta aranmaya başlanır. Yıkama amacı ile farklı osmolaritedeki farklı ticari ve laboratuvarda hazırlanmış basit yıkama vasatları kullanılabilmektedir. Bunlardan en sık kullanılanı laktatlı ringer solüsyonu içerisine %1 Bovine Serum Albumine (BSA) olmakla birlikte, modifiye Dulbecco's PBS ve Uterus ve ovaryumlar abdominal kaviteye geri bırakılmadan önce serum fizyolojik solüsyonuyla yıkanırarakkan ve fibrin ortadan kaldırılır. Abdominal kaviteyi kapatırken 3.5/0 metrik krome katgüt kullanılır. Subkutan dokularda yine krome katgüt ile ve deri 3 numara ipek ile dikilir. Operasyon sonrası ise profilaktik amaçla20 mg/ml prokain penisilin im olarak verilir (Wiwie ve Summers 1999).

### 1.12.2. Cerrahi Olmayan Yöntemle Embriyo Toplama

Cerrahi olmayan yöntem sığır ve atlar için geliştirilmiş olup, cerrahi yönteme yakın embriyo sayıları elde edilebilmektedir. Bu metotta flushing sıvısının uterusa geçmesine ve tekrar toplama kabına alınmasına olanak sağlayan, 18'den 24 numaraya kadar olan Fransız foley kataterleri (2-3 yönlü akışkan katater) kullanılmaktadır. Kataterin önündeki balon cornuların hemen girişinde şişirilerek sıvının geri kaçışı engellenmektedir. Foley kataterleri tohumlama kataterlerine göre daha kalındır, dolayısıyla ilk uygulamalarda cerviksi geçmek zor olabilmektedir (Peregrino 2000). Bu nedenle cerviksi rahat geçebilmek amacıyla iki farklı çapta cerviks genişleticiler (cerviks ekspander) uygulamadan önce kullanılmaktadır (Seidel ve Seidel 1991).

Bunların yanında koyunlarda cerviksin anatomik yapısı nedeniyle sığırlarda ve atlarda uygulanan cerrahi olmayan yönteme alternatif olarak yarı cerrahi, laparoskopik teknik geliştirilmiştir. Bu teknik McKelvey ve ark (1986) tarafından

koyunlarda; Valley ve ark (1987) tarafından keçilerde geliştirilmiştir. Araştırıcılara göre bu yöntemde trokar yardımıyla abdominal duvarda üç delik açılmakta ve laparoskopi cihazı ilk delikteniçeri sokulmaktadır. Üç yollu prob (PBS vermek, geri almak ve balonu şişirmek için) ikinci delkiktenabdomene sokulmakta ve üçüncü delikten ise non travmaktik klemp sokulmaktadır. Bu klemp uterusa manipulasyonları kolaylaştırmakta ve ayrıca PBS akışı esnasında utero-tubal birleşme yerini sabitlemektedir.

Anestezi amacıyla farklı preparatlar ve kombinasyonlar kullanılabilmektedir. Bazı çalışmalarda koyunlara Pentobarbitol Sodium (Nembutal®) her 2 kg'ye 1,0 ml iv olarak verilip anesteziye alınırken yapılan başka bir çalışmada 0,22 mg/kg iv Xylazine ile sedasyon sağlandıktan sonra operasyon hattına 10 ml %2'lik lidokain ile lokal anestezi uygulanmıştır (Azawi ve Al-Mola 2011).

### 1.13. Toplanan Embriyoların Değerlendirilmesi ve Sınıflandırılması

Embriyoların değerlendirilmesi 10X ve 40X büyütmede morfolojik görünüşlerine göre yapılmaktadır. Embriyo farklı açılardan gözlenebilmesi amacıyla mikropipet veya ince pipet yardımıyla hareket ettirilmektedir. Hücreler net olmalı, opak ve düzgün bir stoplazmaya ve yüzeye sahip olmalıdır. Aksi takdirde embriyo dejenere olarak kabul edilmektedir. Bazı embriyolarda perivitellin boşlukta ayrılmalar gözlenebilir ancak kalan kısmında üniform bir hücre dokusu mevcutsa bu önemsiz sayılabilir (Gibbons ve Cueto 2011).

Toplanan embriyolar kalitelerine ve taşıyıcıda yaşama şanslarına göre değerlendirilir ve sınıflandırılır. Değerlendirmede göz önüne alınan bazı kriterler aşağıdaki şekilde sıralanmıştır;

- Embriyonun şekil olarak düzenliliği
- Blastomerlerin bütünlüğü veya kompaktlığı
- Hücre boyutundaki değişiklikler
- Stoplazmanın rengi ve yapısı
- Embriyonun çapı
- Çekilen hücrelerin varlığı
- Zona pelusidanın düzeni

- Stoplazmada veziküllerin varlığı olarak sınıflandırılmaktadır (Selk 2002).

Wright (1998)'e göre embriyolar değerlendirilirken en önemli kriterler;

- Embriyonun gelişme aşaması
- Dejenere olan bölge miktarıdır.

Embriyolar belirtilen subjektif kriterlere göre kalite derecelerine ayrıldığında;

- Derece (Grade) 1: Mükemmel veya İyi
- Derece (Grade) 2: Normal
- Derece (Grade) 3: Zayıf
- Derece (Grade) 4: Ölü veya Dejenere olarak sınıflandırılır.

Embriyolar ayrıca kalitelerine bakılmaksızın, gelişme aşamasına göre de değerlendirilebilmektedir. Buna göre;

- No 1: Fertilize olmamış (Fertilize olmayand oocyte-UFO)
- No 2: 2-12 hücreli
- No 3: Erken Morula (EM)
- No 4: Morula (M) – Compact Morula (CM)
- No 5: Erken Blastosist (EB)
- No 6: Blastosist (B)
- No 7: Genişlemiş Blastosist (Exp Bl)
- No 8: Hatch olmuş Blastosist (Hed Bl)
- No 9: Genişlemiş hatch olmuş blastosist'tir. (Exp Hed Bl) (Wright 1998).

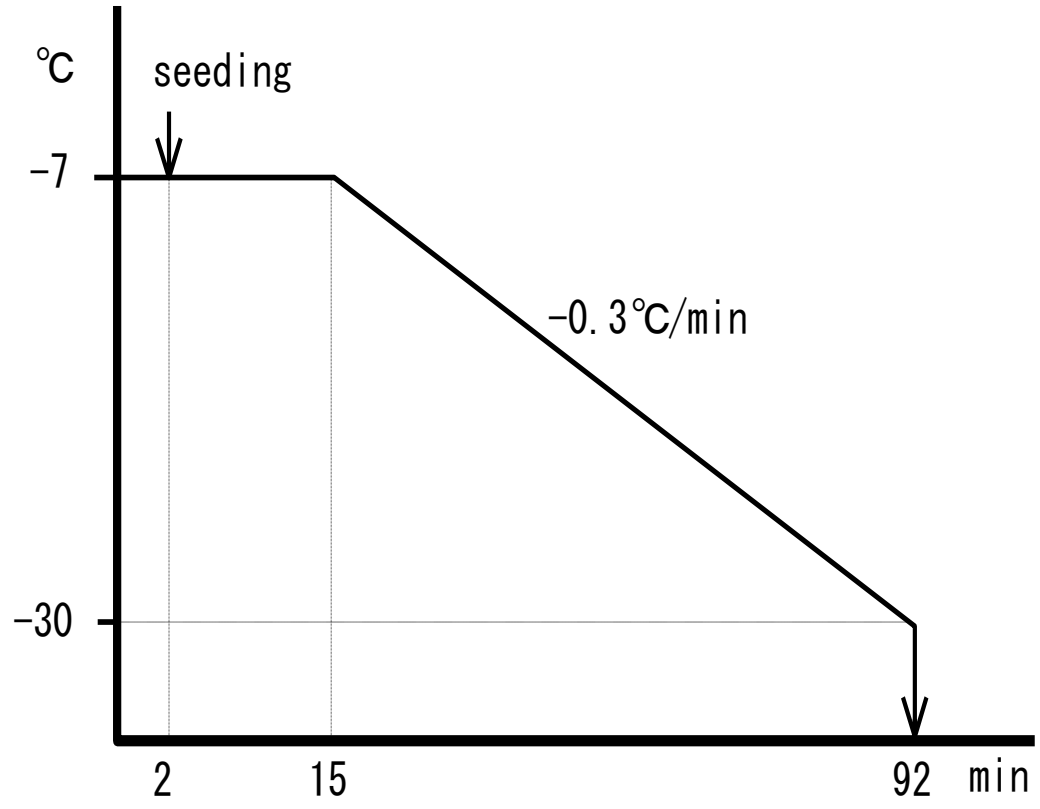
Gebelik oranları açısından gelişme derecelerinin önemli bir farkı yoktur. No 4, 5, 6'da olan embriyolar dondurma ve çözdürme işlemlerine karşı daha dayanıklıdır. Derece (Grade) 1 embriyolar ilk başta dondurulması gereken embriyolar olarak tanımlanırken, Derece 2 (Code) embriyolar dondurulabilir ve çözdürülebilir kabul edilebilir. Bununla birlikte embriyo kalitesi azaldıkça gebeik oranları da tipik olarak azalmaktadır (Selk 2002).

## 1.14. Embriyo Dondurma

Dondurulmuş embriyolar, hemen hemen taze embriyoların canlılık oranına yakın oranda embriyo veriminin artırılması ile ticari embriyo transferinde yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmuştur. Memelilerde embriyonun dondurulmuş olarak saklanması, reprodüksiyonun kontrolü için kullanılan yardımcı üreme tekniklerinin önemli bir parçasıdır. Memeli embriyosunun dondurulmuş olarak saklanmasında doğal olarak başlıca hedef, dondurma işleminden sonra çözdürülmüş embriyonun in vitro koşullarda canlılık oranını geliştirebilme yönündedir. Bu amaçla araştırmalar, ilk olarak dondurulmuş olarak saklama tekniğinin neden olduğu olumsuz koşullara daha iyi direnç göstermesi için embriyonun bulunduğu ortamı düzeltmek üzere in vitro kültür sistemlerini modifiye etmeye ve in vitro elde edilen embriyolara adapte edebilecek spesifik aşırı düşük sıcaklıklarda saklama (cryopreservation) yönteminin bulunması üzerine odaklanmıştır (Kanagawa ve ark 1995).

Bugüne kadar geliştirilmiş donmuş olarak saklama yöntemlerinden biri geleneksel yavaş dondurma, diğeri ise vitrifikasyondur. Her iki yöntemde de amaç embriyo içerisinde bulunan suyun büyük bir kısmının hücre dışına alınması ve daha sonra dondurulmasıdır. Vitrifikasyonda hücre dışına alınan suyun miktarı çok daha fazladır. Geleneksel yavaş dondurma tekniğinde, embriyolar daha az konsantrasyonda cryoprotektan ile programlanabilir cihazlarda yavaş prosedürle dondurulur. Bu ilk çalışmalarda sığır embriyolarına programlanabilir dondurma cihazında -80°C'a kadar, daha sonraları -25-35°C arasındaki sıcaklıklarda yavaş dondurma ya da -7°C'den -30 °C'ye veya -35°C'ye, 0,3°C/dk veya 0,5°C/dk gibi soğutma oranları uygulanmakta idi. Cryoprotektan solusyonu olarak önceleri 1,5 M ve 2,0 M dimetilsülfoksit (DMSO) veya 1,36 M gliserol kullanılırken, sonraları embriyoların dondurulması için gliserol-sükroz kombinasyonları ile soğutma işleminden önce ortalama 10-15 dk'da dehidrasyon gerçekleştirilerek, -7,5°C'da kristalleşme başlatılarak (seeding) donma sıcaklığına ulaşmış solusyonlarda, embriyodaki soğuk şoku hasarını azaltmak için spontan olarak kristalizasyon şekillenmeden, -5-(-7)°C sıcaklıklar arasında manipüle edilerek indüklenmesi ve kristalizasyonun kontrol altına alınması hedeflenmiştir. Böylece numuneler arasındaki donma varyasyonları azaltılmakta, ekstrasellüler ortama hücre içinden sıvı geçişi için yeterli zaman sağlanmaktadır. Seeding, geleneksel yöntemle dondurma çözdürme sonrası embriyo canlılığı için gereklidir ve bu sıcaklıkların (-5, -7,5°C)

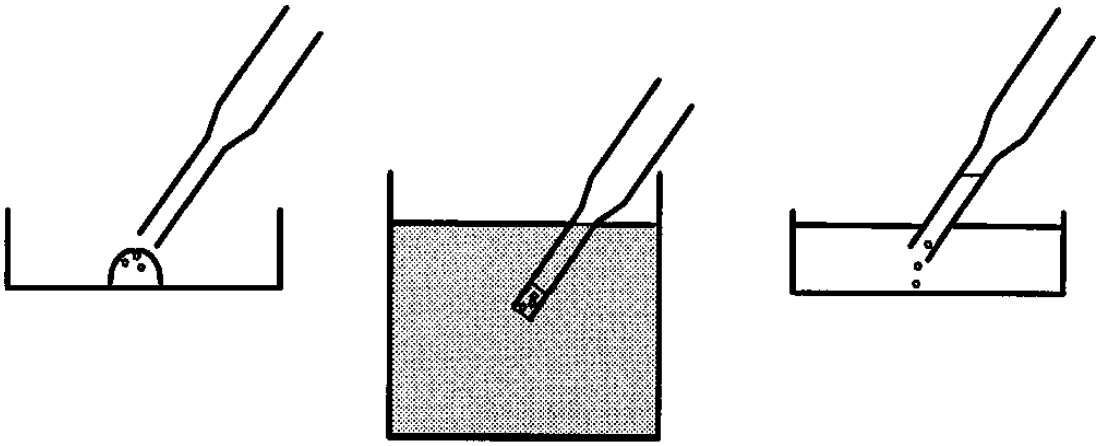
çok dikkatli geçilmesi gerekmektedir. Geleneksel yöntemde embriyoların çözdürülmesi için ise havada 5-10 saniye, sonra 25-28°C'deki su banyosunda 15-20 saniye tutulup embriyoların rehidrasyonu için cryoprotektan konsantrasyonu her defasında azalan solusyonlarda 15-20 dk gibi uzun sürede pasajlanması gerekmektedir. Bu yöntemde uzun süre cryoprotektanların toksik etkisine maruz kalınmakta ve dondurma sırasında seeding oluşumu nedeniyle intrasellüler buz kristalizasyonu oluşumundan dolayı zona pelucida da kırılma, hücre membranı ve hücre iskeletinde bozulmalar ve metabolik bozukluklar meydana gelmektedir (Massip 2001). Nitekim yavaş dondurmanın grafiksel gösterimi Şekil 1.14.1' de şematize edilmeye çalışılmıştır.




**Şekil 1.2.** Yavaş dondurmada dondurmanın aşamaları (Kanagawa ve ark 1995).

Embriyolar vitrifikasyon ile dondurulduğunda, kristal formasyonunun oluşumu ve oluşacak hasar yüksek konsantrasyondaki criyoprotektan tarafından hızlı donma ve ısınmaya karşı engellenmektedir. Sıcaklık değişimlerinin yüksek ivmesi

iki avantajı beraberinde getirmektedir; azalan criyoprotektan konsantrasyonu düşük ozmotik ve düşük toksik etkiye neden olmaktadır, hızlı pasaja bağlı olarak tehlikeli sıcaklık değerlerinde daha az donma hasarı meydana gelmektedir. Her ne kadar çoğu dondurma metodu standard Fransız mini payetlerde yapılsa da bu payetler maksimum dondurma ve çözdürme oranlarını azaltmaktadır. Alternatif metodlar embriyo kültürü ve likit nitrojen ile direkt temasa izin vermekte böylece dondurma ve çözdürme oranlarını artırmaktadır. Ayrıca elektron mikroskobik ızgaralarla da dondurma ve çözdürme işlemi uygulanabilmektedir. Memeli embriyolarının dondurulması her ne kadar rutin prosedure kavuşturulmuş olsa da gelişim aşamasına, tür ve ırkına göre bağlı olarak da önemli oranlarda değişebilmektedir. Bu farklılıklar kriyoprotektanın penetrasyonunu etkileyen lipid damlacıklarına ve farklı mikrotubuler yapıya ve buna bağlı hacim yüzey alanı oranına bağlı olabilmektedir. Yeni bir yaklaşım olan "*Open pulled straw-açık uçlu payet domdurma*" (OPS) metodunda çok hızlı soğutma ve ısıtma (20 °C/dk) oranlarına ve daha kısa süre (30 sn, -180 °C'nin altına kadar) kriyoprotektana maruz bırakılarak dondurmanın olası zararlı etkilerini, toksik ve osmotik hasarı azaltmaktadır (Vajta ve ark 1997).




**Şekil 1.3.** Açık uçlu payet dondurma (OPS) metodu (Vatja ve ark 1997).

OPS metoduna (Şekil 1.14.2.) göre, (**a**) Oosit veya embriyolar kapillar etki için droplardan payetlerin dar kısmına alınır. (**b**) Soğutma işlemi direkt likit nitrojene daldırma ile gerçekleştirlmektedir. (**c**) Çözdürme sırasında da payetler medyuma batırılır, yine kapillar etki ile vitrifikasyon medyumu sıvılaşır ve taşıma

medyumunda çözdürülür. Sonuç olarak embriyo veya oositler kültür kabı içindeki kültür medyumu içine akar (Vajta ve ark 1997).

### 1.15. Koyunlarda Embriyo Transferi

Uterus yıkama sonrası toplanan embriyolar taze olarak transfer edilecekse koruyuculuğu da olan yıkama medyumu içerisinde iki saatten uzun tutulmadan alıcı koyunlara transfer edilmelidir. Dondurulan embriyolar için ise çözdürme transfer arasındaki süre 20-30 dk'dan uzun olmamalıdır. Embriyo transferi genellikle Cl'nin olduğu taraftaki cornu uteriye yapılmalıdır. Transfer prosedürü genelllikle iki alternatif protokolle olmaktadır. Bunlardan biri cerrahi ve cerrahi olmayan laparoskopik yöntemdir. İkisinde de delikdorsal cornu uterinin dorsal üst üçte birlik kısmına yapılmakta ve 10 µl'lik PBS içeren mikropipet içindeki embriyonun transferi ile tamamlanmaktadır. Alıcı ve vericinin senkronizasyonu arasındaki tolerans ± 1 gündür. Alıcı ve vericinin östrusları ne kadar iyi senkronize olursa embriyo transferinin başarısı da o oranda artmaktadır (Kanagawa ve ark 1995).

Mevsimsel üreme özelliğine sahip koyunlarda çoğunlukla planlı bir besleme programı yapılmayıp rasyon içeriğine fazla önem verilmemektedir. Genellikle üreme sezonuna girmeden önce rasyonda değişim yapılarak koyunlar yoğun bir beslemeye (flushing) alınmaktadır. Ancak koyun rasyonundaki ham protein oranı ve bunun döl verimine etkisi üzerinde sınırlı sayıda araştırma yapılmış olup detaylı bilgilere rastlanılmamaktadır. Şu anda ticari olarak satılan koyun yemlerindeki protein oranı çoğunlukla %15'dir. Dolayısıyla rutin besleme yanında geleneksel olarak yapılan flushing sürecindeki koyunlarda beslenme-döl verimi ilişkisinin belirlenmesi ile koyunlardaki muhtemel döl verimi kayıpları ve bunun boyutları ortaya konulabilecektir.

Sunulan tez çalışmasında amaç farklı ham protein düzeyinde konsantre yemlerle seksüel sezona girerken ek beslemenin (flushing), BUN, süperovulasyon, fertilizasyon, embriyo verimi ve embriyo kaliteleri üzerine etkisini araştırmaktır. Ayrıca çalışmada uterus yıkama öncesinde, uterus pH' sı ve sıcaklığı da ölçülerek, protein seviyesinin uterus iyonik ortamı, fizyolojisi ve dolayısı ile süperovulasyon ve embriyo kalitesi üzerine etkisi araştırılmaya çalışılmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19.10.2009 tarih ve 10102021 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 30.09.2009 tarih ve 2009/16 sayı numarası ile onaylanmıştır.

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Hayvan Materyali ve Seçimi

Çalışmada**,** coğrafi olarak, 36º, 041' ve 39º, 016' kuzey enlemleri ile 31º, 014' ve 34º, 026' doğu boylamları arasında yer alan ve yıllık ortalama sıcaklığın 23ºC olduğu Konya ili "*Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği*"nde, (SÜVF-AUÇ) "*TÜRKHAYGEN 1 Projesi*" (Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının In Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-I) kapsamında bulunan ve fenotipik olarak saf olduğu belirlenen Akkaraman, Norduz, İvesi, Dağlıç ve Herik ırkı yerli koyunları üzerinde yapıldı.

Çalışma 2010 yılı Temmuz ayı ile 2011 yılı Ocak ayı arasında yapıldı ve önceki senelerde TÜRKHAYGEN 1 kapsamında daha önce süperovulasyon programına alınan koyunlar çalışmaya alınmadı. Araştırmada her bir ırktan birbirine yakın sayılarda, ortalama üç yaşlarında olan 63 baş koyun kullanıldı ve bu koyunlar 21 koyundan oluşan rastgele üç gruba bölündü. Çalışmada kullanılan koyunlar öncelikle sistemik klinik muayeneden geçirildi. Şüpheli görülenlere ayrıntılı olarak, paraklinik muayeneler uygulandı ve herhangi bir problemi olmayan hayvanlar seçildi.

Araştırmada kullanılan koyunlar senkronizasyon başlangıcından en az 15 gün öncesinden başlanarak besleme programına alındı ve senkronizasyon, süperstimülasyon, östrus süreci, doğal aşım ve embriyo toplama (doğal aşımın yedinci günü) gününe kadar besleme programına devam edildi.

#### 2.1.2 Bakım Besleme Şartları ve Barınaklar

Çalışma, SÜVF-AUÇ koyun ağılının bakım besleme şartlarında yapıldı. Çiftlikte koyunların tırnak bakımı, kırkım ve diğer günlük bakım ve beslemesini

üstlenen iki işçi; aşılama ve paraziter mücadele gibi sağlık işlemlerini üstlenmiş bir sorumlu veteriner hekimi bulunmakta idi. Koyunlar yazları üstten sundurmalı yarı açık padoklarda, kışın ise kapalı ve tahta ızgaralı bölmeler şeklinde olan ağılda barındırıldı.

### 2.1.3. Yem Materyali

Araştırmada gruplara ayrılan koyunların beslenmeleri amacıyla %12, % 15 ve %18 ham protein içeren, rasyon enerji düzeyleri aynı olan, özel bir yem fabrikasına yaptırılan konsantre pelet yem kullanıldı (Çizelge 2.1.3.1.). Koyunların kaba yem ihtiyacını karşılamak amacıyla aynı yöreden alınan ve aynı vejetasyonda ekimi yapılan kuru yonca otu kullanıldı. Su ihtiyaçları da her gün değiştirilen ve ilave yapılan suluklarla "*ad-libitum*" olarak karşılandı.

**Çizelge 2.1.** Koyunlara verilen konsantre yemlerin bileşimleri.

| **Yem maddesi** | **Rasyondaki ham protein oranı (%)** | | |
|---|---|---|---|
| | %12 (Grup 1) | %15 (Grup 2) | %18 (Grup 3) |
| | İçerik oranı (g/kg) | İçerik oranı (g/kg) | İçerik oranı (g/kg) |
| **Kepek** | 300 | 382 | 280 |
| **Buğday** | 220 | 130 | 100 |
| **Mısır** | 178 | 144 | 124 |
| **Arpa** | 150 | 97 | 67 |
| **ATK*** | 60 | 120 | 120 |
| **Pamuk Küspesi** | 45 | 85 | 100 |
| **Mermer Tozu** | 40 | 35 | 30 |
| **Tuz** | 5 | 5 | 5 |
| **Premiks** | 1 | 1 | 1 |
| **Maya** | 1 | 1 | 1 |
| **DDGS**** | 0 | 0 | 170 |
| **Baypas-yağ** | 0 | 0 | 2 |
| **Toplam** | 1000 | 1000 | 1000 |

*Ayçiçeği tohumu küspesi

** Dried distiller grains with solubles: işlenmiş artık küspe

## 2.2. Yöntem

Çalışmada kullanılan koyunlar, vücut kondüsyon skorları ve ırkları göz önüne alınarak rastgele eşit üç gruba ayrıldı. Gruplar oluşturulurken çalışma sonuçlarının ırk, vücut kondüsyonu gibi parametrelerden etkilenmemesi amacıyla her ırktan her gruba birbirine yakın sayılarda ve ırk içerisinde vücut kondüsyon skoru birbirine yakın koyunlar seçildi. Koyunlar seksüel sezondan yaklaşık 15 gün öncesinden başlanarak (Hand 2011) farklı oranlarda ham protein içeriğine sahip (%12, %15 ve %18) konsantre yem ve ad-libitum yonca kaba yemi ile uygun besleme flushing programına alındı. Beslenme programının en az 15. gününden itibaren koyunlara östrus senkronizasyonu amacıyla 20 mg FGA içeren (Chronogest CR®, Intervet Productions SA., Fransa) beyaz renkli, süngerler vagina içerisinde 12 gün süre için bırakıldı ve senkronizasyon sonlarına doğru pFSH (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Canada) ile bir süperovulasyon programına başlandı. Süngerlerin çıkarılmasından sonra östrus gösteren koyunlar fertil oldukları bilinen aynı ırk koçlarla 12 saat arayla iki ya da üç kez çiftleştirildi. Östrus sonrası yedinci günde cerrahi yöntemle cornulardan embriyolar uterus yıkama ile toplandı ve kalitelerine göre derecelendirildi.

### 2.2.1. Koyunların Bakımı ve Beslenmesi

Çalışmanın yapıldığı SÜVF-AUÇ'de koyunlar yaz aylarında ve çalışmanın yapıldığı seksüel sezonda üstü kapalı sundurmalı ve altı toprak olan yarı açık ağıllarda barındırılıp, altlıkları günlük olarak bakıcılar tarafından temizlenerek bakım ve beslemeleri yapıldı.

Çalışma materyalini oluşturan tüm koyunlar, özellikle konsantre yeme adaptasyonunu ve takibini sağlamak amacıyla oluşturulan gruba göre çalışma öncesi üç gün süreyle ayrıntıları aşağıda sunulan ve tam yemleme olarak adlandırılan normal çalışma miktarının 1/10, 1/5 ve 1/2'si düzeylerinde beslemeye alınarak konsantre yeme alıştırıldı. Alıştırma periyodu boyunca ve sonunda herhangi bir sindirim problemi ile karşılaşılmadığından dördüncü gün çalışmaya tam yemleme ile başlandı.

Araştırmada kullanılan koyunlar enerji ve diğer bileşenleri değişmeden sadece protein oranları %12, %15 ve %18 olacak şekilde hazırlanan konsantre

yemlerle sekronizasyondan en az 15 gün öncesinden başlanarak uterus yıkamaya kadar en az 36 gün boyunca beslendi. Konsantre yeme ilave olarak koyunların beslenmesi için ham protein içeriği %14 ve kuru maddesi %92.75 olan kuru yonca otu kullanıldı.

Çalışma amacıyla üç gruba ayrılan koyunlara grup beslemesi uygulandı. Gruplara, ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde I. gruptaki koyunlara %12 ham proteinli, II. gruptaki koyunlara %15 ham proteinli ve III. gruptaki koyunlara ise %18 ham proteinli, hayvan başına 700 g/gün olacak şekilde ve her bir gruba, konsantre yem ilavesi ile beslenmeye alındı. Ayrıca ham protein içeriği %14 olan kuru yoncadan da adlibitum ya da en az 1 kg/hayvan/gün olacak şekilde beslemeye kaba yem ilavesi de yapıldı. Beslemeler sabah saat 07.00'de araştırmacının bizzat kendisi tarafından veya kimi zaman gözetiminde yapılarak, gün içerisinde kaba yem ve su ilavesi gerektiğinde bakıcılar tarafından sağlandı.

### 2.2.2. Östrus Senkronizasyonu

Çalışma gruplarına ait koyunlar çalışmanın yapıldığı İç Anadolu Bölgesi için Ağustos ayı olan seksüel sezon içerisinde sikluslarının dönemlerine bakılmaksızın senkronize edilmeye başlandı. Bu amaçla beyaz renkli, 40x30 mm ebatındaki 20 mg FGA içeren silindirik poliüretan süngerler (Chronogest CR®) intravaginal olarak uygulandı ve 12 gün süre tutulması suretiyle (Bettencourt ve ark 2008, Mayorga ve ark 2011) Çizelge 2.2.2.1'deki tabloda belirtildiği gibi bir programa tabi tutuldu. Süngerler vaginaya yardımcı aparat ile yerleştirilmeden önce dış genital organlar seyreltik dezenfektanlı suya batırılmış bir sünger yardımıyla iatrojenik kontaminasyonun önüne geçmek amacıyla dezenfekte edildi.

**Çizelge 2.2.**Senkronizasyon protokolü.

| **Senkronizasyon** | **0. gün** | **9. gün** | **12. gün** | **13-14. gün** |
|---|---|---|---|---|
| Sabah | Sünger takılması | $PGF_{2\alpha}$ (150 µg tiaprost trometamol) | Süngerin çıkarılması | Çiftleştirme |
| Akşam | | | | Çiftleştirme |

### 2.2.3. Süperstimülasyon Uygulaması

Süperstimülasyon uygulaması amacıyla Çizelge 2.2.3.1'de de belirtildiği üzere, günde iki kez sabah 07:00 ve akşam 17:00'de yaklaşık 10 saat ara ile süngerin çıkarılmasından üç gün öncesinden başlanarak dört gün boyunca (200 mg) azalan dozlarda (30 mg, 30 mg, 30 mg, 25 mg, 25 mg, 20 mg, 20 mg, 20 mg) 8 uygulama (Mayorga ve ark 2011) ile domuz FSH'sı-pFSH (FolltropinV®; Bioniche Life Sciences Inc., Canada) kullanıldı. Mevcut CL'leri lize etmek ve siklusu başlatmak amacıyla FSH sağaltımının ilk günü sabahı veya süngerin çıkarılmasından 48 saat önce 2 ml intra muskuler $PGF_{2\alpha}$ analoğu, tiaprost trometamol (Iliren®, Intervet) uygulandı. Süperovulasyon sağaltımının dördüncü günü sabahı senkronizasyon sağlamak için kullanılan intravaginal süngerler çıkarıldıktan sonra ve ertesi gün koç yanına getirildiğinde östrus belirlenen koyunlar elde sıfatyöntemi ile çiftleştirildi.

**Çizelge 2.3.** Süperstimülasyon protokolü.

| | **SABAH (07.00)** | **AKŞAM (17.00)** |
|---|---|---|
| 1. Gün | 30 mg pFSH + 150 µg $PGF_{2\alpha}$ | 30 mg pFSH |
| 2. Gün | 30 mg pFSH | 25 mg pFSH |
| 3. Gün | 25 mg pFSH | 20 mg pFSH |
| 4. Gün | 20 mg pFSH + Sünger çıkar | 20 mg pFSH |
| 5. Gün | Çiftleştirme | Çiftleştirme |
| 6. Gün | Çiftleştirme | Çiftleştirme |

### 2.2.4. Östrus Gözlemi

Çalışmaya alınan koyunlar senkronizasyon protokolleri tamamlandıktan ve süngerler çıkarıldıktan 24 saat sonrasından itibaren sabah ve akşam bir saat gözlem altında tutuldu. Koçun yanına konan ve atlama, üzerine atlanılmasına izin verme ve aşıma izin verme gibi fiziksel östrus davranışlarına göre koyunların östrusta olup olmadıkları değerlendirildi. Östrusları belirlemek amacıyla koyunlar, süngerin çıkarılmasından 24 saat sonrasından başlanarak günde iki kez aynı ırktan olan ve fertilitesi kanıtlanmış koçla yan yana birebir eşleme ile taşınabilir bölmelere kondu ve stres etkisini minimuma indirmek amacıyla uygun mesafeden gözleme başlandı. Koyunlar östrusun fiziksel belirtilerinin olup olmamasına göre en az iki kez uygun

aşım, gözlemci tarafından onaylanana kadar belirli zamanlarda koç yanında tutuldu. Aşımı kabul eden ve çiftleşen koyunlar sonraki günün akşamına kadar aynı koç ile belirli zamanlarda çiftleştirilmeye devam edildi. Aşımı kabul etmeyen koyunlarda ise aynı günün akşamı, ertesi sabah ve ertesi günün akşamı aşımı kabul edene ya da östrusa gözlenene kadar koç katarak gözleme devam edildi ve 48 saatin sonunda östrus göstermeyen koyunlar için bu süre bir gün daha uzatıldı. 72 saat sonunda östrus göstermeyen koyunlar bulundukları senkronizasyon grubunda çalışmadan en az iki ay süreyle çıkarıldı.

### 2.2.5. Koyunların Çiftleştirilmesi

Östrus gösteren koyunlar yine aynı *TÜRKHAYGEN 1* projesi kapsamında SÜVF Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı tarafından fertilitesi kontrol edilmiş koçlar ile birebir doğal aşıma bırakıldı. Tüm koyunlar sünger çıkarıldıktan 24 saat sonrasından (Mayorga ve ark 2011) itibaren kontrol edilmek üzere östrus gününden başlamak üzere sabah 08.00'de, öğleden sonra 17.00'de ve ertesi sabah yine 08.00'de olmak üzere üç kez aynı koçlarla elde sıfata tabi tutulmuş ve her defasında doğru aşımı yakalamak amacıyla yüklenme sonrası vaginada ejakulat görüldükten sonra en az iki kez çiftleştirilmeye devam edildi. Östrusta olduğu bilinen, ancak koçun libidosunun yetersiz olduğu durumlarda ise eğer hiç fertil aşım gözlenmediyse libidosu daha yüksek başka bir koçla çiftleştirildi.

### 2.2.6. Uterus Yıkama ve Embriyoların Toplanması

Uterus yıkaması yapılarak embriyoları toplanacak koyunlar, yaklaşık 24 saat öncesinden operasyona alınacakları kliniğin hospitalizasyon bölmelerinde, dolu sindirim sisteminin operasyon esnası kontraendikasyonlarından korunmak amacıyla aç bırakılarak bekletildi. Uterus yıkamaları ilk aşım sonrası yedinci günü sabahı (Bettencourt ve ark 2008) SÜVF Doğum ve Jinekoloji Ana Bilim Dalı Kliniği operasyon salonunda gerçekleştirildi. Anestezik dozlaması amacıyla tüm koyunlar operasyon öncesi tartıldı. Yine operasyon öncesi abdominal inguinal bölge traş edilerek temizlendi. Operasyon bölgesi kıllardan temizlenen koyunlar, 0,22 mg/kg Xylazine (Rompun® %2, Bayer Healthcare AG, Germany) ile sedasyona alındı. Yaklaşık 15 dk sonra 2 mg/kg dozda Ketamin HCl (Ketasol® %10, Richter Pharma, Austria) ile genel anesteziye alındı. Yaklaşık 15 dk sonra anesteziye giren koyunlar

operasyon masasına alınıp ayaklar bağlanarak sırt üstü yatırıldı. Operasyon sahasının asepsisi önce alkol daha sonra povidon iyot (Betadin) ile sağlandı.

Operasyon memelerin yaklaşık 3 cm önünden başlanarak linea albadan yaklaşık 8 cm'lik bir median ensizyonla, deri, deri altı ve kas katmanları geçildi. Peritona ulaşılarak ve periton düzgün bir şekilde kesilerek barsakların altında farklı kıvam ve sertlikteki cornu uteriler yukarı doğru dikkatlice çekilerek ovaryumlara ulaşılmaya çalışılarak yapıldı. Ovaryumlar ve cornu uteriler dışarıyla alındıktan sonra ovaryum üzerindeki yapılar sayılıp kayda alındı. Cornuların bifurkasyon bölgesinin hemen önünden 8 ve 10 numara (cornuların büyüklüğüne göre) foley kateteri ile girildi ve Foley kateteri uygun konumda yerleştirildikten sonra cornuların ovaryum ucundan utero-tubal birleşim yeri civarında 18G'lik yeşil iv (intravenöz) kanül yardımı ile girilerek stilesi çıkarıldıktan sonra, buradan daha önceden hazırlanmış olan ve 37,5 ºC'deki su banyosunda bekletilen yıkama sıvısı (%1 FCS ilave edilmiş TCM199) 20 ml'lik enjektörlerle her bir cornuya verildi (Quan ve ark 2011). Her bir cornu iki kez, yani 40 ml sıvı ile yıkandıktan sonra 20 ml hava verilerek cornulardaki tüm sıvı geri alınmaya çalışıldı. Verilen yıkama sıvısı cornulara yumuşak bir masajla Foley kateteri yardımıyla geri alındı. Alınan sıvı içerisinde embriyolar olduğundan ve embriyoların ısı şokuna uğramalarına engel olmak amacıyla yıkama sıvısı tekrar 37,5 ºC'deki su banyosuna kondu, ve takriben 30-45 dk'lık bir bekleme periyodu sonrası dibe çöken embriyolar mikroskop altında arandıktan sonra Kanagawa ve ark.'nın (1995) belirttiği şekilde değerlendirilmeye alındı.

### 2.2.7. Kan Örneklerinin Toplanması

Kan örnekleri her bir koyundan sabah saatlerinde herhangi bir uygulama yapılmadan önce alındı. Koyunlara kan alınmadan önce yem ve taze su verilmedi. Kan alımları yemleme öncesi yapılarak oluşabilecek stres de minimuma indirildi. Kanlar sol vena jugularisten sarı kapaklı jelli kan tüplerine alındı. Tüpler 3000 devirde beş dk santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Santrifüj sonrası üst kısımda kalan serum ependorf pipetleri yardımıyla 1,5 ml'lik ependorf pipetlere aktarıldı ve kan üre nitrojen (BUN) analizi yapılmak üzere -20 ºC'de derin dondurucuda saklandı. Tüm gruplarda BUN değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla, besleme programının başlangıcında (BUN 1), senkronizasyonun başlangıcında (BUN 2),

süperstimülasyon uygulamasının başlangıcında (BUN 3), östrus başlangıcında (BUN 4), aşım günü (BUN 5) ve embriyo toplama (BUN 6) günlerinde alınan kanlardan SÜVF Merkez Laboratuvarında ölçümler yapıldı.

### 2.2.8. Uterus pH'sının ve Sıcaklığının Ölçülmesi

Östrus sonrası yedinci günü sabahında embriyo toplama amacıyla operasyona alınan koyunların uterus pH'sı ve sıcaklığı karın boşluğu açıldıktan ve uterus çıkarıldıktan sonra uterusa yıkama için açılan delikten otomatik sıcaklık kompanzasyon özellikli Testo 205® (AG Germany) marka pH ve sıcaklık ölçüm cihazı ile ölçüldü ve kaydedildi. Her ölçüm sonrası pH metre sabunlu su ile temizlendi, kağıt havlu ile kurutuldu ve bir sonraki ölçüm için hazır hale getirildi. O gün içinde yapılan ölçümler sonrasında pH ölçüm cihazı temizlenip kurutulduktan sonra kendi kalibrasyon sıvıları kullanılarak kalibre edildi ve bir sonraki operasyon günü için hazır hale getirildi.

### 2.2.9. Ovaryum Fonksiyonun Değerlendirilmesi

Östrusu izleyen yedinci günde embriyo toplamak için karın boşluğu açıldığında ve uterus cornuları yavaşça ve yumuşak hareketlerle açığa çıkarıldığında ovaryumlar gözlenerek ve üzerindeki fonksiyonel (follikül ve luteal yapı) yapılar nicel olarak kaydedildi. Gruplar arasında ovaryum cevapları değerlendirilirken, ovaryum üzerindeki fonksiyonel yapılar, Cl ve 3 mm ve üzerindeki orta ve büyük follikül sayıları kaydedildi. Koyunların süperstimüle sayılabilmeleri için toplam luteal yapı ve follikül sayısının dört ve daha fazla olması göz önünde bulunduruldu. Benzer olarak süperovulasyon uygulaması sonucu ovaryumun uyarılmış kabul edilebilmesi için de her iki ovaryumda toplam minimum 4 adet ve daha fazla Cl bulunması gerektiği düşünüldü. Ovaryumlar üzerindeki yapılar karın boşluğu açılıp ovaryuma tamamen ulaşıldıktan sonra 3 mm ve üzerindeki antral folliküller ve Cl'ler sayıldı.

### 2.2.10. Fertilizasyon ve Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi

Ovaryum fonksiyonu gözlendikten sonra ve uterus pH'sı ve sıcaklığı ölçümünden sonra foley katateri ile her iki cornu ayrı ayrı yıkanarak yıkantıdan elde edilen hücreler stereo mikroskop (SXZ16, Olympus®) altında değerlendirildi.

Toplanan hücreler embriyo, boş zona pelucida ve fertilize olmamış olarak ayrıldı. Boş zona pellucida'larda fertilize olmamış oosit sayılarına eklenerek fertilizasyon oranlarına bakıldı. Fertilizasyon, toplanan fertilize embriyo sayısının, toplam Cl sayısına bölümü ile hesaplandı. Fertilize olmamış oosit (UFO) dışında kalan farklı kalitedeki embriyolar kalite ve fertilizasyon değerlendirmesi için invert mikroskopa alındı (IX3, Olympus®), IETS (International Embryo Transfer Society)'nin kalite değerlendirme kriterlerine göre kaliteleri belirlenerek, koyunların fertilizasyon kapasiteleri tanımlandı. Sonuçlar her bir koyun ve grup için ayrı ayrı değerlendirilip ölçüldü.

Embriyo toplama oranları (recovery rate) hesaplanırken de toplanan toplam embriyo ve UFO sayısının, sayılan Cl sayısına bölümü ile elde edilen oran dikkate alındı. Bununla birlikte fertilizasyon oranını belirlemek için toplam embriyo veya döllenmiş hücre sayısının toplam Cl sayısına oranı belirlendi.

### 2.2.11. Kan Üre Nitrojen (BUN) Değerlerinin Ölçümü

Kan üre analizleri SÜVF Merkez Laboratuvarında gerçekleştirildi. Ölçüm öncesi çözdürülen serum numuneleri saatte 240 ölçüm yapabilen BT-3000 Plus (Biotechnica Instruments®, Italy) otomatik klinik biyokimyasal analiz edici, filtreli fotometrik sulu sistem cihazı kullanılarak ölçüldü. Her bir koyun ve her bir ölçüm günü için ayrı ayrı ölçülen veriler değerlendirilmek üzere kaydedildi.

### 2.2.12. İstatistiksel Analizler

Çalışmada, oluşturulan gruplardaki bireyler farklı olduğu için gruplar birbirinden bağımsızdır. Gruplar birbirinden bağımsız olduğundan ve denek sayısı her bir grup için <30 olduğundan parametrik olmayan istatistiki yöntemlerin kullanılması daha uygun görüldü. Çalışmada ölçüme dayalı elde edilecek sonuçların değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Varyans Analizi, sayısal sonuçların değerlendirilmesinde ise Ki Kare istatistiki analiz yöntemlerinden yararlanıldı. Çalışmanın H0 hipotezi; her istatistiki ölçüm için "*gruplar arasındaki fark önemsizdir*" veya "*gruplar arasında istatistiki olarak fark yoktur*" ve H1 hipotezi ise "*gruplar arasında fark vardır*' veya "*gruplar arasında istatistiki fark vardır*" şeklinde kuruldu. Nitekim gruplara göre embriyo eldesi, embriyo kalitesi, Cl sayıları, UFO sayıları, BUN ölçümleri, pH ve sıcaklık ölçümleri Kruskal Wallis

Varyans Analizi ile istatistiki olarak karşılaştırıldı, süperstimülasyon oranı, süperovulasyon oranı, fertilizasyon oranı ve embriyo toplama oranları ise çok gözlü düzenlerde Ki-Kare Testi ile istatistiki olarak karşılaştırıldı. Önemlilik testlerinin anlamlılık seviyesi $p<0,05$ seviyesinde değerlendirildi. İstatistik hesaplamaları manuel olarak, microsoft office excel programı kullanılarak ve Biyoistatistik (Sümbüllüoğlu ve Sümbüllüoğlu 1997) kitabı referans alınarak yapıldı.

# 3.BULGULAR

## 3.1. Kan Üre Nitrojen Değerleri

Kan üre nitrojen (BUN) değerleri gruplar arasında, besleme programının başlatıldığı 0. gün, senkronizasyon başlangıcı 1. gün, süperovulasyon başlangıcı 2. gün, süngerin çıkarıldığı gün 3. gün, ilk çiftleşme günü 4. gün ve uterus yıkama günü 5. gün alınan kanlardan çıkarılan serumlarda karşılaştırıldığında; Çizelge 3.1'de belirtildiği üzere gruplar arasında ve günler arasında besleme başlangıcında (gün 0) (BUN1) kan üre değerleri ortalamaları grup 1'de 52,09 mg/dl, grup 2'de 57,45 mg/dl ve grup 3'de 54,09 mg/dl olarak ölçüldü. Yine 1. günde (BUN2) grup 1'de 47,71 mg/dl, grup 2'de 52,18 mg/dl ve grup 3'de 54,33 mg/dl olarak ölçüldü. Süperovulasyon uygulamasının başında yani 2. gün (BUN3) grup 1'de kan üre değerleri ortalaması 45,65 mg/dl, grup 2'de 42,27 mg/dl ve grup 3'de ise 49,66 mg/dl olarak ölçüldü. Süngerlerin çıkarıldığı gün, yani 3. gün (BUN4) grup 1'de kan üre değerleri ortalaması 45,76 mg/dl, grup 2'de 47,63 mg/dl ve grup 3'de 48,62 mg/dl olarak ölçüldü. İlk aşım günü yani 4. gün (BUN5) gruplar arasındaki kan üre değerleri dağılımı ise, grup 1'de 46,90 mg/dl, grup 2'de 49,13 ve grup 3'de 50,25 mg/dl olarak ölçüldü. Son olarak 5. gün (BUN6) yani aşımın yedinci günü ya da yıkama günü kan üre değerleri ise grup 1'de 40,28 mg/dl, grup 2'de 43,36 mg/dl ve grup 3'de 49,38 mg/dl olarak ölçüldü.

Farklı protein düzeylerinde konsantre yem ile beslenen gruplar arasındaki besleme başlangıcı, senkronizasyon öncesi ve sonrası farklı günlerde BUN değerleri Kruskal Wallis Çoklu Varyans Analizi ile istatistiki olarak karşılaştırıldığında; gruplar arasındaki farkın önemsiz olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Gruplara göre BUN değerleri; bireysel olarak Çizelge 3.1'de, Çizelge 3.2'de ve yine ortalama değerler baz alınarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

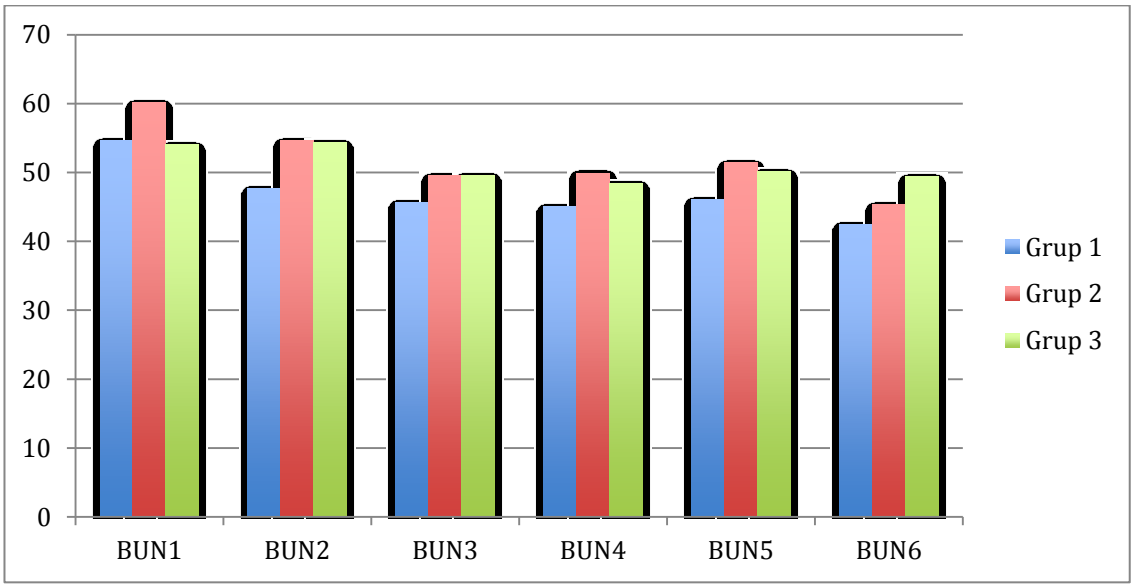
**Çizelge 3.1.** Gruplara göre BUN değerleri.

| | Grup 1 | | | | | | Grup 2 | | | | | | Grup 3 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Denek** | **BUN1** | **BUN2** | **BUN3** | **BUN4** | **BUN5** | **BUN6** | **BUN1** | **BUN2** | **BUN3** | **BUN4** | **BUN5** | **BUN6** | **BUN1** | **BUN2** | **BUN3** | **BUN4** | **BUN5** | **BUN6** |
| **1** | 37 | 41 | 50 | 39 | 35 | 37 | 63 | 59 | 48 | 55 | 43 | 44 | 54 | 41 | 53 | 53 | 73 | 62 |
| **2** | 61 | 46 | 40 | 46 | 45 | 48 | 63 | 54 | 50 | 52 | 47 | 35 | 59 | 58 | 53 | 36 | 77 | 62 |
| **3** | 59 | 56 | 51 | 38 | 55 | 47 | 64 | 55 | 51 | 43 | 48 | 60 | 40 | 40 | 44 | 36 | 42 | 19 |
| **4** | 39 | 46 | 44 | 46 | 46 | 48 | 40 | 46 | 52 | 53 | 53 | 42 | 43 | 52 | 39 | 42 | 43 | 45 |
| **5** | 47 | 56 | 53 | 46 | 44 | 51 | 45 | 81 | 43 | 51 | 67 | 48 | 43 | 51 | 41 | 45 | 45 | 60 |
| **6** | 37 | 45 | 56 | 38 | 45 | 41 | 48 | 54 | 69 | 67 | 60 | 58 | 37 | 44 | 46 | 44 | 44 | 46 |
| **7** | 60 | 57 | 43 | 42 | 57 | 43 | 55 | 60 | 40 | 47 | 52 | 33 | 62 | 53 | 52 | 51 | 56 | 64 |
| **8** | 78 | 71 | 67 | 55 | 59 | 52 | 67 | 61 | 61 | 60 | 53 | 49 | 61 | 51 | 59 | 52 | 62 | 61 |
| **9** | 68 | 67 | 53 | 59 | 64 | 50 | 53 | 54 | 51 | 37 | 46 | 42 | 58 | 63 | 43 | 53 | 40 | 49 |
| **10** | 62 | 49 | 47 | 45 | 46 | 36 | 41 | 39 | 36 | 36 | 35 | 23 | 59 | 62 | 57 | 55 | 57 | 58 |
| **11** | 56 | 48 | 54 | 46 | 48 | 41 | 50 | 63 | 39 | 36 | 39 | 47 | 43 | 55 | 39 | 48 | 43 | 41 |
| **12** | 53 | 36 | 39 | 46 | 38 | 32 | 112 | 34 | 49 | 50 | 49 | 47 | 43 | 61 | 44 | 50 | 45 | 37 |
| **13** | 52 | 38 | 34 | 34 | 39 | 38 | 113 | 48 | 53 | 53 | 51 | 48 | 52 | 49 | 47 | 41 | 39 | 44 |
| **14** | 53 | 41 | 45 | 50 | 51 | 46 | 46 | 56 | 48 | 52 | 58 | 51 | 59 | 60 | 66 | 36 | 45 | 58 |
| **15** | 46 | 41 | 37 | 44 | 42 | 34 | 48 | 36 | 44 | 50 | 50 | 44 | 66 | 54 | 45 | 58 | 57 | 41 |
| **16** | 48 | 35 | 25 | 47 | 44 | 46 | 57 | 54 | 41 | 50 | 55 | 43 | 51 | 39 | 49 | 44 | 55 | 42 |
| **17** | 43 | 54 | 58 | 56 | 49 | 46 | 58 | 47 | 48 | 39 | 49 | 46 | 64 | 61 | 57 | 64 | 69 | 50 |
| **18** | 59 | 47 | 41 | 43 | 43 | 46 | 80 | 86 | 61 | 67 | 61 | 60 | 47 | 50 | 43 | 48 | 42 | 46 |
| **19** | 71 | 50 | 34 | 40 | 32 | 33 | 41 | 48 | 55 | 53 | 50 | 39 | 68 | 66 | 64 | 57 | 37 | 45 |
| **20** | 57 | 34 | 42 | 42 | 43 | 32 | 74 | 51 | 48 | 52 | 69 | 49 | 76 | 75 | 53 | 56 | 40 | 54 |
| **21** | 61 | 44 | 48 | 45 | 43 | 45 | 46 | 62 | 53 | 45 | 46 | 46 | 51 | 56 | 49 | 48 | 45 | 53 |
| **Ort.** | 54,61 | 47,71 | 45,76 | 45,09 | 46,09 | 42,47 | 60,19 | 54,66 | 49,52 | 49,90 | 51,47 | 45,42 | 54,09 | 54,33 | 49,66 | 48,42 | 50,28 | 49,38 |

*Ort.:Ortalama.

**Çizelge 3.2.** Besleme programının başlatıldığı gün ve diğer günlerde gruplardaki ortalama kan üre nitrojen değerleri (mg/dl).

| Ortalama | BUN1 | BUN2 | BUN3 | BUN4 | BUN5 | BUN6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Grup 1** | 54,6±10,93 | 47,7±9,81 | 45,7±9,59 | 45,1±6,13 | 46,1±7,79 | 42,4±6,46 |
| **Grup 2** | 60,2±20,5 | 54,6±12,54 | 49,5±7,89 | 49,9±8,68 | 51,4±8,30 | 45,4,±8,65 |
| **Grup 3** | 54,1±10,41 | 54,3±9,04 | 49,6±7,76 | 48,4±7,69 | 50,2±11,77 | 49,4±10,78 |




**Şekil 3.1.** Besleme programının başlatıldığı gün ve diğer günlerde gruplardaki ortalama kan üre nitrojen değerleri (mg/dl).

### 3.2. Uterus pH' sı ve Sıcaklığı

Grup 1, 2 ve 3'te pH ve uterus sıcaklıkları Çizelge 3.3'te verilmektedir. Uterus sıcaklığı değerleri arasında beslemeyebağlı belirgin bir fark gözlenemezken, uterus pH'sı değerlerinin ham proteinin konsantre yem oranı arttıkça azaldığı görülmektedir. Ortalama uterus sıcaklığı ve uterus pH'sı değerlerinden de bu bulgular gözlenebilmektedir (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.3.** Gruplara ve deneklere göre uterus pH'sı ve sıcaklık değerleri.

| **Gruplar** | **Grup 1** | | **Grup 2** | | **Grup 3** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Denekler** | **pH** | **Sıcaklık ºC** | **pH** | **Sıcaklık ºC** | **pH** | **Sıcaklık ºC** |
| 1 | 7,28 | 35,4 | 7,12 | 35,4 | 6,97 | 35,6 |
| 2 | 7,1 | 37 | 7,25 | 34,8 | 7,07 | 36,6 |
| 3 | 7,14 | 33,5 | 7,2 | 36,7 | 6,91 | 36,5 |
| 4 | 7,15 | 32,2 | 7,19 | 34 | 6,98 | 36,3 |
| 5 | 7,05 | 37,5 | 7,1 | 33,9 | 7,15 | 33,5 |
| 6 | 7,18 | 34,6 | 7,06 | 36,3 | 7,16 | 35 |
| 7 | 7,15 | 33,5 | 7,23 | 33,8 | 7,11 | 33,6 |
| 8 | 6,96 | 34,6 | 7,05 | 35,7 | 7,13 | 33 |
| 9 | 7,13 | 36,6 | 6,92 | 35,2 | 7,08 | 35,1 |
| 10 | 7,1 | 35,4 | 6,95 | 37,1 | 7,14 | 35,2 |
| 11 | 7,01 | 33,7 | 7,07 | 37,3 | 6,97 | 33 |
| 12 | 6,94 | 35,6 | 7,02 | 34,9 | 7,1 | 37,3 |
| 13 | 6,94 | 34,8 | 6,93 | 34,5 | 7,05 | 35,4 |
| 14 | 6,92 | 35,4 | 7,26 | 34,7 | 7,24 | 36,2 |
| 15 | 7,06 | 35 | 7,15 | 34,3 | 7,01 | 35,4 |
| 16 | 7,62 | 35,2 | 7,07 | 35,7 | 7,4 | 35,3 |
| 17 | 6,97 | 36 | 7,12 | 35,2 | 7,1 | 32,1 |
| 18 | 7,24 | 33,4 | 7,26 | 35,2 | 6,96 | 36,5 |
| 19 | 7,05 | 32,9 | 7,17 | 36,5 | 7,01 | 35,8 |
| 20 | 7,55 | 35,9 | 7,11 | 35,5 | 6,87 | 35 |
| 21 | 7,05 | 36,5 | 6,94 | 34,7 | 7,03 | 35,2 |

**Çizelge 3.4.** Ortalama uterus pH'sı ve sıcaklık değerleri.

| **Ortalamalar** | **pH** | **Sıcaklık ºC** |
|---|---|---|
| **Grup 1** | 7,46±0,18 | 34,98±1,39 |
| **Grup 2** | 7,10±0,10 | 35,30±1,01 |
| **Grup 3** | 7,06±0,11 | 35,12±1,36 |

Farklı protein düzeylerinde konsantre yem ile beslenen gruplar arasında operasyon esnasında yapılan uterus pH'sı ve uterus sıcaklığı ölçümleri Kruskal Wallis Çoklu Varyans Analizi ile istatistiki olarak ayrı ayrı değerlendirildiğinde ve karşılaştırıldığında; gruplar arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

### 3.3. Ovaryum Cevapları

Gruplara göre toplam ve ortalama ovaryum cevapları değerlendirildiğinde gruplar arasında ovulasyon ortalamaları ve ortalama follikül sayıları sırası ile grup 1'de 7,38 ve 2,04 grup 2'de 8,61 ve 0,62 ve grup 3'de 6,28 ve 0,66 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.5.).

Gruplara göre ovulasyon ortalamaları ve ortalama follikül sayıları ve ovulasyon oranları Çizelge 3.5'te verilmektedir. Her bir deneğe ve gruba göre Cl ve follikül sayıları ise Çizelge 3.6'da verildi. Yine çizelgelere ait grafiklerde Şekil 3.3.1 ve Şekil 3.3.2'de verilmektedir. Ovulasyon oranları ise ovaryumlarında Cl bulunan koyun sayısının toplam koyun sayısına oranı üzerinden hesaplanmıştır. Buna göre; grup 1 de 20/21, grup 2 de 21/21 ve grup 3 de 19/21 olarak hesaplandı. Her bir grup için koyun başına ovulasyon ortalaması ise toplam elde edilen luteal yapının denek sayısına (n:21) bölünmesiyle elde edilen ovulasyon ortalamalarını vermektedir.

**Çizelge 3.5.** Gruplara göre ortalama follikül sayıları, ovulasyon ortalamaları ve ovulasyon oranları.

| Gruplar | Follikül sayısı (Ortalama) | Ovulasyon ortalaması | Ovulasyon oranı % |
|---|---|---|---|
| **Grup 1** | 2.04±2,59 | 7,38±4,98 | 95 |
| **Grup 2** | 0.62±1,39 | 8,61±6,46 | 100 |
| **Grup 3** | 0.66±1,11 | 6,28±2,83 | 90 |

**Çizelge 3.6.** Gruplara ve deneklere göre Cl ve follikül sayıları.

| **Gruplar** | **Grup 1** | | **Grup 2** | | **Grup 3** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Denekler** | **Cl** | **Follikül** | **Cl** | **Follikül** | **Cl** | **Follikül** |
| 1 | 8 | 2 | 10 | 0 | 7 | 0 |
| 2 | 10 | 2 | 27 | 0 | 6 | 0 |
| 3 | 3 | 0 | 8 | 2 | 4 | 1 |
| 4 | 15 | 1 | 4 | 1 | 9 | 2 |
| 5 | 2 | 1 | 1 | 6 | 10 | 0 |
| 6 | 2 | 1 | 1 | 0 | 9 | 0 |
| 7 | 9 | 1 | 4 | 0 | 11 | 0 |
| 8 | 16 | 0 | 16 | 0 | 6 | 0 |
| 9 | 3 | 8 | 18 | 0 | 7 | 0 |
| 10 | 5 | 9 | 6 | 0 | 4 | 3 |
| 11 | 17 | 5 | 5 | 1 | 7 | 0 |
| 12 | 13 | 0 | 4 | 0 | 7 | 0 |
| 13 | 1 | 0 | 12 | 0 | 5 | 1 |
| 14 | 4 | 1 | 7 | 0 | 10 | 0 |
| 15 | 4 | 2 | 8 | 0 | 4 | 3 |
| 16 | 10 | 0 | 12 | 0 | 6 | 3 |
| 17 | 6 | 0 | 8 | 2 | 10 | 0 |
| 18 | 5 | 3 | 17 | 0 | 1 | 1 |
| 19 | 8 | 1 | 4 | 0 | 3 | 0 |
| 20 | 12 | 1 | 5 | 1 | 3 | 0 |
| 21 | 2 | 5 | 4 | 0 | 3 | 0 |
| **Toplam** | **155** | **43** | **181** | **13** | **132** | **14** |

Farklı protein düzeylerinde konsantre yem ile beslenen gruplar arasında Cl sayıları Kruskal Wallis Çoklu Varyans Analizi ile istatistiki olarak karşılaştırıldığında; gruplar arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ancak grup 1'deki yüksek follikül sayısının grup 2 ve grup 3'e göre istatiski olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

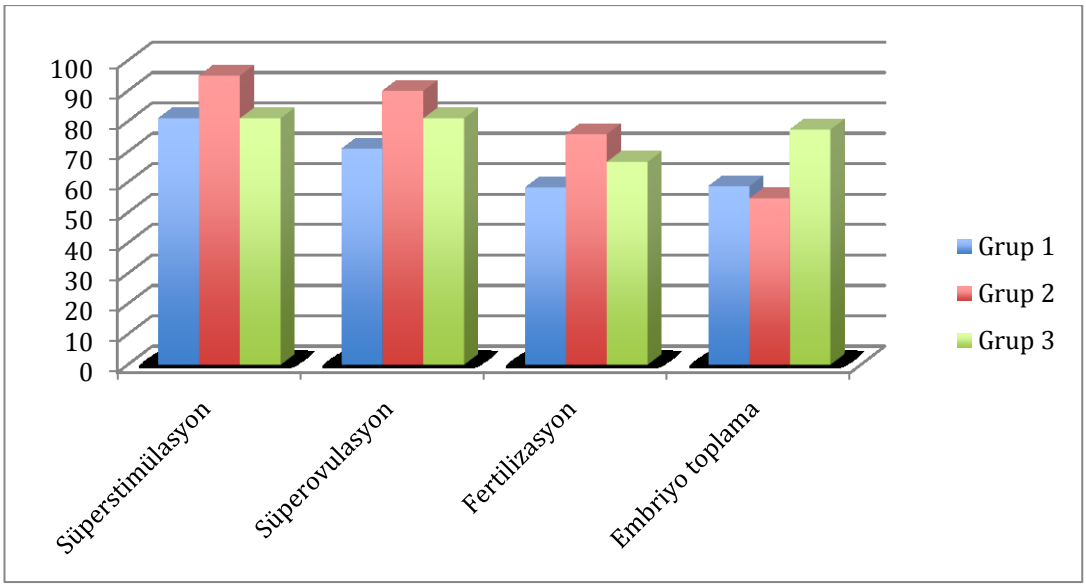
### 3.4. Süperstimülasyon, Süperovulasyon, Fertilizasyon ve Embriyo Toplama Oranları

Gruplar arasında süperstimülasyon oranları bir koyunda bir uyarımda her iki ovaryum üzerinde toplam üçten fazla sayıda antral follikül veya luteal yapı bulunan ve süperovulasyon oranları her iki ovaryum üzerinde toplam üçten fazla sayıdaki luteal yapı bulunan koyunlarda sayılarak oran olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.7). Buna göre süperstimülasyon oranları (süperstimüle hayvan sayısı/toplam hayvan sayısı) sırası ile grup 1, grup 2 ve grup 3'te 17/21, 20/21 ve 17/21 iken süperovulasyon oranları (süperovule hayvan sayısı/toplam hayvan sayısı) 15/21, 19/21 ve 17 /21 olarak hesaplandı. Süperstimülasyon, süperovulasyon, fertilizasyon ve embriyo toplama oranları yüzde olarak hesaplanan veriler Şekil 3.2'de grafik olarak gösterilmiş ve gruplar bu veriler bakımından birbiri ile karşılaştırılmıştır. Belirtilen oransal hesaplamalar aşağıdaki şekilde hesaplandı:

- Süperstimülasyon oranı = (Cl+Follikül-4 ve daha fazla) koyun sayısı / toplam koyun sayısı x 100;
- Süperovulasyon oranı = (Cl 4 ve daha fazla) koyun sayısı / toplam koyun sayısı x 100;
- Fertilizasyon oranı = toplam embriyo sayısı / toplam hücre sayısı x 100;
- Embriyo toplama oranı = toplanan embriyo + UFO / Cl x 100.

**Çizelge 3.7.** Süperstimülasyon, süperovulasyon, fertilizasyon ve embriyo toplama oranları (%).

| Oranlar % | Süperstimülasyon | Süperovulasyon | Fertilizasyon | Embriyo toplama |
|---|---|---|---|---|
| **Grup 1** | 81 | 71 | 58,24 | 58,70 |
| **Grup 2** | 95 | 90 | 75,75 | 54,69 |
| **Grup 3** | 81 | 81 | 66,66 | 77,27 |




**Şekil 3.2.** Süperstimülasyon, süperovulasyon, fertilizasyon ve embriyo toplama oranları (%).

Gruplar arasındaki fertilize oosit sayısı veya fertilizasyon oranları grup 1'de % 58,24, grup 2'de % 75,75 ve grup 3'te % 66,66 olarak hesaplandı. Embriyo toplama oranları ise her grup için toplam embriyo ve oosit sayısının Cl sayısına oranı ile belirlenmiş olup, grup 1'de %58,70, grup 2'de %54,69 ve grup 3'te %77,27' dir.

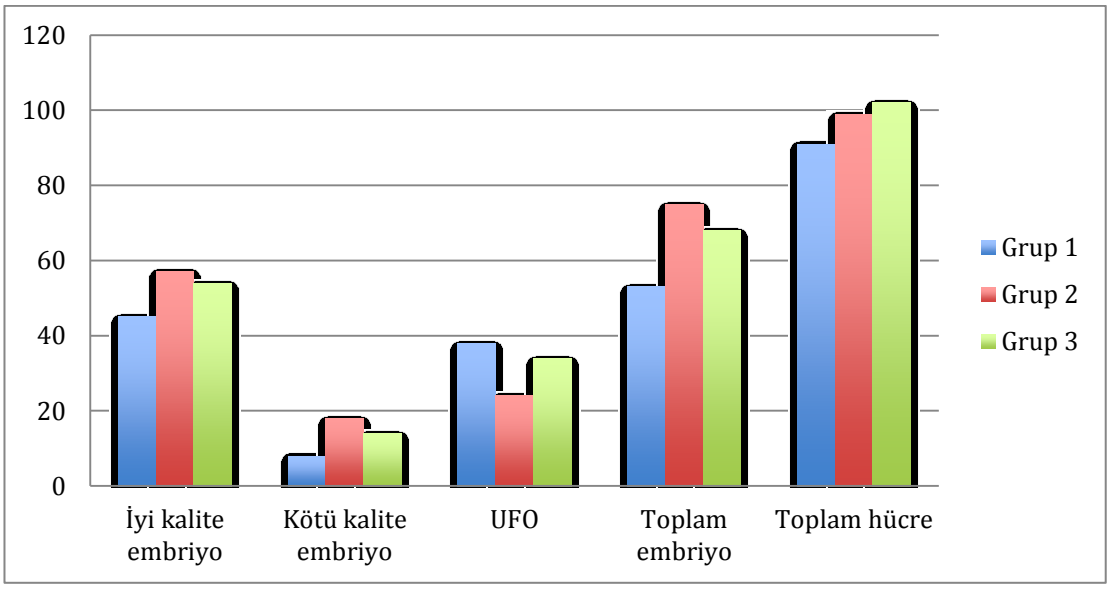
Gruplara göre süperstimülasyon, süperovulasyon ve fertilizasyon çok gözlü düzenlerde ki-kare testi ile istatistiki olarak karşılaştırılmış ve gruplar arasında söz edilen değerler açısından bulunan farkın önemsiz olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Ancak embriyo toplama oranları karşılaştırıldığında grup 3 hem sayısal olarak hem de istatistiki olarak diğer gruplardan farklı bulundu ($p<0,05$).

### 3.5. Embriyo Kaliteleri

Embriyo kaliteleri grup 1'de G1 ve G2, dondurulabilir ve transfer edilebilir embriyolar yani iyi kalite embriyo sayısı 45 iken grup 2'de 57 ve grup 3'te ise 54'tür. G3, G4 yani dondurulamayacak veya transfer edilemeyecek kalitedeki, kötü kaliteli embriyo sayısı ise grup 1'de 8, grup 2'de 18 iken grup 3'te 14'tür. UFO sayısı ise grup 1'de 38, grup 2'de 24 ve grup 3'te 34 olarak belirlendi. İlgili veriler Çizelge 3.8'de tablo ve Şekil 3.3'te grafik halinde verildi.

**Çizelge 3.8.** Gruplar arasında kalitelerine göre embriyo, fertilize olmayan oosit ve hücre sayıları.

| Embriyo | İyi kalite embriyo | Kötü kalite embriyo | UFO | Toplam embriyo | Toplam hücre |
|---|---|---|---|---|---|
| Grup 1 | 45 | 8 | 38 | 53 | 91 |
| Grup 2 | 57 | 18 | 24 | 75 | 99 |
| Grup 3 | 54 | 14 | 34 | 68 | 102 |




**Şekil 3.3.** Gruplara göre elde edilen iyi ve kötü kalite embriyo, fertilize olmayan oosit, toplam embriyo ve hücre sayıları

Gruplar iyi ve kötü kalite embriyo, UFO, toplam embriyo ve toplanan tüm hücre sayıları bakımından Kruskal Wallis Varyans Analizi ile istatistiki olarak karşılaştırıldığında; iyi kalite embriyo, kötü kalite embriyo, toplam embriyo ve toplanan hücre sayıları açısından gruplar arasındaki fark önemsizken ($p<0,05$); UFO sayıları arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

### 3.6. Embriyo Toplama Oranları

Gruplar genel olarak Cl, follikül, iyi ve kötü kalite embriyo, toplam embriyo, UFO ve toplanan hücre sayıları açısından bir bütün olarak karşılaştırılabilmeleri amacı ile Çizelge 3.9, Çizelge 3.10 ve Çizelge 3.11'de tablo halinde sunulmuştur.

Embriyo toplama oranları aynı grup içerisinde her bir koyun için toplanan fertilize veya fertilize olmayan oosit ve embriyo sayısının grup için toplamının laparotomi sonrası her iki ovaryumda sayılan Cl sayısına oranı hesaplanarak belirlendi. Buna göre birinci grup için %58,70 iken ikinci grup için %54,69 ve üçüncü grup için %77,27 olarak hesaplandı.

Embriyo toplama oranları açısından gruplar çok gözlü düzenlerde ki-kare testi ile istatistiki olarak karşılaştırılarak, grup 1, grup 2 ve grup 3 arasında embriyo toplama oranları açısından farkın önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

**Çizelge 3.9.** Grup 1'de Cl, follikül, toplam hücre, UFO, iyi kalite (G1+G2), kötü kalite embriyo (G3+G4) ve toplam embriyo sayıları.

| Grup 1 | CL | Follikül | İyi kalite | Kötü kalite | Toplam embriyo | UFO | Toplanan hücre |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 8 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 |
| **2** | 10 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| **3** | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **4** | 15 | 1 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 |
| **5** | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **6** | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **7** | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| **8** | 16 | 0 | 7 | 6 | 13 | 0 | 13 |
| **9** | 3 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **10** | 5 | 9 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| **11** | 17 | 5 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| **12** | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 |
| **13** | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **14** | 4 | 1 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| **15** | 4 | 2 | 4 | 1 | 5 | 0 | 5 |
| **16** | 10 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 8 |
| **17** | 6 | 0 | 6 | 0 | 6 | 0 | 6 |
| **18** | 5 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| **19** | 8 | 1 | 1 | 0 | 1 | 6 | 7 |
| **20** | 12 | 1 | 9 | 0 | 9 | 0 | 9 |
| **21** | 2 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Toplam** | **155** | **43** | **45** | **8** | **53** | **38** | **91** |

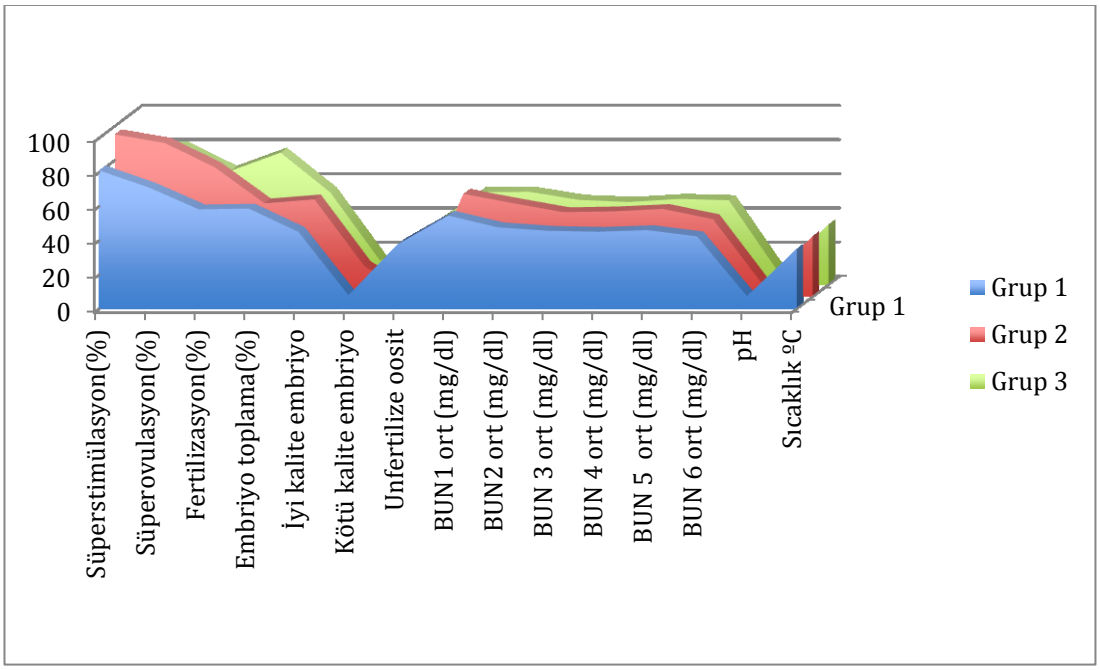
**Çizelge 3.10.** Grup 2'de Cl, follikül, toplam hücre, UFO, iyi kalite (G1+G2), kötü kalite embriyo (G3+G4) ve toplam embriyo sayıları.

| Grup 2 | CL | Follikül | UFO | İyi kalite | Kötü kalite | Toplam embriyo | Toplanan hücre |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 10 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| **2** | 27 | 0 | 5 | 1 | 0 | 1 | 6 |
| **3** | 8 | 2 | 3 | 2 | 2 | 4 | 7 |
| **4** | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| **5** | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **6** | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **7** | 4 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 | 3 |
| **8** | 16 | 0 | 0 | 6 | 3 | 9 | 9 |
| **9** | 18 | 0 | 0 | 9 | 7 | 16 | 16 |
| **10** | 6 | 0 | 0 | 7 | 0 | 7 | 7 |
| **11** | 5 | 1 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 |
| **12** | 4 | 0 | 0 | 7 | 0 | 7 | 7 |
| **13** | 12 | 0 | 0 | 7 | 3 | 10 | 10 |
| **14** | 7 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| **15** | 8 | 0 | 0 | 6 | 0 | 6 | 6 |
| **16** | 12 | 0 | 3 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| **17** | 8 | 2 | 3 | 0 | 1 | 1 | 4 |
| **18** | 17 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 16 |
| **19** | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| **20** | 5 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 |
| **21** | 4 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 |
| **Toplam** | **181** | **13** | **39** | **57** | **18** | **75** | **114** |

**Çizelge 3.11.** Grup 3'te Cl, follikül, toplam hücre, UFO, iyi kalite (G1+G2), kötü kalite embriyo (G3+G4) ve toplam embriyo sayıları.

| Grup 3 | CL | Follikül | UFO | İyi kalite | Kötü kalite | Toplam embriyo | Toplanan hücre |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 7 | 0 | 0 | 6 | 1 | 7 | 7 |
| **2** | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 6 | 6 |
| **3** | 4 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| **4** | 9 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| **5** | 10 | 0 | 0 | 5 | 1 | 6 | 6 |
| **6** | 9 | 0 | 0 | 7 | 2 | 9 | 9 |
| **7** | 11 | 0 | 1 | 8 | 2 | 10 | 11 |
| **8** | 6 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 | 5 |
| **9** | 7 | 0 | 0 | 5 | 2 | 7 | 7 |
| **10** | 4 | 3 | 1 | 0 | 2 | 2 | 3 |
| **11** | 7 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 3 |
| **12** | 7 | 0 | 0 | 3 | 2 | 5 | 5 |
| **13** | 5 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| **14** | 10 | 0 | 8 | 0 | 1 | 1 | 9 |
| **15** | 4 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| **16** | 6 | 3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| **17** | 10 | 0 | 0 | 6 | 1 | 7 | 7 |
| **18** | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **19** | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **20** | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **21** | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Toplam** | **132** | **14** | **34** | **54** | **14** | **68** | **102** |

Gruplara göre tüm bulgular Çizelge 3.12'de özetlenmiştir. Ayrıca tüm özet bulgular Şekil 3.4'te şematize edilmiştir.




**Şekil 3.4.** Gruplara göre süperstimülasyon, süperovulasyon, fertilizasyon, embriyo toplama, iyi kalite embriyo, kötü kalite embriyo, unfertilize oosit, BUN, uterus pH'sı ve uterus sıcaklığı değerlerinin grafiksel gösterimi.

**Çizelge 3.12.** Gruplara göre süperstimülasyon, süperovulasyon, fertilizasyon, embriyo toplama, iyi kalite embriyo, kötü kalite embriyo, unfertilize oosit, BUN, uterus pH' sı ve uterus sıcaklığı değerleri.

| | **Grup 1** | **Grup 2** | **Grup 3** |
|---|---|---|---|
| **Süperstimülasyon(%)** | 81 | 95 | 81 |
| **Süperovulasyon(%)** | 71 | 90 | 81 |
| **Fertilizasyon(%)** | 58,24 | 75,75 | 66,66 |
| **Embriyo toplama(%)** | 58,70 | 54,69 | 77,27 |
| **İyi kalite embriyo** | 45 | 57 | 54 |
| **Kötü kalite embriyo** | 8 | 18 | 14 |
| **Unfertilize oosit** | 38 | 39 | 34 |
| **BUN1 ort (mg/dl)** | 54,6 | 60,2 | 54,1 |
| **BUN2 ort (mg/dl)** | 47,7 | 54,6 | 54,3 |
| **BUN 3 ort (mg/dl)** | 45,7 | 49,5 | 49,6 |
| **BUN 4 ort (mg/dl)** | 45,1 | 49,9 | 48,4 |
| **BUN 5 ort (mg/dl)** | 46,1 | 51,4 | 50,2 |
| **BUN 6 ort (mg/dl)** | 42,4 | 45,4 | 49,4 |
| **pH** | 7,46 | 7,10 | 7,05 |
| **Sıcaklık ºC** | 34,98 | 35,30 | 35,05 |

Süperstimülasyon oranı: n- (Cl+Follikül sayısı 4'ten az olan koyun sayısı)/ n
Süperovulasyon oranı: n-(Cl sayısı 4' ten az olan koyun sayısı)/n
Fertilizasyon oranı: Embriyo/(UFO+Embriyo)
Toplama oranı (Recovery rate): (UFO+Embriyo)/Cl

# 4. TARTIŞMA

Koyunlarda flushing beslemesi ile ad libitum kaba yeme ilave olarak farklı ham protein seviyelerinde enerjisi sabit konsantre yem karmalarının kan üre azotu (BUN-blood urea nitrogen), uterus pH'sı ve sıcaklığı, ovaryum cevabı, süperstimülasyon, süperovulasyon, fertilizasyon ve embriyo kalitesi üzerine etkisinin kombine olarak çalışıldığı başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalar çoğunlukla ineklerde artan BUN seviyesinin yüksek proteinli rasyonla besleme ile bağlantılı olduğu ve bunun da fertilite gibi bazı reprodüktif parametreleri ve embriyo kalitesini olumsuz etkilediği yönündedir (Ferguson ve Chapula 1989, Leroy ve ark 2008, Howard ve ark 1987, Barton ve ark 1996 ). Ayrıca Cl sayısı, ovule olmamış antral follikül sayısı, fertilizasyon oranı, toplam embriyo sayısı, embriyo toplama oranı, beslenme ve BUN değerleri ile ilişkisi de sunulan çalışmada ele alınmaya ve değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Rasyonda artan protein miktarı, ovaryan folliküllerde, uterusta, kanda ve dolaşım yoluyla bir çok dokuda amonyum ve üre konsantrasyonunu artırmakta, yüksek ürenin ise direkt olarak uterus lumen ortamı üzerine etkisi olduğu bildirilmektedir (Butler 2005).

Koyunlarda aşım sezonu öncesi diyetin enerji düzeyinin iyileştirilmesinin veya artırılmasının ovulasyon ve kuzulama oranlarını artırdığı bu durumun besleme flushingi olarak adlandırıldığı bilinmektedir. Diyet enerji düzeyinin artırılması ovaryumlarda insulin büyüme faktörü-I (IGF-I) in artmasına ve dolayısı ile follikül uyarıcı hormon reseptörlerinin (FSHR) artışına neden olmaktadır (Hand 2011). Besleme yetersizliğinin ise pubertasın gecikmesi, ovulasyon ve konsepsiyon oranlarının düşmesi, embriyonik ve fötal kayıpların artması, postpartum anöstrus süresinin uzaması, düşük laktasyon, yüksek perinatal mortalite ve düşük neonatal performans gibi reprodüktif olayların büyük bir kısmında etkisinin olduğu bildirilmektedir (Smith ve Akinbamijo 2000).

Beslenme, dişilerde ve erkeklerde gametogenezisten pubertasa tüm reprodüktif olayları etkilemektedir (Scaramuzzi ve ark 2006).

## 4.1. Kan Üre Nitrojen Değerleri Beslenme İlişkisi

Çalışma sonuçları; kaba yeme ilaveten uzun süreli (en az 25 gün), farklı protein oranları içeren konsantre yemle besleme rejimi değişimlerinin BUN konsantrasyonlarını etkilediği ancak bu değişimin çalışma veya besleme başlangıcındaki BUN değerleri de göz önüne alındığında beklenen ölçülerde kaldığı ve bu değişimlerin istatistiki olarak da önemli bir fark yaratmadığını göstermiştir. Besleme başlangıcında BUN değerleri yüksek olmasına karşın diğer günlerde BUN değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında farklı protein oranlarında beslenen gruplar arasında önemli bir fark göstermemiş, istatistiki olarak da farkın önemsizliği ortaya konmuştur ($p<0,05$). Kan üre nitrojen konsantrasyonlarını etkileyen rasyon enerji düzeyi gibi bir çok faktör bulunmaktadır. Bununla birlikte Koenig ve ark (1980) yaptıkları çalışmada nitrojen retensiyonunun hem protein hem de enerji alımının artması ile arttığını bildirmişlerdir. BUN ölçümlerinin sabah saatlerinde metabolizmanın sindirimin ve ilgili metabolik olayların minimuma indiği, dehidrasyonun maksimuma çıktığı vakitte alınan kandan yapılmasının da BUN değerlerinin yüksek olmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (Turgut 2000). Bununla ilişkili olarak nitekim kan üre nitrojen konsantrasyonlarının sütçü ineklerde de gün boyunca düzensiz olarak değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Trevaskis ve Fulkerson 1999). Ayrıca çalışmada kaba yem ihtiyacını karşılamak amacıyla kullanılan yonca kuru kaba yeminin ham protein oranı kuru maddede %14 ve ham yağ oranı da diğer baklagil otlarına göre düşük, ancak tuttuğu azot miktarı oldukça yüksektir (105 g/m2). Bu durum BUN seviyelerinin yüksek olmasına bir sebep olarak gösterilebilir. Ancak yoncanın kaba yem olarak seçilmesinin nedeni ß karoten miktarının oldukça yüksek (50 mg/kg ß karoten) olmasıdır. Ayrıca 650-2200 IU/kg vitamin D2 içermektedir. Vitamin B yönünden de zengindir (Yalçın 2001).

Sunulan çalışmada kan üre nitrojen değerlerinin gruplar arasında istatistiki olarak bir fark göstermemesinden dolayı somut olarak BUN'un embriyo kalitesi, süperovulasyon, fertilizasyon oranları, embriyo toplama oranları gibi reprodüktif parametrelerle ilişkisini belirlemeye çalışmak veya bir korrelasyon aramak uygun görülmemiştir. Benzer şekilde farklı protein oranlarında beslemenin de BUN değerlerini, özellikle uzun süreli besleme sonucu, etkilemediği görülmüştür. Ancak yüksek BUN değerlerinin özellikle ineklerde bir çok reprodüktif parametreyi etkilediği ile ilgili yayınları da görmezden gelmek imkansızdır. Nitekim Jordan ve

ark (1983), % 12 ve % 23 ham proteinle besledikleri sütçü ineklerde postpartum 40. günde uterus sekresyonunu ve kan biyokimyasını değerlendirmiş ve yüksek proteinle beslenen hayvanlarda plazma üre nitrojen seviyesinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında Canfield ve ark (1990) da benzer şekilde rasyon ham protein düzeyinin artırılmasının veya rasyona direkt nitrojen kaynağı olarak üre ilavesinin serum üre konsantrasyonunu artırdığını bildirmişlerdir.Yine sütçü ineklerde in vitro oosit maturasyonu üzerine 0,5;7,5 ve 10 mmol/l üre ilavesinin olumsuz etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada farklı üre konsantrasyonlarının blastosistten hatchinge ulaşma oranları üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı, ancak gelişen oositten blastosist aşamasına ulaşan 8. gün embriyo oranlarında 7,5 mmol/l konsantrasyonundan itibaren bir azalma olduğu bildirilmiştir (Ocon ve Hansen 2003).

Yüksek rasyon proteininin (%17-19 HP) Butler (1998) tarafından sütçü ineklerde plazma ve sütte yüksek üre nitrojen (>19-20 mg/dl) nedeniyle fertilite azalmasıyla ilişkilendirildiği bildirilmiştir. Buna neden olarak da değişen uterus ortamı bir önerme olarak kabul edilmiştir. Ancak artan rasyon proteinini oransal olarak yüzde ham protein değil, rumende sindirilebilen ve sindirilemeyen proteinler olarak değerlendirmenin daha sağlıklı yorumlanacağı belirtilmiştir.

Sunulan çalışmada artan rasyon proteini BUN seviyelerinde bir miktar artışa neden olmakla birlikte, istatistiki olarak değerlendirildiğinde bu artış önemsizdir ($p<0,05$) ve BUN değerleri arasında günlere göre gruplar arasında önemli bir fark bulunamamıştır. Bunun olası nedenleri arasında ruminantların yüksek BUN düzeyine adaptasyonunun günler içerisinde çok hızlı gelişmesi sayılabilir. Nitekim Preston ve ark (1965), yaptıkları çalışmada kuzu besleme ve bitiş yemi olarak %9,2, %11,5, %13,1, %16,5 ve %22 ham protein içeren konsantre yemlerle besledikleri gruplara ayrılan kuzular arasında, protein konsantrasyonunun artırılmasının BUN seviyelerini artırdığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada BUN seviyelerinin 19-21 gün aynı rasyonla besleme sonrasında tamamen stabilize olduğu da bildirilmektedir. Bundan başka, Dawuda ve ark (2002), sütçü ineklerde, sindirilebilirliği yüksek üre (250 g/gün) ilaveli rasyonla beslemenin PMSG ile standart süperovulasyon protokolü (PRID' in çıkarılma günü 2550-3000 IU PMSG) yapılan hayvanlarda toplanan embriyo sayısı ve kalitesi ile ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, uzun süreli (tohumlamadan 10 gün öncesinden başlanarak) üre ilaveli rasyonla beslenen grubu

kısa süreli (tohumlamadan gününe kadar 7. gün) besleme ile karşılaştırmışlardır. BUN seviyesinin her iki grupta da besleme başlangıcından 3 saat sonra önemli oranda arttığını gözlemlemişlerdir. Nitekim kısa süreli artışlar üre metabolizmasının hızı hakkında da fikir vermektedir. Bu bağlamda yapılacak çalışmalarda besleme sonrası kısa zaman aralıklarında BUN ölçümünün ve dolayısı ile reprodüktif sistemle ilişkisinindaha kolay yorumlanabileceği düşünülmektedir.

Kan üre nitrojen düzeylerini etkileyebilen stres, ırk, yaş, hidrasyon durumu gibi bir çok faktör bulunmakla birlikte (Turgut 2000) BUN değerlerindeki yüksekliğin nedenlerinden bazıları; hayvanların sabah aç olması, suyu tazelenmediği için henüz su içmemiş olması, buna bağlı hayvanın dehidre olması ve nihayet ırk faktörünün farklılık yarattığı düşünülmektedir. Nitekim Yıldız ve ark (1998), bir kültür ırkı olan Merinos koyunlarında ortalama %19 ham proteinli konsantre yem ve kuru yonca kaba yemi kullanarak yürüttükleri çalışmada BUN düzeylerini 5-25 mg/dl arasında bulmuşlardır. Bu çalışma verilerinin sunulan çalışma değerlerinden düşük olmasının kültür ırkı özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna karşın; Küçükersan ve ark (1996) ise, Akkaraman koyunlarda bazı kan parametrelerini araştırdıkları çalışmalarında, ham protein düzeyi yaklaşık %15 olan konsantre yem ve kuru yonca kaba yemiyle beslenen koyunlarda ölçülen BUN değerlerinin yaklaşık ortalama 35-50 mg/dl arasında olduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu araştırıcıların ortalama BUN ölçümü sonuçları karşılaştırıldığında yerli ırk koyunlarda ham protein düzeyinin önceki çalışmaya göre daha düşük rasyonla beslenmesine karşın (%19' a göre %15) BUN değerlerinin diğer çalışmaya göre oldukça yüksek bulunduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda değerlendirildiğinde yerli ırkta yapılan çalışmadaki ölçümlerle tez çalışmasının ortalama sonuçları arasında çok belirgin bir farkın olmadığı görülmektedir. Bununla ilgili olarak bazı araştırıcıların çalışmalarındaki BUN ölçümlerine de kısaca izleyen paragraflarda değinilmiştir.

Antunovic ve ark (2011), Tsigai koyunlarında östrus, luteal evre gibi bazı reprodüktif fizyolojik dönemlerde ölçtükleri BUN değerlerinin 16-19 mg/dl arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Piccione ve ark (2009), Comisana koyunlarında farklı reprodüktif kondüsyonlarda bazı fizyolojik kan parametrelerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, BUN değerlerini 6,74-12,47 mmol/l (18,8-34,92 mg/dl) olarak ölçmüşlerdir.

Yine başka bir çalışmada ortalama vücut ağırlıkları 21-68 kg arasında değişen 69 koyunda BUN konsantrasyonlarının 2-34 mg/dl arasında olduğunun belirlendiği bildirilmiştir (Kohn ve ark 2005).

Dosky ve ark (2012) ise, Karadi koyunlarında rasyona soya fasulyesi ilavesinin bazı kan parametrelerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, ortalama BUN değerlerini 45,5 ile 65,5 mg/dl arasında bulmuştur.

Başka bir çalışmada Karen ve ark (2011), günlük 1 kg (%65 mısır, %25 çavdar ve %10 ayçekirdeği) konsantre yem ve kaba yem olarak 5 kg taze yonca ve 0,5 kg yonca samanı ile besledikleri, kuru maddede %17,4 ham protein içeren ve aşımdan 5 gün önce flushing besisine alma kapsamında konsantre yemin 1,2 kg' a ve dolayısıyla ham protein oranı %17,9' a çıkarılan rasyonla besledikleri İvesi x Merinos melezi koyunlarında plazma üre nitrojen (PUN) değerlerinin gebelik oranlarına etkisini araştırdıkları çalışmada, PUN değerlerinin 2-27 mmol/l (6-76 mg/dl) arasında değişiklik gösterdiğini ve gebelik oranları üzerine önemli bir etkisinin olmadığını ve artan PUN (>18 mmol/l-50,42 mg/dl) konsantrasyonunun gebelik oluşum oranları üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Yine koyunlarda yüksek rasyon üre ve plazma üre konsantrasyonuna karşın ovulasyon oranının etkilenmediği ancak 4. gün az sayıda 8 hücreli embriyo eldesine neden olduğu ve embriyoların kalitesinin düştüğü ve bunun ovidukt ortamının etkilenmesi veya follikülün zarar görmesiyle ilgili olduğunun düşünüldüğü bildirilmiştir (Boland ve ark 2000).

Koyunlarda yapılan başka bir çalışmada aşım döneminden önce yüksek proteinle besleme ve sonuç olarak dolaşımdaki ve uterustaki yüksek BUN değerlerinin büyük kuzu doğumlarına (large offspring syndrome) neden olduğu bildirilmiştir (Young ve ark 1998).

Butler ve ark (1996), sütçü ineklerde yaptıkları çalışmada % 17,5 ve % 20 ham protein içeren rasyonlarla beslenmiş sütçü ineklerde PUN konsantrasyonunun 19 mg/dl' nin üzerine çıkmasının gebelik oranlarını düşürdüğü kanısına varmışlardır. Yine Kia ve ark. (2012), İran Markhoz keçilerinde flushing ve hormonal sağaltımın fertilite, kuzulama oranı, ikizlik ve çoklu doğum üzerine etkisini araştırdıkları

çalışmada rasyon ham protein oranı % 11,4 ve % 16,4 olan farklı gruplarda yüksek protein oranının bazal protein (% 11,4) ile beslemeye göre daha yüksek reprodüktif verim özelliklerine neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada serum BUN konsantrasyonları da çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermiş ve önemli oranda olmamakla birlikte yüksek proteinle beslenen keçilerde kısmen ( 21-23,5 mg/dl) daha yüksek bulunmuştur. Buna istinaden inek ve koyunda üre ve metabolitlerin yıkımında görevli mekanizmaların aynı olmayabileceği ancak üre ilavesi yapılmış diyetle beslenen koyunlardaki PUN konsantrasyonunun aynı şekilde yüksek üre ilavesi ile beslenen inek ve düvelerde benzer şekilde fertilite düşüklüğü ile sonuçlandığı bildirilmektedir (McEvoy ve ark 1997).

Sunulan çalışmanın bulgularında 5 farklı ırktan (Akkaraman, Dağlıç, Herik, Norduz ve İvesi) oluşturulan rastgele besleme gruplarındaki bireysel BUN değerleri minimum maksimum 25-113 mg/dl arasında ve ortalama BUN değerleri ise 42-60 mg/dl arasında değişmektedir. Ortalama değerler çalışmalarında koyunlarda BUN ölçümlerini değerlendiren Preston ve ark (1965) (8-32 mg/dl), Rhoads ve ark (2006) (15-24 mg/dl), ineklerde çalışan Butler ve ark (1996) (16-29 mg/dl), keçilerde çalışan Kia ve ark (2012) (21-24 mg/dl), yine koyunlarda çalışan, Antunovic ve ark (2011) (16-19 mg/dl), Piccione ve ark (2009) (19-35 mg/dl) ve Yıldız ve ark (1998) (5-25 mg/dl) ‘nın değerlerine göre yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte yine koyunlarda çalışan, Karen ve ark (2011) (6-76 mg/dl), Dosky ve ark (2012) (46-66 mg/dl) ve Küçükersan ve ark. (1996) (35-50 mg/dl)’ nın değerleri ile ise benzerlik göstermektedir. BUN değerleri özellikle bazı koyunlarda bireysel olarak kimi zaman ortalamaların çok üzerine de çıkmıştır. Ancak hayvanların üremiden etkilenmeleri ve klinik semptom gösterebilmeleri için minimum BUN konsantrasyonunun da 100 mg/dl’ nin üzerinde olması gerektiği bildirilmiştir (Turgut 2000). Herhangi bir hastalık semptomu veya üremi bulgusu göstermemeleri ve besleme programı başlangıcındaki BUN değerlerinin de yüksek olması, bu konuda bir çalışmaya rastlanamasına karşın, farklı protein düzeyindeki diyetlerdeki yüksek BUN değerlerine yerli koyunların daha iyi adaptasyon sağladıkları ve yerli ırklarımızın BUN değerlerinin kültür ırklarına göre daha yüksek olmasının, ya da başka bir deyişle, nitrojeni mikrobiyal protein sentezinde kullanma kapasitelerinin daha düşük olduğu düşünülmektedir. Ancak daha kesin yargılar için bununla ilgili daha ayrıntılı çalışmaların yapılmasına gerek vardır.

## 4.2. Uterus pH' sı ve Sıcaklığı Beslenme İlişkisi

Gruplar arasında ham proteinin ortalama pH değerleri üzerine etkisine bakıldığında; istatistiki yönden fark önemsiz ($p<0,05$) olmasına karşın (grup1: 7,46; grup 2: 7,10 ve grup 3: 7,06) protein oranı arttıkça uterus pH'sının asiditeye doğru kaydığı izlenmektedir. Kan üre nitrojen değerleri ile pH değerleri arasındaki korelasyon 'basit korelasyon regresyon analizi' ile analiz edildiğinde ise her üç grupta da ilişkinin oldukça zayıf olduğu görülmüştür (sırasıyla grup1,2 ve 3: -0,1; 0,08 ve -0,08). Ancak bu önemli bulunmayan protein düzeyi pH ilişkisinin büyük oranda BUN değerlerinin istatistiki olarak birbirine benzerliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kan üre değerleri ile uterus kimyasal ortamının ve dolayısıyla asiditenin birbirleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Gruplar arasında ham proteinin ortalama uterus sıcaklık değerleri üzerine etkisine bakılacak olursa, istatistiki yönden ortalama sıcaklık değerleri (grup 1: 34,98; grup 2: 35,3 ve grup 3: 35,12) arasındaki farkın istatistiki olarak da önemsiz olduğu görülmüştür. Yine kan üre nitrojen seviyeleri ile uterus sıcaklığı arasındaki korelasyon da (sırasıyla 0,1; 0,04 ve -0,4) oldukça zayıf bulunmuştur. Nitekim koyunlarda uterus sıcaklığının ölçüldüğü bir çalışmaya da rastlanılmamıştır.

Hammon ve ark (2005), sütçü sığırlar üzerinde yaptıkları çalışmada, ilk deney grubunda PUN seviyeleri ile ovaryan folliküler sıvı amonyum ve nitrojen seviyelerini, ikinci deney grubunda ise PUN seviyeleri ile uterus sıvısı amonyum ve üre konsantrasyonlarını değerlendirmiş ve sonuç olarak artan plazma üre konsantrasyonunun yine folliküler sıvıda ve uterus sıvısında artan $NH_3$ ve üre konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu ve bunun azalan reprodüktif verimlilik ile sonuçlandığını bildirmişlerdir.

Yukarıdaki bilgilerden farklı olarak Elrod ve ark (1993), ise diyet rasyon proteinin uterus pH' sı üzerine etkisini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada diyet değişikliklerinin uterus pH' sında bir değişime neden olmadığının gözlendiğini bildirmişlerdir.

Elrod ve Butler (1993), başka bir çalışmada uterus pH'sının %15 ve % 22 ham protein ile beslenen östrustaki düvelerde ortalama 6,75-6,87 arasında değişim

gösterdiğini ve %15 ham protein ile beslenen luteal evredeki düvelerde ortalama 7,09 iken % 22 protein ile beslenenlerde ortalama 6,79 olarak ölçüldüğünü bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada uterus pH'sı ölçümleri Elrod ve Butler (1993)'ın luteal evre ölçümleri ile oldukça yakın değerlerde seyretmektedir. Nitekim çalışmamızdaki pH ölçümleri de aşımın 7. gününde ya da bir başka deyişle luteal evre sırasında yapıldığından luteal fazda pH'nın biraz daha yükseldiği ve uterus ortamının luteal evre ile birlikte daha çok nötr pH'ya yaklaştığı düşünülebilir. Ayrıca yine aynı araştırıcıların (Elrod ve Butler 1993) bulgularında izlenen, ham protein düzeyi arttıkça uterus pH'sının azalması da istatistiki önem arz etmemekle birlikte ($p<0,05$) sunulan çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir.

Butler (1998), başarılı bir embriyonik gelişimin uterus ortamıyla da ilişkili olduğunu bildirmektedir. Aynı araştırıcıya göre uterus lumeni dinamik bir çevreye sahiptir ve östrus siklusunun farklı aşamalarında ve gebelik esnasında steroid hormonların etkisiyle ve endometriyal bezlerin sekresyonu ile önemli değişimler göstermektedir. Yazara göre yüksek rasyon proteini ile besleme, uterus pH'sını ve uterus lumenindeki iyon konsantrasyonunu özellikle luteal evrede etkilemektedir. Uterus pH'sı ayrıca yüksek oranda rumende sindirilebilir protein ile beslemeden etkilenmekte ve bu da fertilite azalması ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca yine Butler(1998)'da sütçü ineklerde yaptıkları çalışmalarında BUN değerlerinin 19 mg/dl'nin üzerine çıkmasının uterus pH'sını değiştirdiğini ve reprodüksiyonu olumsuz etkilediğini bildirmiştir.

Nitekim Barnes (2000), embriyo ve uterus ortamı arasındaki senkronize interaksiyonun gebeliğin başlangıcı ve sürdürülmesi için önemli olduğunu ve asenkronizasyon durumunda embriyonun implantasyon yeteneği, erken embriyonik yaşama gücü, embriyo gelişim ve büyüme hızı gibi birçok faktörün olumsuz etkilendiğini bildirmiştir.

### 4.3. Süperovulasyon Cevapları Beslenme İlişkisi

Koyunlarda rasyon ham protein düzeyinin veya ham proteine dayalı oluşturulan flushing beslemenin ve bununla birlikte BUN düzeylerinin, süperovulasyon oranları üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamakla birlikte bulgularımız ışığında en yüksek ovulasyon ve süperovulasyon oranlarına

%15 protein ile beslenen grupta ulaşıldığı ancak gruplar arasındaki farkın istatiski açıdan önemsiz olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Süperovulasyonun başarısını etkileyen bir çok faktör bulunmaktadır. Besleme de bu faktörlerden birini oluşturmaktadır. Nitekim Torell ve ark (1972) da yüksek protein alımının çoklu ovulasyonları uyarabildiğini bildirmiştir.

Sunulan çalışmada, senkronizasyona başlamadan en az 15 gün önce farklı protein düzeylerinde besleme uygulaması ve pFSH ile yapılan geleneksel süperovulasyon protokolü sonucu gruplara göre toplam ve ortalama ovaryum cevapları değerlendirildiğinde gruplar arasında koyun başına ovulasyon ortalamaları en yüksek %15 protein ile beslenen grup 2'de (8,61) en düşük ise %18 protein ile beslenen grup 3'te (6,28) bulunmuştur. Bundan başka izleyen paragraflarda ayrıntılı olarak değinileceği üzere gruplar arasında süperovulasyon ve fertilizasyon oranları açısından ise fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($p<0,05$). Nitekim Lozano ve ark (2003)'nın tespitlerine uyan sonuçlar, yüksek ve düşük proteinin özellikle süperovulasyon uygulaması sonucu bazı reprodüktif parametreleri olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Sunulan tez çalışmasında her ne kadar pozitif enerji dengesi hesaba katılmamış olsa da günlük kaba ve konsantre yem ihtiyacı ve ilişkili olarak enerji ve protein ihtiyacının karşılanması ve bu yönde sezon öncesinden başlanarak günlük ihtiyaçlar göze alınarak, besleme flushingi ile bir uyarımın yapılması ile ovaryum ve dolayısı ile reprodüksiyonun olumlu yönde etkilenmesi beklenmiş ve göz önüne alınmıştır. Bu bağlamda Scaramuzzi ve ark (2006)'na göre pozitif enerji dengesi koyunlarda, kanda leptin ve insulin konsantrasyonunu ve dolayısı ile glikoz açlığını artırmaktadır. Tüm bu değişimler ovaryumu doğrudan etkilemekte, follikülogenezis uyarılmakta ve dolayısı ile ovulasyon oranları yükselmektedir. Pozitif enerji dengesi ayrıca steroidlerin hepatik metabolizmasını (daha çok yıkılım bazında) da etkilemektedir.

Parr ve ark (1993), yüksek enerjili diyetlerin büyük karaciğer sendromuna sebep olduğunu ve steroid katabolizmasını, buna bağlı olarak da embriyo mortalitesini arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca pozitif enerji dengesinin hipotalamo

hipofizer eksende spesifik stimülatör etki yaptığı da bildirilmektedir (Scaramuzzi 2006).

Süperovulasyon sağaltımının büyük etkisi olduğu düşünülmekle birlikte ortalama ovulasyon oranları (%95, %100 ve %90) yüksek proteinle (%18) beslemede en düşükken(%90), %15 proteinli konsantre yem ile beslenen grupta en yüksek (%100) bulunmuştur. Buna karşın koyun başına ovulasyon oranları ise; yine benzer olarak en yüksek proteinle (%18) beslenen grupta en düşük (6,28) ve yine % 15 proteinli konsantre yemle beslenen grupta ise en yüksek (8,61) bulunmuştur. Yetersiz besleme kabul edilmemekle birlikte düşük proteinli konsantre yemle beslenen gruptaki ovulasyon oranı ve yine aşırı besleme kabul edilmemekle birlikte yüksek proteinli konsantre yemle besleme durumunda ovulasyon oranları, kontrol grubu olarak da kabul edebileceğimiz %15 ham proteinli konsantre yemle beslemeye göre daha düşük bulunmaktadır. Lozano ve ark (2003)'nın aşağıda açıklanan çalışması baz alındığında çalışma gruplarının ham protein oranlarının oldukça dengeli seçildiği de düşünülmektedir. Lozano ve ark (2003) yaptıkları çalışmada, hem aşırı hem de yetersiz beslenen koyunların azalan IGF-I, insulin ve endometriyal progesteron konsantrasyonuna maruz kaldıkları bildirilmiştir. Ayrıca hipofizer FSH konsantrasyonu kontrol grubunda en yüksek ve ovulasyon oranı ile arasında pozitif bir korrelasyon saptamıştır. Tüm bunlarla ilişkili olarak ovulasyon oranı ise en yüksek, düşük diyetle beslenende (%86) sonra kontrol grubunda (%73) ve en düşük (%45) ad libitum beslenen grupta belirlendiği bildirilmiştir.

Ancak çalışma sonucunda yapılan istatiski değerlendirmede gruplar arasında bir fark bulunamamıştır ($p<0,05$). Nitekim Webb ve ark (2012), yaptıkları çalışmada Döhne Merinos koyunlarından ad libitum özel bir çayır otuna (Fescue grass) ek olarak üre tabanlı 250 g/koyun/gün konsantre yem veya rumende sindirilemeyen protein (RUP) kaynaklarından oluşan, ancak üre içermeyen aynı konsantre yem ile beslenen iki ayrı grup oluşturup koyunları sezonda çiftleştirmiş ve on gün sonra laparoskopi yapılıp ovaryumlardaki CL'ler sayıldığında, üre tabanlı ve RUP içeren rasyonla beslenen her iki diyetteki gruplar arasında ovulasyon oranları arasında bir fark bulunmadığını belirlemişlerdir. Böylece diyet protein şeklinin bazı reprodüktif parametreler (ovulasyon oranı, gebelik oranı, kuzulama oranı) üzerine önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır.

Benzer şekilde bir süperovulasyon çalışması olmamakla birlikte sunulan çalışmanın sonuçları Molle ve ark (1995)'nın Sarda koyunlarında yaptıkları çalışma ile karşılaştırıldığında; 30, 60 ve 90 mm uzunluğunda mera otuna ilave olarak konsantre yem verilmeyen, 250 g/gün mısır tane yemi ve 270 g/gün soya fasulyesi ile beslemek üzere farklı gruplara ayrılan koyunlarda ovulasyon oranları: 90 mm mera otu ile beslenen gruptaki ovulasyon oranı, 30 mm ve 60 mm mera otu ile beslenen gruba göre daha yüksek (1,60'a göre 1,27 ve 1,18 ovulasyon) çıkmıştır. Yine soya fasulyesi yemi ile beslenen grupta ovulasyon oranları ilave konsantre yem verilmeyen ve mısır tane yemi ile beslenenlere göre daha yüksek (1,67'ye göre 1,25 ve 1,11 ovulasyon) bulunmuştur. Ovulasyon oranlarındaki farklılık soya fasulyesinde ham protein ve metabolik enerji düzeylerinin mısır tane yemine göre daha yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir. Uzun mera otuyla beslenenlerde ovulasyon oranının istatiski önem taşımamasına karşın yüksek olması ise uzun mera otlarıyla beslenen koyunlardaki canlı ağırlık artışı ve vücut kondisyonlarının diğer gruptaki koyunlara kıyasla daha yüksek olması ile açıklanmıştır. Ancak sayısal farka karşın gruplar arasında istatistiki yönden fark bulunmaması sunulan çalışmanın sonuçları ile de benzerlik göstermektedir.

Nitekim El-Hag ve ark (1998), koyunlarda flushing etkisininin kuzulama ve konsepsiyon oranı gibi bazı reprodüktif parametler üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, merada besleme dışında hiçbir ek besleme yapılmayan kontrol grubuna karşın aşım sezonundan 45 gün öncesinden başlamak üzere ek olarak günde 150 g, %25 ham protein içeren konsantre yem ile beslenen grupta konsepsiyon oranlarının (%91 ve %58) ve kuzulama oranlarının (%91 ve % 33) daha yüksek olduğunu ve flushingi mutlaka önerdiklerini bildirmişlerdir. Konsepsiyon oranları ve kuzulama oranları sunulan çalışmada değerlendirilmemiş olmakla birlikte fertilizasyon ve süperovulasyon oranları bulgularında da istatistiki farkın önemsiz olduğu ve beslemenin El-Hag ve ark (1998)'nın çalışma verilerine kıyasla belirtilen oranlara beklenen ölçüde yansımadığı gözlenmiştir.

Sunulan çalışmada tüm koyunlara, grubuna göre farklı protein oranlarında koyun başına 700 g konsantre yem ve ad libitum kuru yonca otu verilmiştir. Senkronizasyon amacıyla $P_4$ içeren süngerler 12 gün süre için takılmıştır. Süperovulasyon ise pFSH (Folltropin-V®) ile yapılmıştır. Bettencourt ve ark (2008) Portekiz Siyah Merinos koyunlarında sezonun (ilkbahar ve sonbahar) koyun FSH' sı

(Ovagen®) (oFSH) veya domuz FSH'sının (Pluset®) (pFSH) süperovulasyon ve embriyo kalitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında FGA içeren intravaginal sünger ile senkronize ettikleri ve ad libitum kaba yem ve günlük 400 g konsantre yem ile besledikleri koyunları 40 mg FGA içeren 12 gün takılan intravaginal sünger ile senkronize etmişlerdir. Senkronizasyonun 9. gününden başlanarak 12 saat ara ile ve 4 gün süre ile 1,25 ml oFSH uygulanan ve 3 gün süre ve 12 saat ara ile azalan dozlarda toplam 250 IU pFSH uygulanan iki grup oluşturulmuştur. Ovulasyon oranları, fertilizasyon oranları, toplam embriyo sayıları, dondurulabilir embriyo sayıları ve embriyo toplama oranları karşılaştırıldığında Ovagen gruplarında ilkbahar aylarında sağaltıma alınan koyunlarda, yukarıda verilen sırayla parametreler, 9,3; %94,6; 7,1; 5,9 ve %80 iken sonbahar aylarında sağaltıma alınan koyunlarda bu oranlar yine sırasıyla, 11,8; %94,8; 6,2; 5,5 ve %50 olarak bulunmuştur. Her iki süperovulasyon sağaltımı toplamda karşılaştırıldığında ise ovulasyon oranı, toplam embriyo sayısı, fertilizasyon oranı ve embriyo toplama oranları açısından (sırasıyla oFSH ve pFSH için; 12,5-9,3; 9,5-4,6; %96,7-%88; %80-%40) oFSH sağaltımının pFSH sağaltımına göre daha avantajlı olduğunun görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmadaki pFSH grubunun sonuçları sunulan tez çalışmasının sonuçları ile karşılaştırıldığında ise ovulasyon oranları olarak belirtilen koyun başına ovulasyon ortalamalarının her üç ham protein grubunda da daha düşük olduğu (7,38; 8,62 ve 6,28), koyun başına toplam embriyo sayılarının (4,3; 5,4; 4,8) ve fertilizasyon oranlarının da çalışmaya göre intrauterin inseminasyon yapılmamasıyla orantılı olarak daha düşük olduğu ve embriyo toplama oranlarının ise Bettencourt ve ark (2008)' ın çalışması ile karşılaştırıldığında oldukça başarılı olduğu (%59, %55 ve %77) söylenebilir. Sunulan tez çalışmasının reprodüktif verimi düşük yerli ırklarda çalışılmış olmasına karşın yöntem açısından önemli farklılıklar göstermediği bu çalışma ile karşılaştırıldığında başarı ile gerçekleştirildiği veya başarılı sonuçlar elde edildiği düşünülmektedir.

Yine Wu ve ark (2011), iki farklı ticari FSH preparasyonunu (pFSH ve Folltropin-V) ve farklı dozlamalarının süperovulasyon oranına etkisini araştırdıkları çalışmalarında Xinji yün koyunlarını aşım sezonunda kullanmışlardır. Yerli üretim pFSH ve Folltropin-V, Cl sayısı açısından karşılaştırıldığında (sırasıyla; 9-12) Folltropin-V' nin daha avantajlı olduğu; yine Folltropin-V' nin farklı uygulama doz ve sayılarına göre oluşturulmuş grupları (150 mg-6 enj., 120 mg-3 enj., 90 mg-3 enj.,

150 mg-1 enj.) ise kendi aralarında karşılaştırıldığında 120 mg ve 3 gün tek enjeksiyon uygulamasının da hemen hemen daha geleneksel olan 150 mg 6 enjeksiyon uygulaması kadar etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla dozlamanın süperovulasyon sağaltımında sanıldığı kadar önemli olmadığı kanısı oluşabilmektedir. Sunulan çalışmada tüm gruplar için aynı dozda (200 mg, 12 saat ara ile 8 enj.) kullanılan Folltropin-V ile süperovulasyon sonrası, koyun başına Cl sayısı her üç grup için de (sırasıyla, 7,38; 8,62 ve 6,28) yapılan çalışmaya göre daha düşüktür. Ancak bunda yerli koyun ırklarımızın kültür ırklarına göre reprodüktif verim özelliklerinin düşük olmasının etkili olabileceği; nitekim Ağaoğlu ve ark. (2012)' ın da yerli ırklarda (Karayaka koyunu) düşük (ortalama 6,36-9,62) embriyo sayılarına ulaştığı ve dolayısıyla yerli koyun ırklarımızın adaptasyon yeteneklerinin ve immun sistemlerinin çok güçlü olması nedeniyle uygulanan hormonal uyarımlara immunizasyon geliştirme kabiliyetlerinin daha yüksek olabileceği ve bu konuda çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Süperovulasyon sağaltımının başarısının anovulasyon kaynaklı reprodüktif fizyolojik anomalilerin oluşumundan etkilendiğini bildiren Veiga-Lopez ve ark (2006), çalışmalarında kullandıkları 12 Manchega koyununu 40 mg FGA içeren ve toplamda 14 gün uygulanan ancak 7. gün yeni sünger ile değiştirilmesi ile senkronize edilmiş ve süperovulasyon sağaltımına 12. günde başlanarak aynı gün mevcut Cl' lerin lizisi amacıyla Cloprestenol enjeksiyonu yapmışlardır. Süperovulasyon amacıyla FSH (Ovagen®) 12 saat arayla ve 4 gün boyunca azalan dozlarda uygulanmıştır. Östrusun üçüncü günü laparoskopik yöntemle açılan koyunlarda, Cl sayıları, toplanan embriyo sayıları ve canlı embriyolar sayılıp değerlendirilmiştir. Sonuç olarak ovulasyondan sonra anovulatör follikül bulunan koyunlarda ovulasyon oranlarının ve süperovulasyon cevabının anovulatör folliküllerden salgılanan yüksek östrojen miktarına bağlı olarak olumsuz etkilendiği ve daha düşük olduğu belirlenmiştir. Çalışmada anovulatör follikül sayısı yüksek ve düşük olan (6.4 ve 5.3) koyunlardaki ovulasyon oranları (sırasıyla 11,7 ve 12,8) sunulan tez çalışmasından elde edilen verilerden (en yüksek grup 2 de ve 8,62) daha yüksek bulunmuştur. Bunun yanında embriyo toplama oranları da (her üç grupta da yaklaşık % 80) elde edilen verilere dayanarak sunulan çalışmadan daha yüksek bulunmuştur (çalışmamızda en yüksek %77). Yine fertilizasyon oranları ise %60 civarında yani bu

çalışmada elde edilen sonuçlara oldukça yakın hatta biraz daha düşüktür (%58,%65 ve %67).

Azawi ve Al-Mola (2010), İvesi koyunlarında eCG ve FSH ile yaptıkları süperovulasyon çalışmasında 12 gün intravaginal sünger (Syncropart®, 49 mg) uygulaması ile senkronize ettikleri koyunlarda eCG ve FSH' nın süperovulatorik etkisini karşılaştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada süngerin çıkarılmasından 48 saat önce 1200 IU eCG uygulamasının çok sayıda anovule folliküle neden olduğunu bu nedenle sezonda ve sezon dışında FSH (8 azalan dozda) kullanımının daha faydalı olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada FSH ile sağaltımda sezonda corpus luteum sayıları (8,75) ve embriyo toplama oranlarının (4,83) eCG sağaltımına göre (sırasıyla; 5,66 ve 4,66) daha düşük olduğu bildirilmiştir. Sezondaki Cl sayıları ve embriyo toplama oranları FSH kullanılan grupla karşılaştırıldığında sunulan çalışmanın sonuçlarına yakın çıkmıştır.

Benzer şekilde Chall koyunlarında farklı süperovulasyon sağaltımlarının ovulasyon oranlarına ve folliküler gelişime etkilerini araştırdıkları çalışmalarında Salehi ve ark (2010), eCG ve FSH ile yaptıkları süperovulasyon programlarında östrustan 7 gün sonra Cl sayıları karşılaştırıldığında da en yüksek eCG-FSH kombine grupta (7,2) ve diğer iki grupta ise birbirine yakın (2,3; 2,5) bulunmuştur. Çalışmada her iki ovaryumda toplam en az 3 Cl' nin bulunması süperovulasyon olarak değerlendirilirken, süperovulasyon oranı en yüksek, eCG-FSH kombine grubunda (%72,7), daha sonra 14 günlük sünger uygulamasının sonlandığı gün eCG yapılan grupta (%36,3) ve en düşük 48 saat önce eCG yapılan grupta (%27,2) bulunmuştur. Sunulan tez bulguları Salehi ve ark (2010)'nın sonuçları ile karşılaştırıldığında Cl sayılarının özellikle grup 2' de tüm gruplardan daha yüksek (8,61) olduğu, yine süperovulasyon oranlarının da özellikle %15 ve %18 konsantre yem ile beslenen grupta (%90 ve %81) ilgili araştırıcıların verilerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Sözü geçen çalışmanın sezon dışında yapılmış olması çalışmanın ise sezonda yapılması bu farkın sezona bağlı olarak normal karşılanması gerektiğini ancak FSH kullanılan gruplarda süperovulasyon oranlarının daha yüksek olmasının çalışmada da FSH kullanımının haklı olduğunu düşündürmektedir.

In vivo embriyo üretimi amacıyla, Forcada ve ark (2010)' ın Ojalada koyunlarında basitleştirilmiş (eCG ve FSH' nın tek doz kullanımı) ve tekrarlayan

FSH/eCG uygulamalarının karşılaştırılması amacıyla aşım sezonunda yaptığı çalışmada toplanan embriyo sayıları sunulan tez çalışmasının sonuçları ile karşılaştırıldığında ise gruplar arasında önemli bir fark gözlenmemesine karşın geleneksel tekrarlayan uygulamada (14,1) ve basitleştirilmiş tek uygulamada (13,7) elde edilen embriyo sayıları çalışma sonuçlarından oldukça yüksektir. Ancak bunun daha önce de değinildiği gibi çalışmanın reprodüktif verimi düşük yerli ırklarda çalışılmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Beslemenin hormonal stimülasyon yapılmayan ve süperovulasyon sağaltımı yapılan koyunlarda oosit ve follikül morfolojisi üzerine etkisinin araştırıldığı 32 gün boyunca canlı ağırlık baz alınarak günlük enerji ihtiyacının yarısı kadar (0,5) günlük ihtiyaç kadar (1,0) ve günlük ihtiyacın iki katı (2,0) enerji içerecek oranlarda ayarlanmış mera otu ile 32 gün boyunca beslenmiş ve 30 mg FGA içeren intravaginal sünger ile senkronize edilen ve süngerin çıkarılmasından 2 gün önceden başlanarak 200 mg FSH (Folltropin-V) ile azalan dozlarda 6 uygulama ile süperovulasyon yapılmıştır. Sonuç olarak yüksek enerjili rasyonla beslemenin süperovulasyon oranlarını etkilemediği bildirilmiştir. Bununla birlikte düşük diyet alımının yüksek enerjili beslemeye gore, uyarılmayan ve süperovule edilen koyunlarda süperovulasyon yanıtını azalttığı, ancak yüksek enerjili beslemenin günlük ihtiyaç dahilinde (1,0) beslenen grupla karşılaştırıldığında süperovulasyon yanıtını artırmadığı bildirilmiştir (O'Callaghan ve ark 2000). Bu sonuçlar da sunulan tez çalışmasının sonuçlarını anlamlandırmakta ve ihtiyacın altında veya düşük proteinli rasyonlarla beslemenin daha çok IGF gibi reprodüktif sistemi etkileyen faktörlerin de etkisiyle süperovulasyon yanıtlarını olumsuz etkilediği ayrıca yüksek besin içerikli veya proteinli rasyonlarla beslemenin de uterus metabolizmasını üre ve amonyak ve dolayısı ile iyonik dengeyi ve dolayısı ile reprodüktif verimi olumsuz etkilediğini ve dengeli bir rasyon oluşturmanın önemli olduğunu göstermektedir.

Beslemenin koyunlarda süperovulasyonun etkinliği üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında Lozano ve ark (2003), ad libitum kuru maddede ham protein düzeyi %16 ve metabolize olabilir enerji seviyesi 10,75 Mj olan mera otu ile beslenen, günlük ihtiyacın 1,5 katı enerjili yemle beslenen koyunlarla, düşük yemle (0,5 katı) beslenen koyunları karşılaştırmalı olarak kaydetmişlerdir. Besleme programından beş gün sonra 60 mg MPA içeren intravaginal sünger ile senkronizasyona başlanmış ve Folltropin-V ile azalan dozlarda standart

süperovulasyon protokolü uygulamışlardır. Adlibitum beslemenin sadece elde edilen oosit ve embriyo üzerine değil oosit ve embriyo kalitesi (gebeliğin 4. gününde toplanan embriyolarda) üzerine de, düşük beslemeli ve kontrol grubu diyetlerine göre zararlı etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca süperovulasyon sağaltımının yanıtının, düşük ve kontrol diyetlerinde benzer olduğu ancak düşük beslemeli diyette fertilizasyon kayıplarının postovulatorik proseslerden kaynaklanabileceğinin düşünüldüğü bildirilmiştir. Nitekim sunulan çalışmada da ham protein düzeyi en düşük grubun (grup 1) fertilizasyon oranının en düşük olduğu ve Cl sayısının (155'e göre 132) grup 3'e göre yüksek olmasına karşın koyun başına embriyo (4,3'e göre 4,8 ) sayılarının da daha düşük olduğu görülmüştür. Netice olarak Lozano ve ark (2003) ile aynı yönde postovulatorik süreçlerin rolü üzerine bir kez daha düşünülmüştür.

Perikonsepsiyon (-18 gün +6 gün) beslemenin süperovule koyunlarda oosit ve embriyo kalitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada Kakar ve ark (2005), günlük enerji ihtiyaçlarına göre (0,5; 1,0 ve 1,5 katı) kuru maddede %19,1 ham protein içeren rasyonla besleme yapmışlar ve uygulanan diyetin, ovulasyon oranını (sırasıyla; 15,4; 15,1 ve 16,1) ve koyun başına toplanan embriyo sayısını (10,9; 11,9 ve 12,4) değiştirmediğini, ancak düşük diyetle beslenen koyunlarda her bir blastosistteki hücre sayısının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu ve bu artışın da trofoektoderm hücrelerinin artışından kaynaklandığı bununda ve ICM (inner cell mass) hücrelerindeki artışla sonuçladığı bildirilmiştir. Sunulan çalışma verileri ilgili araştırıcıların verileri ile karşılaştırıldığında ise ovulasyon ve embriyo sayılarının daha düşük olduğu ancak sayısal farka karşın belirtilen oranlar açısından benzer olarak istatistiki olarak bir fark bulunmadığı gözlenmiştir.

$PGF_{2\alpha}$ ile senkronize edilmiş İvesi koyunlarında rekombinant follikül stimüle edici hormonun (rFSH) bazı fertilite parametleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında Yavuzer ve ark (2010), ikinci $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonundan 24 saat önce bir gruptaki koyunlara 10 IU Follitropin (rFSH, Puregon®) enjeksiyonu yapmışlardır. İkizlik oranının rFSH uygulanmayan gruba göre (%4,5-57) oldukça yüksek olduğu ve fertiliteyi artırmak amacıyla rFSH'nin alternatif olarak kullanılabileceği ancak fertilite üzerine etkisini ve süperovulasyon amacıyla kullanılımı için daha çok araştırmanın yapılması gerektiği bildirilmiştir (Yavuzer ve ark 2010). Rekombinant

FSH preparatlarının sunulan çalışmada kullanılmamış olmasına bir neden olarak henüz genellenemeyecek kadar az çalışmanın yapılmış olması gerekçe gösterilebilir.

Geleneksel protokollerin aksine sezonda doğal östrus gözlenerek, yani progesteron ile senkronize etmeden FSH-P ile yapılan süperovulasyon sağaltımından elde edilen embriyo sayısı ve kalitesinin değerlendirildiği bir çalışmada; bir gruba 12 gün süre ile 40 mg FGA içeren sünger takılırken diğer gruba takılmamış ve doğal östrus gözlenmiştir. Sünger takılan gruba süngerin çıkarılmasından 48 saat önce Cloprestenol enjekte edilmiş, her iki gruba da azalan dozlarda sekiz uygulama FSH-P tedavisi sonrası östrusun altıncı günü inguinal laparatomi yapılmış ve Cl sayıları kaydedilmiştir. Ayrıca sünger takılmayan gruba da luteolizisi indüklemek amacıyla östrusun altıncı günü Cloprestenol enjeksiyonu yapılmıştır. Cl sayıları sünger takılmayan grupta (9,3) sünger takılan gruba göre daha yüksek (7,0) bulunmuştur. Yine embriyo toplama oranları da sünger takılmayan grupta (6,2) sünger takılan gruba (5,6) göre daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte yine fertilizasyon oranları da sünger takılmayan grupta (%100) sünger takılan gruba (%80) göre daha yüksek bulunmuştur. Embriyo kaliteleri karşılaştırıldığında koyun başına iyi kalite (G1 ve G2) embriyo sayısı sünger takılmayan grupta (6,0) sünger takılan gruba göre (5,6) daha yüksek bulunurken, koyun başına kötü kaliteli (G3 ve G4) embriyo oranları (0,2) ve iyi kaliteli embriyo oranları (%96 ve %97)her iki grupta da birbirine yakın bulunmuştur. Embriyo toplama oranları ise (%67 ve %80) $P_4$ kullanılmayan grupta daha yüksek bulunmuştur (Mayorga ve ark 2011).Senkronizasyon, süperovulasyon ve uterus yıkama yöntemi açısından oldukça benzer olan çalışmada, CL sayıları, fertilizasyon oranları, embriyo eldeleri, embriyo toplama oranları ve iyi kalite embriyo sayıları çalışmaya göre yüksek olmasının düşük verimli yerli ırk faktörüne bağlı olabileceği düşünülmekle birlikte ırk faktörüne daha az bağlı olacağı düşünülen embriyo toplama oranlarının benzer olması çalışmanın başarılı olduğunu söyleyemeye imkan tanımaktadır.

### 4.4. Fertilizasyon Oranı Beslenme İlişkisi

Fertilizasyon oranları ile birlikte UFO sayısı da önem taşımaktadır. Nitekim gruplar arasında UFO sayıları açısından ise istatistiki olarak fark önemli ($p<0,05$) bulunmuş ve en yüksek UFO sayısına grup 2' de (39) rastlanırken 18 numaralı koyundaki UFO sayısı (16) tek başına neredeyse toplam UFO sayısının yarısı kadar

bulunmuştur. Bu aşırı değer çıkarılıp istatistik hesaplamarında bu deneğin UFO sayısı yerine grup ortalaması konulduğunda ise en az sayıda UFO sayısının grup 2 de olduğu görülmektedir. Grup 2' deki 21 numaralı denekteki yüksek süperstimülasyona karşın atılan oositlerin fertilize olamamasının büyük oranda koç'a bağlı olmak üzere bir çok faktöre bağlı olabileceği düşünülmektedir. Grup 2' deki belirgin UFO sayısı farkının istatistiki olarak da kanıtlanması farklı ham protein düzeyinde beslemenin UFO sayılarını etkilediğini göstermektedir. Grup 1 ve Grup 3' teki UFO sayıları ise sırasıyla 38 ve 34 olarak bulunmuştur. Ortalama her iki grupta da koyun başına yaklaşık 2 UFO elde edildiği görülmektedir. Azawi ve Al-Mola (2011) değerlerine göre ortalama UFO (2,66) sayıları sunulan tez çalışmasında daha düşük bulunmuştur.

Sunulan calışmada en yüksek proteinle beslenen grupta (%18), en yüksek fertilizasyon oranlarına (%66) ulaşılmıştır. Grup 2' deki (%75,75) ve grup 3' teki (%66,7) fertilizasyon oranları birbirine oldukça yakın iken grup 1' deki fertilizasyon oranı (%58,24) diğer iki gruba göre daha düşük bulunmuştur. Ancak fertilizasyon oranları açısından gruplar arasında istatistiki olarak fark bulunamıştır ($p<0,05$).

Sunulan çalışmada BUN değerlerinin ilgili bölümde bildirilen diğer bazı çalışmalardaki verilere göre yüksek olmasının fertilite düşüklüğüne neden olarak sunulabileceği düşünülmektedir. Nitekim yüksek proteinli rasyonlar ile beslemenin sığırlarda yüksek BUN ve MUN düzeylerine neden olduğu ve azalan fertilite ile ilişkili olduğu birçok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (Butler ve ark 1996, Elrod ve Butler 1993, Ferguson ve ark 1993, Jordan ve ark 1983).

Butler (2000), makalesinde yüksek rasyon proteininin plazma üre konsantrasyonunu artırdığını, böylece uterus ortamını değiştirdiğini ve fertilitenin de bundan olumsuz etkilenmesi dolayısıyla reprodüktif performansı düşürdüğünü bildirmiştir. Yine Butler (2000)' a göre progesteron seviyesinin azalması da yüksek proteinli rasyonlarla ilişkilendirilmektedir.

Kenny ve ark (2002), rasyon yüksek proteininin sistemik amonyum ve üre konsantrasyonunu artırdığını ve bunların da azalan fertilite ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada östrusları senkronize edilmiş düvelerde artan üre ve amonyum konsantrasyonunun sığır oviduktal sıvısındaki elektrolit ve nonelektrolit

konsantrasyonlarına etkisi araştırılmış ve oviduktal ortamdaki iyon değişiminin embriyonun yaşama gücünü olumsuz etkilediği de bildirilmiştir.

Fertilizasyon oranları ile BUN düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla aşımın olduğu beşinci gün BUN (BUN5) ölçümlerinin esas alınması gerektiği düşünülmuştür. Bu bağlamda BUN değerleri arasında istatistiki yönden bir fark bulunamamasına karşın grup 1, grup 2 ve grup 3' te sırasıyla BUN değerleri, 46 mg/dl, 51 mg/dl ve 50 mg/dl iken fertilizasyon oranları ile paralel olarak belirgin bir fark göstermediği gözlenmektedir. Tamminga (2006)' ya göre, sütçü ineklerde yüksek rasyon ham protein ve RDP düzeylerinin BUN seviyelerini artırdığını ve fertiliteyi olumsuz etkilediğini bildirmiştir. Tamminga' ya göre (2006), rasyon yüksek RDP düzeyi, yüksek amonyumun detoksifikasyonu ve atılımı için daha fazla enerjiye gereksinim duyulduğundan negatif enerji dengesini de daha olumsuz bir duruma sokmaktadır. Aminojenik yıkılımın son ürünleri olan amonyum ve üre ise preovulatör aşamada ve erken embriyonik gelişimde direkt olarak fertiliteyi olumsuz etkilemektedir.

Bir süperovulasyon çalışması olmamakla birlikte Sormunen-Cristian ve Jauhiainen (2002) besin kompozisyonları farklı rasyonlarla besledikleri 1 yaşında, 4-5 yaşında ve 7-8 yaşında Finnish Landrace koyunlarında yaptıkları çalışmada aşımdan 15 gün önce başlatılan ve aşım sonrası 7. güne kadar sürdürülen bir flushing programında ve tüm koyunlara koyun başına 1.5 kg saman ve farklı gruplara kuru maddede ham proteini %12.5 olan 0, 300 ve 450 g arpa tane yemi içeren konsantre yem düşecek şekilde beslenen hayvanlarda, konsantre yemin ham protein oranı tüm gruplarda birbiriyle aynı olmasına, genç ve yaşlı hayvanlarda besin alma ve besinden faydalanma oranları farklı olmasına karşın, konsepsiyon ve fertilizasyon oranları her üç grup içinde değişmemiştir. Nitekim sunulan tez çalışmasında koyunlara daha fazla konsantre yem sunulmuş ve ham protein oranları farklı rasyonlarla beslenmiş olmalarına karşın benzer şekilde aşımdan 15 gün önce beslemeye başlanmış olması ve genç hayvanların kullanılmış olmasına karşın fertilizasyon oranları açısından fark önemsiz bulunmuştur ($p<0,05$).

Ancak Ağaoğlu ve ark (2012), farklı FSH (Ovagen ve Folltropin) preparatları ile yaptıkları süperovulasyon sağaltımlarında yerli ırklarımızdan Karayaka ırkı ile çalışmışlardır. Yapılan çalışmada fertilizasyon oranları açısından istatistiki olarak

fark bulunamamasına karşın ovagen sağaltımında (%48) Folltropin sağaltımına (%100) göre daha düşük fertilizasyon oranlarına ulaşılmıştır. Bu çalışma da bize süperovulasyon sağaltımın da fertilite ile ilişkili olabileceği izlenimini vermiştir.

Fertilitenin çiftleşme veya tohumlama yöntemi gibi bir çok faktörden etkilenebileceği bilinmektedir. Nitekim Fukui ve ark (2010), bu faktörleri erkeğe ve dişiye bağlı faktörler olarak ayırmıştır. Erkeğe bağlı faktörler, aşım zamanı, motil spermatozoa oranı gibi sperma kalitesine bağlı bir çok faktörden oluşmaktadır. Diğer taraftan dişiye bağlı faktörleri ise $P_4$ sağaltımının süresi ve kullanılan $P_4$ türü, sezon, vücut kondüsyon skoru (VKS), fizyolojik statü, yaş ve çiftlik şartları oluşturmaktadır.

### 4.5. Embriyo Toplama Oranları Beslenme İlişkisi

Sunulan çalışmada embriyo elde etme veya toplama oranları gruplara göre sırasıyla %58,7; %54,69; %77,27 olarak bulunmuştur. Grup 1'de toplam 91 embriyo elde edilmiş ve koyun başına 4,3 embriyo toplanmıştır. Grup 2'de toplam 114 embriyo elde edilmiş ve koyun başına 5,4 embriyo toplanmıştır. Grup 3'de ise toplam 102 embriyo toplanmış ve koyun başına 4,8 embriyo toplanmıştır. Embriyo toplama oranları bakımından grup 3'te daha yüksek oranlara ulaşılmıştır. Nitekim Çok Gözlü Düzenlerde Ki-Kare Testi ile embriyo toplama oranları istatistiki olarak da karşılaştırıldığında bu farkın önemli olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir.

Embriyo toplama oranı ile ilişkili olabileceğinden çalışmanın son günü yani uterus yıkama günü yapılan BUN ölçümleri (BUN6) de istatistiki açıdan karşılaştırılmış ancak bir fark bulunamamıştır ($p<0,05$).

Nitekim embriyo toplama oranları Bari ve ark (2000)'nın aşım sezonunda Welsh dağ koyunu ve Scottish Blackface koyununda yaptıkları çalışmadaki embriyo toplama oranlarına (koyun başına yaklaşık 10) göre daha düşük bulunmuştur.

Wu ve ark (2011)'nın bulguları ise sunulan çalışmanın bulguları ile karşılaştırıldığında; koyun başına toplanan embriyo sayıları her üç grup için de (sırasıyla, 4.3, 5.4, 4.8) araştırıcıların bulgularına (7,85;9,27) göre daha düşük bulunmuştur.

Ağaoğlu ve ark (2012) ise, yerli (Karayaka koyunu) ırklarda oldukça düşük (ortalama 2,4-2,9) embriyo sayılarına ulaşmışlardır.

Azawi ve Al-Mola (2010) ivesi koyunlarında yaptıkları çalışmada toplam koyun başına embriyo eldeleri (4,66;4,83) sunulan çalışma sonuçlarına yakın bulunmuştur.

Embriyo toplama oranları, tekrarlayan FSH/eCG uygulamaları ile koyunlarda süperovulasyon yanıtlarını değerlendiren Forcada ve ark (2010)'nın verileri (%58-%78) ile karşılaştırıldığında sonuçların benzer olduğu görülmüştür. İlk süperovulasyon sağaltımında koyun başına elde edilen embriyo sayıları ise (9,2;8,6) çalışmanın sonuçlarından daha yüksek bulunmuştur.

Mayorga ve ark (2011)' ın Sarda koyunlarında intravaginal $P_4$ içeren sünger kullanmadan ve geleneksel yöntemle $P_4$ içeren intravaginal sünger ile senkronize ederek yaptıkları çalışmada ise embriyo toplama oranlarını; sırasıyla %67 ve %80 bulurken, koyun başına embriyo sayıları ise yine sırasıyla 6,2 ve 5,6 olduğu belirtilmiştir. Embriyo toplama oranları ve koyun başına embriyo sayıları çalışmamızla karşılaştırıldığında ise sonuçların birbirine benzer olduğu ve çok az farklılık gösterdiği görülmektedir.

### 4.6. Embriyo Kalitesi Beslenme İlişkisi

Farklı protein oranları içeren konsantre yemlerle beslenen gruplar arasında embriyo kalitesini her aşamada etkileyebileceği düşünüldüğünden BUN değerleri besleme başlangıcında (BUN1), senkronizasyon başlangıcında (BUN2), süperovulasyon başlangıcında (BUN3), $P_4$ süngerlerinin çıkarıldığı gün (BUN4), ilk aşım günü (BUN5) ve aşımnin 7. günü ya da yıkama günü (BUN6) ölçümleri ayrı ayrı karşılaştırıldığında istatistiki açıdan bir fark bulunamamıştır ($p<0,05$). Dolayısı ile BUN değerleri ile embriyo kalitesi de istatistiki olarak ilişkilendirilememiştir.

Gruplar embriyo kaliteleri açısından değerlendirildiğinde ise iyi kalite (G1 ve G2) ve kötü kalite (G3 ve G4) embriyolar açısından gruplar arasında istatistiki olarak bir fark bulunamamasına karşın, en yüksek sayıda iyi kalite embriyoya (57) %15 protein ile beslenen grup 2'de; en az sayıda kötü kalite embriyoya (8) ise %12 protein ile beslenen grup 1'de rastlanmıştır. Oransal olarak iyi ve kötü embriyo

sayıları karşılaştırıldığında ise grup 1' de %90 olan iyi kalite embriyo oranı, grup 2'de %76 ve grup 3'te ise %79 olarak hesaplanmıştır. Ancak oranlamadan çıplak sayısal değerlere bakıldığında en çok iyi kalite embriyo sayısının grup 2'de, en az iyi kalite embriyo sayısının ise grup 1'de olduğu görülecektir. Farklı protein düzeyinde beslemenin embriyo kalitesi üzerine etkisi düşünüldüğünde, çalışmamızda embriyo kalitesine göre embriyolar, iyi kalite (G1 ve G2) yani dejenerasyon oranı düşük, dondurulabilir ve transfer edilebilir, kaliteli embriyolar ve kötü kaliteli (G3 ve G4) yani dejenerasyon oranı yüksek, dondurulamaz ve transfer edilemez embriyolar olarak sınıflandırılmıştır. İstatistiki olarak önemsiz ($p<0,05$) olmakla birlikte grup 1'de 8 adet kötü kaliteli embriyo elde edilirken grup 2 (18 embriyo) ve grup 3'te (14 embriyo) çok daha fazla sayıda kötü kaliteli veya dejenere embriyo elde edilmiştir. BUN düzeyleri arasındaki fark önemsiz olmakla birlikte BUN ölçümleri embriyo kalitesi karşılaştırılması Çizelge 4.1'de yapılmıştır. Nitekim yüksek plazma üre nitrojen (PUN) seviyelerinin laktasyondaki sütçü ineklerde embriyo yaşama gücü üzerine zararlı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; uterus yıkamadan 30 gün önce alıcılar %9,6 ve %24,4 ham protein içeren ve vericiler %15,7 ve %21,9 ham protein içeren rasyonlarla beslendiğinde plazma üre nitrojen değerlerinin rasyon protein seviyelerinden etkilendiği ve doğru orantılı olarak arttığı ancak embriyo kalite dereceleri, aşamaları veya toplanan embriyo sayılarının PUN değerlerinden etkilenmediği bildirilmiştir (Rhoads ve ark 2006).

Nitekim Papadopoulos ve ark (2001), koyunlarda yaptıkları çalışmada rasyona farklı oranlarda üre ilavesinin in vivo ve in vitro oosit ve embriyo kalitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, rasyon üre seviyesinin artırılmasının blastosistten hatching ulaşma oranlarını ve blastosist elde etme oranlarını olumsuz etkilediği ancak bu farkların istatistiki olarak önemsiz olduğunu bildirmişlerdir.

Fayeh ve ark (2001), koyunlarda yüksek rasyon üre konsantrasyonunun 7 günlükten büyük embriyoların kalitesi üzerine herhangi bir zararlı etkisinin bulunmadığını ve bunun yüksek üre konsantrasyonun uterustan çok ovidukt ve follikül üzerine etkisinin bulunmasıyla açıklamışlardır.

Lozano ve ark (2003), yaptıkları çalışmada hem aşırı hem de yetersiz beslenen koyunların azalan IGF-I, insulin ve endometriyal progesteron konsantrasyonuna maruz kaldıkları ve süperovulasyon sonrası kontrol grubu

hayvanlara göre daha düşük kalitede embriyoya sahip olduklarını ayrıca özellikle aşırı beslemenin yetersiz beslemeye göre daha düşük kalite embriyo eldesine neden olduğunu da bildirmişlerdir. Dawuda ve ark (2002) ise, sütçü ineklerde, sindirilebilirliği yüksek üre ilaveli rasyonla beslemenin toplanan embriyo sayısı ve kalitesi ile ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, uzun süreli (tohumlamadan 10 gün öncesinden başlanarak) üre ilaveli rasyonla beslenen grubu kısa süreli (tohumlamadan embriyo toplama gününe -7 gün- kadar) besleme ile karşılaştırmışlardır. Kısa süreli beslenen grupta toplanan embriyo sayısı ve embriyo kalitesi diğer gruba göre önemli oranda azalmıştır. Kısa süreli veya hemen tohumlama sonrasında yani adaptasyon sağlamalarına imkan vermeden üre ilaveli beslemenin embriyo sayılarına ve kalitesine önemli zararlı etkilerinin olduğuna ve sütçü sığırların on gün içerisinde yüksek ürenin toksik etkilerine adaptasyon sağlayabildikleri sonucuna varmışlardır.

Sunulan tez çalışmasındaki koyunlara entansif besleme nedeniyle yiyebilecekleri kadar kaliteli kaba yem verilmiş olması nedeni ile yetersiz besleme veya aşırı besleme gibi tanımlarla eşdeğer bir betimleme yapmak anlamlı olmayacaktır. Bununla birlikte ek olarak düşük proteinli (%12) ve yüksek proteinli (%18) konsantre yemlerle beslenen koyunlarda yine istatistiki olarak bir fark bulunamamasına karşın, düşük proteinli konsantre yemle beslemenin daha az sayıda kötü kalite embriyo eldesine neden olduğu görülmektedir. Beslemenin toplanan oosit ve embriyoların morfolojik ve fonksiyonel kalitesini etkilediğini bildirdikleri çalışmada Lozano ve ark (2003), koyunlarda aşırı beslemenin embriyo mortalitesini artırdığını ve embriyo gelişimini yavaşlattığını bildirmişlerdir. Bulgular ışığında araştırıcılar yüksek enerjili diyetin embriyo gelişimi, fertilizasyon ve oosit gelişim kapasitesine etkileri olumsuz olmakla birlikte düşük diyetle beslenen grupta az sayıda iyi kalite embriyo eldesine karşın gelişim geriliği görülmemiş ve UFO sayısı daha düşük bulunmuştur. Özet olarak ad libitum diyetin superovulasyon sağaltımı üzerine, oosit ve embriyo kalitesi ve embriyo yaşama gücü üzerine zararlı etkileri bulunan bir diyet şekli olduğu bildirilmektedir. Düşük diyetle beslemenin kontrol grubuna göre süperovulasyon sağaltımı üzerine etkisi daha iyi olmasına karşın fertilizasyon oranlarının da daha düşük olduğu bildirilmiştir. Yine aynı şekilde benzer çalışmalarında Abecia ve ark (1995), yetersiz beslemenin fertilizasyondan 2 hafta sonra embriyo gelişimini yavaşlattığını ve gebeliğin ilk 2 haftasında embriyo

mortalitesini artırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca koyunlarda süperovulasyon cevaplarının ve embriyo elde etme oranlarının bireysel olarak büyük varyasyon gösterebileceği bildirilmektedir (Bari ve ark 2001).

Karşılaştırmalar ışığında yüksek proteinli konsantre yemle beslenen grupta embriyo toplama oranlarının yüksek çıkması ya da daha çok embriyo toplanabilmiş olması nedeniyle iyi kalite embriyo sayıları düşük proteinli ilk gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak en yüksek toplama oranlarına ulaşılamamış olmasına karşın %15 proteinli konsantre yem ile flushing yapılan grup 2'de iyi kalite embriyo sayısı her iki gruptan da daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç %15 proteinli konsantre yem ile ek beslemenin istatistiki olarak önem arzetmese de ($p<0,05$) çok sayıda transfer edilebilir iyi kalite embriyo eldesi için daha anlamlı ve mantıklı seçim olduğunu söyleme imkanı vermektedir. Bunu verilere dayanarak, düşük proteinli konsantre yemle ek beslemenin az sayıda iyi kalite embriyo eldesine neden olduğu yüksek proteinli konsantre yemlemenin yüksek embriyo kazanım oranlarının etkisi olmakla birlikte daha çok sayıda iyi kalite embriyo eldesine neden olduğu ancak %15 proteinli konsantre yemle beslemenin daha yüksek, süperstimülasyon, süperovulasyon ve fertilizasyon oranlarına ve daha çok sayıda iyi kalite embriyo eldesine neden olduğu şeklinde yorumlamak da mümkündür. Yine follikül sayılarının en düşük proteinli konsantre yem ile beslenen grupta önemli oranda ($p>0,05$) daha yüksek bulunması düşük proteinin bir takım mekanizmalar ile ovulasyon oranlarını olumsuz etkilediği sonucunu doğurduğu düşünülmektedir. Nitekim ovule olmayan oosit sayılarının da grup 1'de diğer gruplara göre önemli oranda ($p>0,05$) yüksek olması düşük proteinle besleme sonucunda fertilizasyon kayıplarının da oluşabileceğini göstermektedir.

Yardımcı reprodüktif teknoloji uygulamalarının, koyun, keçi ve sığır gibi çiftlik hayvanlarında genetik gelişme üzerine özel öneminin olduğu bilinmektedir (Cognie ve ark 2003; Mapletoft and Hasler 2005). Koyunlarda çoklu ovulasyon ve embriyo üretim teknolojileri (MOET) sadece genetik materyalin korunması amacı ile değil üstün genetik kapasiteye sahip dişilerden elde edilen döllerde genetik gelişimi hızlandırmak amacıyla da uygulanmaktadır (Bettencourt et al. 2008). Embriyo üretimi ve reprodüktif verimi artırmaya yönelik bu teknolojilerden sunulan tez çalışmasında sıklıkla bahsedilmiştir. Özellikle küçükbaş hayvancılıkta veteriner reprodüksiyon alanındaki reprodüktif verimi artırmaya yönelik bilimsel çalışmalarda

gelişmiş ülkelere ulaşılmış olmasına karşın bu uygulamaların sahaya uyarlanmasında veya geliştirilmesinde yetersiz kalınmıştır. Bu değişim ve gelişime, çiftleştirme veya tohumlama yöntemi, uygulanan senkronizasyon ve süperovulasyon yöntemi, koyunun ırkı, yaşı ve elbette uygulanan flushing sisteminin rolünün de önemli etkilerinin olduğunun bilinmesi gerekmektedir. Bugün, aynı şartlarda barındırılan, beslenen ve aynı uygulamaların yapıldığı koyunlardan elde edilen embriyo sayısı ve kalitesinde ve dolayısıyla bununla ilişkili süperovulasyon sağaltımına yanıtta bireysel farklılığının önemli olduğu da bilinmekte ve göz önünde tutulmakta ve bu noktada eldeki veriler incelendiğinde bize genetik kapasiteyi bir kez daha anımsatmaktadır (Michels ve ark 1998).

# 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bugünkü bilgilerimize göre ülkemiz yerli ırk koyunlarında uygulanan mevcut flushing yöntemlerinin birkaçı hariç, baz alınabilecek kadar genellenebilir ve yaygın hale gelememiştir. Nitekim geleneksel anlamıyla flushing denince genellikle akla enerji düzeyi yükseltilmiş besleme getirilmekte (Nursoy ve ark 2006, Kia ve ark 2012, Mohajer ve ark 2013) veya hem enerji hem de protein oranı yükseltilmiş ve ilave besin takviyeleri kullanılmış (Ermin ve Yurtman 1999, Esen ve Bozkurt 2001, Demiral ve İşcan 2012) flushing uygulamalarına rastlanılmaktadır. Ancak flushingin ve dolayısı ile protein ve enerji seviyesi yükseltilmiş yemlemenin, uterus pH'sını ve sıcaklığını, kan üre nitrojen seviyesini ve dolaylı olarak ovaryum, uterus ortamını ve embriyoyu etkileme derecesi göz önünde tutulmalıdır. Nitekim bu konuda sunulan çalışmaya benzer bulguları içeren ayrıntılı bir çalışmayla karşılaşmak da mümkün olmamıştır. Bu manada sunulan tez çalışmasının bir amacı da flushinge farklı etkileşimler ve bakış açılarıyla farklı bir bilimsel yaklaşım getirebilmek, dolayısıyla bu konuda yapılacak bilimsel araştırmalara yeni bir anlayış kazandırabilme çabasının yanında, ülkemiz koyunculuğuna ve hayvancılığına katkı sağlayabilmektir.

Sonuç olarak:

- Farklı ham protein oranlarına sahip konsantre yemler (%12, %15, %18) ile flushing yapılmış koyunlarda özellikle uzun süreli beslemelerde yüksek BUN düzeylerinin olumsuz etkisinin büyük oranda tolere edilebildiği veya yerli ırkların proteinin sindirimi sonrası rasyon proteinini mikrobiyal proteinlere dönüştürme ve açığa çıkan amonyak ve üreyi nitrojen siklusunda daha az değerlendirme kapasitesine sahip olduğu,

- Rasyon ham protein düzeyinin dolayısı ile protein metabolizması sonucu oluşan ürenin reprodüktif verimlilik üzerine önemli bir olumsuz etkisinin olmayacağı,

- Rasyon protein miktarının uterus pH'sı ve sıcaklığı üzerine bir etkisi bulunmamakla birlikte ölçümlerinin corpus uteriden yapılmasının bunda bir etkisinin olabileceği ve ovidukt ortamının daha çok embriyo kalitesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

- Embriyo kalitelerinin yüksek protein düzeyi ile beslenen koyunlarda süperstimülasyon sonucu oluşan çok sayıda follikülden salgılanan artan folliküler östrojen (Meza-Herrera ve ark 2008) seviyesinin etkisi ile olumsuz etkilenebileceği sonucuna varılmıştır.

- Ürenin uterus ortamından daha çok folliküler gelişim veya ovidukt ortamını etkilenmesine bağlı olarak uterus fizyolojisinin dolayısı ile uterus pH ve scaklığının etkilenmediği ve ürenin olumsuz etkilerinin metabolik olarak reprodüktif bazda kompanze edilebildiği düşünülmektedir.

- Kan üre nitrojen seviyelerinin hızlı bir metabolik aktiviteye maruz kalmaları nedeniyle kısa süreli rasyon değişimlerine etkisinin araştırılması ve özellikle süperovulasyon ve embriyo blastosist oluşum aşamalarında da sık bir metabolik aktivite takibi gerektiği düşünülmektedir.

- Ham protein düzeyinin embriyo kalitesi üzerine etkisini araştırmak ve daha bilimsel bir flushing programı oluşturabilmek amacıyla sadece rasyon ham protein düzeyinde kalmayıp, rumende sindirilme derecelerinin yanı sıra kullanılan protein kaynaklarının içerisindeki her biri farklı bir metabolik, hormonal ve enzim siteminde görevli olan aminoasit çeşidinin ve düzeyinin de ovaryum, uterus ve embriyo bazında değerlendirilmesi ve araştırılması, bunun yanında bireysel olarak veya ırk bazında verilen proteinlerin rumende mikrobiyal proteinlere dönüşümü ve değerlendirilmesi kapasitesinin de araştırılması gerektiği düşünülmekte bu çalışmanın yapılacak çalışmalara bu konularda bir perspektif kazandırması beklentilerimizi oluşturmaktadır.

# 6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## Koyun Rasyonundaki Ham Protein Oranının Kan Üre Nitrojen, Ovaryum Fonksiyonu, Fertilizasyon, Uterus Fizyolojisi ve Embriyo Kalitesi Üzerine Etkisi

**İrfan TUR**

**Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ / KONYA-2014**

Sunulan çalışmada amaç, seksüel sezondan hemen önce ek konsantre yem ile flushing yapılan ve bir süperovulasyon programına alınan bazı yerli koyun ırklarında, ham proteinin, kan üre nitrojen, ovaryum fonksiyonu, fertilizasyon, uterus fizyolojisi ve embriyo kalitesi üzerine etkisini araştırmaktır. Koyunlar senkronizasyon programına alınmadan en az 15 gün önce %12 (n=21) %15 (n=21) ve %18 (n=21 ham protein içeren konsantre yemlerle kaba yeme ek olarak flushing besisine alınmıştır. Senkronizasyon amacıyla 12 gün süreyle FGA içeren süngerler intravaginal olarak uygulanmış ve izleyerek pFSH ile azalan dozlarda 8 doz süperovulasyon sağaltımı uygulanmıştır. Doğal aşım yoluyla fertilitesi kanıtlanmış koçlarla birebir çiftleştirilen koyunlardan östrusun 7. günü sabahı laparatomi ile karın boşlukları açılarak uterus yıkama ile blastosist aşamsındaki embriyolar toplanmıştır. Toplanan embriyolar kalitelerine göre IETS kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

Farklı günlerde ölçülen BUN değerleri açısından gruplar arasında istatistiki olarak fark önemsizdir ($p<0,05$). Ancak protein seviyesi arttıkça ortalama BUN değerlerinin de arttığı gözlenmektedir. Uterus fizyolojisi açısından yıkama esnasındaki uterus pH'sı ve sıcaklığı arasında istatistiki olarak fark önemsizken ($p<0,005$) protein seviyesi arttıkça uterus pH'sının azaldığı izlenmiştir. Ovaryum fonksiyonu açısından gruplara göre toplam ve ortalama luteal oluşumlar karşılaştırıldığında istatistiki açıdan fark önemsiz ($p<0,05$) olsa da toplam ve ortalama olarak grup 2'de en yüksek (181;8,61) CL sayısına ulaşılırken grup 3 (132;6,28) ve grup 1 (155;7,38) de daha az sayıda luteal oluşum saptanmıştır. Yine istatistiki olarak bir fark bulunamasa da fertilizasyon oranları açısından en yüksek fertilizasyon oranlarına grup 2'de ulaşılmıştır. Nitekim yine istatistiki yönden önemsiz olmakla ($p<0,05$) birlikte en çok sayıda iyi kalite embriyoya da grup 2'de rastlanılmıştır.

Sonuç olarak fertilize olmayan oosit sayısındaki ve ovule olmayan follikül sayısındaki önemli orandaki ($p<0,05$) yükseklik ve iyi kalite embriyo sayılarının, özellikle grup 1'e göre daha yüksek olması nedeniyle seksüel sezon öncesi ve esnasında kaliteli kaba yeme ilaveten %15 proteinli konsantre yemle ek beslemenin, reprodüktif performansı artırmak ve iyi kalite ve daha çok sayıda embriyo elde etmek amacıyla kullanılabileceği ancak konu ile ilgili daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Embriyo kalitesi, Flushing besleme, Süperovulasyon, Uterus pH'sı, Üre nitrojen.

# 7. SUMMARY


**Effect of Dietary Crude Protein Ratio on Blood Urea Nitrogen, Ovarian Function, Fertilization, Uterine Physiology and Embryo Quality in Sheep**

Aim was to evaluate effect of crude protein on blood urea nitrogen (BUN) ovarian function, fertilization, uterine physiology and embryo quality in some native breeds ewes exposed to superovulation program after feeding with additive concentrate feeding just before sexual season. Ewes were fed a concentrate feeding containing 12% (n=21), 15% (n=21) and 18% (n=21) crude protein starting minimum 15 days before synchronizastion protocol as flushing. For synchronization of estrus FGA intravaginal sponge was inserted for 12 days and pFSH examined for 8 decreasing dose for superovulation. The morning of seventh days uterus flushed and embryos reached blastosist stage was recovered by laparatomy after each ewe propagated for one to one with fertility proven rams. Recovered embryos was qualified under the IETS criterios.

There were no statistical differences between BUN values measured at different days ($p<0,05$). But increasing protein levels with elevated BUN values were observed. In terms of uterus physiology by means of pH and temperature was assessed in uterus flushing although there were no statistical differences ($p<0,05$) when the protein levels increasing uterus pH elevated was followed. Ovarian function in terms of groups according to the total and the average luteal formation compared difference was statistically insignificant ($p <0,05$), but the total and average values, group 2 has the highest (181;8,61) the number of CL, while group 3 (132;6,28) and group 1 (155;7,38) were detected in fewer luteal formation. Conversely, a statistically significant difference found, in terms of fertilization rate the highest in group 2 was reached. Indeed, but still statistically insignificant aspects ($p <0,05$) together with the large number of good quality embryos in group 2 were observed.

As a consequences in the number of unfertilized oocytes and anovulated follicles significantly ($p<0,05$) high in good quality embryosespeciallyaccording to group 1 claim that before and during sexual season the alfalfa feeding in addition to 15% protein concentrate additional feeding is improving reproductive performance and good quality and total number of embryos in order to obtain more couldutilize about, but more work needs to be done on the subject is thought to be.



**Key Words:** Feeding flushing, Quality of embryo, Superovulation, Urea nitrogen, Uterus pH.

# 8. KAYNAKLAR


1. Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, McMillen SM. Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian folliCles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. J Anim Sci. 1995;61:57–62.

2. Abecia JA, Lozano JM, Forcada F, Zarazaga L. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. Anim Reprod Sci. 1997;48: 209–218.

3. Abecia JA, Forcada F, Gonzalez-Nulnes A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. Anim Reprod Sci. 2012;130; 173-179.

4. Ağaoğlu AR, Kaymaz M, Korkmaz Ağaoğlu Ö, Karakaş K, Pir Yağcı İ, Taşdemir U. Effect of different gonadotropin preparation on ovulatory response and embryo yield in Karakaya ewes. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2012;18(5): 861-864.

5. Akçapınar H. Koyun Irkları, In: Koyun Yetiştiriciliği. 2. Baskı, Ankara. Ismat matbaacılık. 2000; 87-122..

6. Alaçam E. Hormonların klinik kullanımları. In: Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite, 2. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, 1999: 43-56.

7. Amiridis GS and Cseh S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. Anim Reprod Sci. 2012; 130: 152-161.

8. Antunovic Z, Novoselec J, Sauerwein H, Speranda M, Vegara M and Pavic V. Blood metabolic profile and some of hormones concentration in ewes during different physiological status. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2011;17: 687-695.

9. Ashworth CJ, Toma LM, and Hunter GM. Review. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: Implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. Phil Trans R Soc B. 2009; 364: 3351-3361.

10. Asselin E, Bazer FW, Fortier MA**.** Recombinant ovine and bovine interferon tau regulate prostaglandin production and oxytocin response in cultured bovine endometrial cells. Biol Reprod. 1997;56:402–408.

11. Ataman MB, Aköz M, Akman O. Induction of synhronized oestrus in akkaraman cross-bred ewes during breeding and anestrus seasons : the use of short term and long term progesterone treatments. Revuede Medecine Veterinaire. 2006;157: 257-260.

12. Ataman MB, Aköz M, Fındık M ve Saban E. Geçiş dönemi başındaki akkaraman melezi koyunlarda farkli dozda flourogestene acetate, norgestomet ve PGF2alfa ile senkronize östrusların uyarılması. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2009;15: 801-805.

13. Azawi OI and Al-Mola MKMA. A study on superovulation using FSH and eCG in Awassi ewes. Trop Anim Health Prod. 2010; 42: 799-801.

14. Azawi OI and Al-Mola MKMA. A study in the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic itrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulation. Trop Anim Health Prod. 2011; 43: 1351-1355.

15. Baby TE and Bartlewski PM. Progesterone as the driving regulatory force behind serum FSH concentrations and antral follicular development in cyCling ewes. Reprod Fertil Dev. 2011; 23: 303-310.

16. Barbato O, Sousa NM, Debenedetti A, Canali C, Todini L, Beckers JF. Validation of new pregnancy associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. Theriogenology. 2009; 72: 993-1000.

17. Bari F, Khalid M, Haresign W, Murray A, Merrel B. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a moet program in sheep. Theriogenology. 2000;53: 727-742.

18. Bari F, Khalid M, Wolf B, Haresign W, Murray A, Merrel B. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. Theriogenology. 2001;56: 147-155

19. Barrett DMW, Bartlewski PM, Huchkowsky SL, Duggavathi R, Rawlings NC. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12 day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. Theriogenology. 2004;61: 311-327.

20. Bartlewski PM, Beard AA, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A and Rawlings NC. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cyCle in breeds of sheep differing in prolificacy. J Reprod Fertil. 1999;115: 111-124.

21. Bartlewski PM, Baby TE, Giffin JL. Reproductive cyCles in sheep. Anim Reprod Sci. 2011;124: 259-268.

22. Barton BA, Rosario HA, Anderson GW, Grindle BP, Carrol DJ. Effects of dietary crude protein, breed, parity, and health status on the fertility of dairy cows. J Dairy Sci. 1996;79: 2225-2236.

23. Baştan A, Küplülü Ş. Akkaraman ırkı koyunlarda melatonin ve progestagen uygulamalarının reprodüktif performans üzerine etkisi. Ankara Univ Vet Fak Derg. 1995;42: 263-270.

24. Bertram R, Helena CV, Gonzales-Iglesias AE, Tabak J, Freeman E. A tale of two rhytms: The emerging roles of oxytocin in rhythmic prolactin release. Journal of Neuroendocrinology 2010;22: 778-784.

25. Bettencourt EM, Bettencourt CM, Chagas e Silva J, Ferreira P, Manito CI, Matos CM, Romao RJ, Rocha A. Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. Small Animal Research. 2008;74: 134-139.

26. Bingöl M, Daskiran I, Cedden F, Demir AO, Yılmaz A. Inhibin immunization in Norduz sheep. Archiv Tierzucht. 2012;55: 179-183.

27. Bittman EL and Karsch FJ. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibiStelltory day length in the ewe. Biol Reprod. 1984;30: 585-593.

28. Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. Theriogenelogy. 2000;55: 1323-1340.

29. Borowczyk E, Caton JS, Redmer DA, Bilski JJ, Wielg RM, Vonnahme KA, Borowicz PP, Kirsch JD, Kraft KC, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. Effect of plane of nutrition on in vitro fertilization and early embryonic development in sheep. J Anim Sci. 2006;84: 1593-1599.

30. Butler WR, Calaman JJ, Beam SW. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. J Anim Sci. 1996;74: 858-865.

31. Butler WR. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. J Dairy Sci. 1998;81: 2533-2539. Metin içerisinde Butler ve ark. şeklinde yazılmış. Yayın tek isimli hazırlanmıştır. Düzeltiniz.

32. Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. Anim Reprod Sci. 2000;60-61: 449-457.

33. Butler WR. Relationship of dietary protein and fertility. Advances in Dairy Technology. 2005;17: 159-168.

34. Campbell BK, Dobson H, Baird DT, Scaramuzzi RJ. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory folliCle selection in sheep. Journal of Reproduction and Fertility. 1999;117: 355-367.

35. Canfield RW, Sniffen CJ, Butler WR. Effects of excess degrad- able protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. J Dairy Sci. 1990;73: 2342–2349.

36. Carcangiu V, Mura Consuleo M, Parmeggiani A, Piccione G, Bini PP, Cosso G, Ludriana S. Daily rhythm of blood melatonin concentrations in sheep of different ages. Biological Rhythm Resarch. 2013;44: 908-915.

37. Cardwell BE, Fitch GQ, Geisert RD. Ultrasonic evaluation for the time of ovulation in ewes treated with norgestomet and norgestomet followed by pregnant mare's serum gonadotropin. J Anim Sci. 1998;76: 2235-2238.

38. Caroline W and Summers PM. The recovery rate of embryos using eight different protocols of synchronization and superovulation in sheep. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. 1999;4: 13-19.

39. Cheeke PR. Applied Animal Nutrition, Feeds and feeding. 3rd edition. USA: Pearson Prentice Hall, 2005: 398-399.

40. Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo JA, Guerin Y, Ravault JP, Thimoer J, Pelletier J. Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. Anim. Reprod. Sci. 1992;30: 157-184.

41. Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. Theriogenology. 2003;59: 171-188.

42. Corbett JL and Ball AJ. Nutrition for maintanence In:Sheep Nutrition. Freer M, Dove H. 1st edition. Australia: CABI publishing, 2002;143-165.

43. Dawuda PM, Scaramuzzi RJ, Leese HJ, Hall CJ, Peters AR, Drew SB, Wathes DC. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality if embryos in lactating dairy cows. Theriogenology. 2002;58: 1443-1455.

44. Demiral K ve İşcan KM. Akkaraman ırkı koyunlarda flushing uygulamasının dölverimi özelliklerine etkisi. J Fac Vet Med Univ Erciyes. 2012;9: 23-28.

45. Deveci H. Üreme organlarının anatomisi. In: Alaçam E. Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite, 2. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, 1999: 1-11.

46. Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE. Prostaglandins regulate conceptus elongation and mediate effects of interferon tau on the ovine uterine endometrium. Biology of Reproduction. 2011;84: 1119-1127.

47. Driancourt MA, Gauld IK, Terqui M, Webb R. Variations in patterns of folliCle development in prolific breeds of sheep. J Reprod Fert. 1986 ;78: 565-675.

48. Dosky KN, Bameryn AO, Ameen GI. Nutritient digestion, rumen and blood parameters of Karadi lambs fed treated soybean meal. Adv Nutr Res. 2012; 1: 6-9.

49. Dursun N. Organ genitalia feminina. Veteriner Anatomi. 1. Baskı. Medisan yayınevi, Ankara, 1998: 161-176.

50. Duggavathi R, Bartlewski PM, Barret DMW, Gratton C, Bagu ET, Rawlings NC.. Patterns of antral follicular wawe dynamics and accompanying endocrine changes in cyClic and seasonally anestrous ewes treated with exogenous ovine folliCle stimulating hormon during the inter-wave interval. Biol Reprod. 2004;70: 821-827.

51. D'Alessandro A. Some effects of adding p-LH in defined amounts to purified p-FSH to modify FSH/LH ratios during the superovulatory treatment of anestrus ewes. Anim. Reprod. Sci. 1997;47: 91-98.

52. D'Alessandro AG, Martemucci G, Taibi L. How the FSH/LH raio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. Theriogenology. 2005;63: 1764-1774.

53. El-Hag FM, Fadlalla B, Elmadih MA. Effect of strategic supplementary feeding on ewe productivity under range conditions in North Kordofan, Sudan. Small Ruminant Research. 1998;30: 67-71.

54. Elrod CC and Butler WR. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. J Anim Sci. 1993;71: 694-701.

55. Ermin A ve Yurtman IY. Flushing rasyonlarında megapro kullanımının etkileri. Tarım Bilimleri Dergisi. 1999;5: 89-94.

56. Esen F ve Bozkurt T. Akkaraman ırkı koyunlarda flushing ve östrus senkronizasyonu uygulamasının dölverimi üzerine etkisi. Turk J Vet Anim Sci. 2001;25: 365-368.

57. Evans AC, Duffy P, Hynes N, Boland MP. Waves of folliCle development during the estrous cyCle in sheep. Theriogenology. 2000;53: 699–715.

58. Fahey J, Boland MP, O'Callaghan D. The effects of dietary urea on embryo development in superovulated donor ewes and early embryo survival and development in recipient ewes. Anim Sci. 2001;72: 395-400

59. FAOSTAT 2012

60. Ferguson JD and Chapula W. Interactions of nutrition and reproduction. J Dairy Sci. 1989;73: 746-766.

61. Ferguson JD, Galligan DT, Blanchard T, Reeves M. Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulnes of test information. Journal of Dairy Science. 1993;76: 3742-3746.

62. Forcada F, Ait Amer-Meziane M, Abecia JA, Maruel MC, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Asenjo B, Vazquez MI, Casao A. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. Theriogenology. 2010;75: 769-776.

63. Forcada F, Sanchez-Prieto L, Casao A, Palacin I, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Abecia JA. Use of laparoscopic intrauterine insemination associated with a simplified superovulation treatment for in vivo embryo production in sheep: a preliminary report. Anim Prod Sci. 2012;52: 1111-1116.

64. Fukui Y, Kohno H, Okabe K, Katsuki S, Yoshizawa M, Togari T, Watanabe H. Factors affecting the fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen-thawed semen during the non-breeding season. J Reprod Dev. 2010;56: 460-466.

65. Gazal BMOA. Different estrous induction protocols during the non-breeding season on Assaf ewes. A master of science thesis. Faculty of Graduate Studies, An-Najah National University, 2010. Nablus, Palestine.

66. Gelez H, Fabre-Nys C. The male effect in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. Hormones and Behaviour. 2004;46: 257-271.

67. Gibbons A, and Cueto M. Embryo Transfer in Sheep and Goats: A training manual. Bariloche Experimental Station, National Institute for Agricultural Technology, Argentina, 2011.

68. Gimenez D and Rodning S. Reproductive management of sheep an goats. Alabama A&M and Auburn Universities. Alabama Cooperative Extension System. 2007.

69. Goff KJ, Knight JW, Pelzer KD, Akers RM, Notter DR. Circannual changes in progesteron secretion in intact ewes luteinizing hormone secretion in ovariectomized estradiol-implanted ewes, and prolactin secretion in three sheep breeds anticipated to differ in seasonality of reproduction. Anim Reprod Sci. 2013;138: 194-202.

70. Gottfredson R. Hormonal control of ewe reproduction. Department of Animal University of Wisconsin, 2001. Available from; http://www.ansci.wisc.edu/extension-new%20copy/sheep/publications_and_proceedings/pdf/reproduction/hormonal%20control%20of%20ewe%20reproduction.pdf.

71. Guesdon V, Malpaux B, Delagrange P, Spedding M, Fabien C, Chesneau D, Haller J, Chaillou E. Rapid effects of melatonin on hormonal and behavioral stressful responses in ewes. Pschhoneuroendocrinology. 2013;38: 1426-1434.

72. Gürler H ve Fındık M. Dişi üreme sisteminin morfolojisi. In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. 1. Baskı. Malatya: Medipres. 2002: 3-13.

73. Hafez ESE. Anatomy of female reproduction. 6th edition. In: Hafez ESE. Reproduction in farm animals. 1993a: 20-55.

74. Hafez ESE. Hormones growth factors and reproduction. 6th edition. In: Hafez ESE. Reproduction in farm animals. 1993b: 59-93.

75. Hafez ESE. Assisted reproductive technology: Ovulation, manipulation, In Vitro Fertilization/ Embryo Transfer (IVF/ET). 6th edition. In: Hafez ESE. Reproduction in farm animals. 1993c: 461-502.

76. Hammon DS, Holyoak GR, ,Dhiman TR. Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows. Anim Reprod Sci. 2005;85: 195-204.

77. Hand JM. The flushing effect and expression of folliCle stimulating hormone receptor variants in sheep. A master of science thesis. Kansas State University, 2011. Manhattan, Kansas.

78. Howard HJ, Aalseth EP, Adams GD, Bush LJ, McNew RW, ,Dawson LJ. Influence of dietary protein on reproductive performance of dairy cows. J Dairy Sci. 1987;70: 1563-1571.

79. Iglesias RMR, Ciccioli NH, ,Irazoqui H. Ram induced reproduction in seasonally anovular Corriedale ewes: MAP doses for oestrous induction, ram percentages and post- mating progestagen supplementation. Anim Sci. 1997;64: 119-125

80. Jordan ER, Chapman TE, Holtan DW, Swanson LV. Relations of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood on high producing postpartum dairy cows. J Dairy Sci. 1983;66: 1854-1862.

81. Kakar MA, Maddocks MF, Lorimer MF, Kleemann DO, Rudiger SM, Hartwich KM, Walker SK. The effect of peri-conception nutrition en embryo quality in the superovulated ewe. Theriogenology. 2005;64: 1090-1103.

82. Kalkan C, Horoz H. Pubertas ve seksüel sikluslar. In: Alaçam E. Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite, 2. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, 1999: 33-34.

83. Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. Manual of Bovine Embryo Transfer. 1995. Japan Livestock Technology Association.

84. Karen AM, Kovacs P, Beckers JF, de Sousa NM, Szenci O. Plasma urea nitrogen in relation to pregnancy rate in dairy sheep. Anim Reprod Sci. 2011;124: 69-72.

85. Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Suzanne MM. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. Biol of Reprod. 1997;56: 303-309.

86. Kenny DA, Humpherson PG, Lees HJ, Morris DG, Tomos AD, Diskin MG, Sreenan JM. Effect of elevated systemic concentrations of ammonia and urea on the metabolite and ionic composition of oviductal fluid in cattle. Biol Reprod. 2002;66: 1797–1804.

87. Kia HD, Chapdareh WM, Khani AH, Moghaddam G, Rashidi A, Sadri H, Alijani S. Effects of flushing and hormonal treatment on reproductive performance of İranian Markhoz goats. J Anim Phys Anim Nutr. 2012;96: 1157-1164.

88. Koenig JM, Boiling JA, Bull LS. Energy and protein metabolism in ewes as influenced by age and dietary protein-calorie ratio. J Anim Sci. 1980;51: 1011-1022.

89. Kohn RA, Dinneen MM, Russek-Cohen E. Using urea nitrogen to predict nitrogen excretion and eficiency of nitrogen in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. J Anim Sci. 2005;83: 879-889.

90. Küçükersan K, Çetinkaya N, Küçükersan S, Bayram İ, Yıldız G. Niacin ve Avoparcinin Akkaraman toklularda bazı kan parametrelerine etkisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1996;43: 123-128.

91. Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, Morgan FJ, Isaacs NW. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature. 1994;369: 455-461.

92. Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts IGF, Bols PEJ. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo on danger? Part II. Reprod Domest Anim. 2008;43: 623-632.

93. Lindsay DR. The usefulness to the animal producer of research findings in nutrition on reproduction. Department of Animal Science & Production, University of Western Australia. 1976: 217-224. Available on:http://www.livestocklibrary.com.au/bitstream/handle/1234/6853/Lindsay76.PDF?sequence=1

94. Lopez-Sebastian A, Gomez-Brunet A, Lishman AW, Johnson SK, Inskeep EK. Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH. J Reprod Fertil. 1993;99: 437-442.

95. Lozano JM, Lonergan P, Boland MP, O'Callaghan D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. Reproduction. 2003;125: 543-553.

96. Mapletoft RJ and Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2005;1: 393-403.

97. Marini JC and Van Amburgh ME. Nitrogen metabolism and recyCling in Holstein heifers. J Anim Sci. 2003;81: 545-552.

98. Martemucci G and D'Alessandro AG. Sychronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF2alfa, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed time. Anim Reprod Sci. 2011;123: 32-39.

99. Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. 2001;36: 49-55.

100. Mayorga I, Mara L, Sanna D, Staletta C, Morgante M, Casu S, Dattena M. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. Theriogenology. 2011;75: 1661-1668.

101. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA. Animal nutrition. Harlow (UK), Sixth edition, Pearson Prentice Hall, 2001.

102. McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA, Palmer RM, Robertson. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. Anim Reprod Sci. 1995;39: 89-107.

103. McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA, Robertson IS. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. Anim Reprod Sci. 1997;47: 71-90.

104. McNatty KP, Heath DA, Hudson NL Reader KL, Quirke L, Lun S, Juengel LJ. The conflict between hierarchical ovarian follicular development and superovulation treatment. Reproduction. 2010;140: 287-294.

105. Mejia O, Palma- Irizarry M, Rosas J, Madrid-Marina V, Valencia MJ, Zarco L. Administration of recombinant bovine somatotropin (rbST) at the time of breeding in superovulated fertile and subfertile ewes. Small Ruminant Research. 2012;102: 51-56.

106. Mellado M and Valdez R. Synchronization of estrus in goats under range conditions treated with different doses of new or recyCled norgestomet implants in two seasons. Small Ruminant Res. 1997;25: 155-160.

107. Meza-Herrera CA, Hallford DM, Ortiz JA, Cuevas RA, Sanchez JM, Salina H, Mellado M, Gonzales-Bulnes A. Body condition and protein supplementation positovely affect periovulatory ovarian activity by non LH-mediated pathways in goats. Anim Reprod Sci. 2008;106: 412-420.

108. Michels H, Vanmontfort D, Dewil E, Decuypere E. Genetic variation of prenatal survival in relation to ovulation rate in sheep: A review. Small Ruminant Research 1998;29: 129-142.

109. Mohajer M, Alimon AR, Naslaji AN, Toghdory A, ,Kamali R. Effects of late flushing and ewe breed on lamb mortality at birth. Intl. Res. J Appl Basic Sci. 2013;4: 231-233.

110. Molle G, Branca A, Ligios S, Sitzia M, Casu S, Landau S, Zoref Z. Effect of grazing background anf flushing supplementation on reproductive performance in Sarda ewes. Small Ruminant Research. 1995;17: 245-254.

111. Murphy BD. Equine chorionic gonadotropin; an enigmatic but essential tool. Anim Reprod. 2012;9: 223-230.

112. Nagatani S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL, Jaffe CA. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. Endocrinology. 2000; 141: 3965-3975.

113. Nett TM, Turzillo AM, Baratta M, Rispoli LA. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of folliCle-stimulating hormone and luteinizing hormone. Domestic Animal Endocrinology. 2002;23: 33-42.

114. Noakes DE. Endogenous and exogenous control of ovarian cyClicity. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. Arthur' s Veterinary Reproduction and Obstetric. 9th edition. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2003: 3-61.

115. Noel S, Herman A, Johnson GA, Gray CA, Stewart MD, Bazer FW, Gertler A, Specer TE. Ovine placental lactogen specifically binds to endometrial glands of the ovine uterus. Biol Reprod. 2003;68: 772-780.

116. Nolan R, O'Callaghan D, Duby RT, Lonergan P, Boland P. The influence of short term nutritient changes on folliCle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. Theriogenology. 1998;50: 1263-1274.

117. Nursoy H, Yılmaz O, Denk H. Effects of flushing during normal breeding season on reproductive performance and birth weights of lambs in Akkaraman Ewes. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi. 2006;9: 92-99.

118. Ocon OM, Hansen PJ. Disruption of bovine oocytes and preim- plantation embryos by urea and acidic pH. J Dairy Sci. 2003;86: 1194–1200.

119. Olivera-Muzante J, Fierro S, Lopez V, Gil J. Comparision of prostaglandin and progesterone based protocols for timed artificial insemination in sheep. Theriogenology. 2011;75: 1232-1238.

120. O'Callaghan D, Yaakub H, Hytell P, Spicer LJ, Boland MP. Effect of nutrition an superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and sytemic hormone concentrations in ewes. J Reprod Fert. 2000;118: 303-313.

121. Orman ve Köy İlişkileri Genel Müdürlüğü. Orköy kredileriyle desteklenen koyun ırkları ve özellikleri, orman-köy ilişkileri genel müdürlüğü.

Erişim yeri: http://www.orkoy.gov.tr/ORKOY/AnaSayfa/desteklenenkoyunirklari.aspx?sflang=tr

Erişim tarihi:18.06.2014

122. Özyurtlu N, Bademkıran S. Koyunlarda östrus senkronizasyonu ve östrusu uyarma yöntemleri. DiCle Üniv Vet Fak Derg. 2010;1: 17-22.

123. Palacin I, Yaniz JL, Fantova E, Blasco ME, Quitin-Casorran FJ, Sevilla-Mur E. Factors affecting fertility after cervical insemination with cooled semen in meat sheep. Anim Reprod Sci. 2012;132: 139-144.

124. Papadopoulos S, Lonergan P, Gath V, Quinn KM, Evans ACO, O'Callaghan D, Boland MP. Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. Theriogenology. 2001;55: 1059-1069.

125. Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ. Feed intake affects metabolic Clearence rate of progesterone in sheep. Research in Veterinary Science. 1993;55: 306-310.

126. Pearse BHG, Mcmeniman NP, Gardner IA. Influence of body condition on ovulatory response to lupin (*Lupinus angustifolius*) supplementation of sheep. Small Ruminant Res. 1994;13: 27-32.

127. Piccione G, Caola G, Giannetto C, Grasso F, Runzo SC, Zumbo A, Pennisi P. Selected biochemical serum parameters in ewes during pregnancy, post-parturition, lactation and dery period. Animal Science Papers and Reports. 2009;27: 321-330.

128. Preston RL, Schnakenberg DD, Pfander WH. Protein utilization in ruminants. I. Blood Urea Nitrogen as affected by protein intake. J. Nutrition. 1965;86: 281-288.

129. Quan F, Zhang Z, An Z, Hua S, Zhao X, Zhang Y. Multiple factor affecting supervoulation in Poll Dorset in china. Reprod Dom Anim. 2011;46: 39-44.

130. Rashidi M Cedden F. Trans-cervical artificial insemination in ewes during out of breeding season. Macedonian Journal of Animal Science. 2013;3: 143-146.

131. Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM. Antral folliCle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. Animal Reprod Sci. 2003;78: 259-270.

132. Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. Anim Reprod Sci. 2001;65: 157-170.

133. Reynolds CK, Kristensen WB. Nitrogen recyCling though the gur and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. J Anim Sci. 2008;86: 293-305.

134. Rhoads ML, Rhoads RP, Gilbert RO, Toole R, Butler WR. Detrimental effect of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. Anim Reprod Sci. 2006;91: 1-10.

135. Robin N, Laforest JP, Lussier JG, Guilbault LA. Induction of estrus with intramuscular injections of GnRH or PMSG in lactating goats (capra hircus) primed with a pro- gestagen during seasonal anestrus. Theriogenology. 1994;42: 107-116.

136. Robinson JJ. Nutrition and reproduction. Anim Reprod Sci. 1996;42: 25-34.

137. Robinson JJ, Rooke JA, McEvoy TG. Nutrition for conception and pregnancy. In: Freer M and Dove H. Sheep Nutrition. 1st edition, UK, CABI publishing. 2002: 189-212.

138. Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA, Mitchell LM, McEvoy TG. Nutrition and fertility in ruminant livestock. Anim Feed Sci and Tech. 2006;126: 259-276.

139. Rowe JD, East NE. Comparison of two sources of gonadotropin for estrus synchronization in does. Theriogenology. 1996;45: 1569-1575.

140. Ryan JP, Hunton JR, Maxwell WMC. Time of ovulation in Merino ewes superovulated with PMSG and FSH- P. Reprod Fertil Dev. 1992;4: 91-97.

141. Salehi R, Kohram H, Towhidi A, Kermani Moakhar H, Honarvar M. Follicular development and ovulation rate following different superovulatory treatments in Chall ewes. Small Rum Res. 2010;93: 213-217.

142. Sarraseca A, Milne E, Metcalf MJ, Loblet GE. Urea recyCling in sheep: effect of intake. Br J Nutr. 1998;79: 79-88.

143. Scaramuzzi RJ, Downing JA, Campbell BK, Cognie Y. Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation. Aust Biol Sci. 1988;41: 37-45.

144. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG. A model for folliCle selection and determination of ovulation rate in the ewe. Reprod Fertil Dev. 1993;5; 459-475.

145. Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Munoz-Gutierrez M, Somchit A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. Reprod Nutr Dev. 2006;46: 339-354.

146. Schams D, Berisha B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. Domest Anim Endocrinol. 2002;23: 53-65.

147. Schatten H, Constantinescu GM. Developmental anatomy of reproductive organs. Anatomy of reprroductive organs. In: Comparative Reproductive Biology. 1st edition. Blackwell Publishing, UK, 2007a: 1-5.

148. Schatten H, Constantinescu GM. Developmental anatomy of reproductive organs. Anatomy of reprroductive organs. In: Comparative Reproductive Biology. 1st edition. Blackwell Publishing, UK, 2007b: 13-16.

149. Seidel GE, Seidel SM. Training manual for embryo transfer in cattle. Italy, FAO, 1991.

150. Sejian V, Maurya VP, Naqvi MK. Effect of thermal stress, restricted feeding and combined stress (thermal stress and restricted feeding) on growth and plasma reproductive hormone levels of Malpura ewes under semi-ari tropical environment. J Anim Physiol Anim Nutr. 2011;95: 252-258.

151. Selk G. Embryo transfer in cattle. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University, Oklahama, USA. 2002. Available in: http://www.osuextra.okstate.edu

152. Senger PL. The organization and function of the female reproductive system. In: Pathways to Pregnancy and Parturition. 2nd edition, printed in: Cadmus Proffessional Communications, USA. 2003a:10-43

153. Senger PL. Puberty. In: Pathways to Pregnancy and Parturition. 2nd edition, printed in: Cadmus Proffessional Communications, USA. 2003b:128-143.

154. Smith JT. Kisspeptin signaling in the brain: Steroid regulation in the rodent and ewe. Brain Res Rev. 2008;57: 288-298.

155. Smith OB, Akinbamijo OO. Micronutrients and reproduction in farm animals. Anim Reprod Sci. 2000;60-61: 549-560.

156. Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. J Reprod Fert. 1996;108: 101-106.

157. Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during follicular and early luteal phases of the estrus cyCle. Biol Reprod. 1997;56: 483-488.

158. Spencer TE, Bazer FW. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. Endocrinology. 1996;137:1144–1147.

159. Stellflug JN, Nett TM. Influence of exogenous melatonin and altered day length on reproductive performance of Polypay ewes. Theriogenology. 1988;29: 535-543.

160. Sümbüllüoğlu K, Sümbüllüoğlu V, Biyoistatistik, 7. Baskı, Ankara, Hatipoğlu Yayınevi, 1997; 48-204.

161. Tamminga S. The effect of the supply of rumen degradable protein and metabolisable protein on negatif energy balance and fertility in dairy cows. Anim Reprod Sci. 2006;96: 227-239.

162. Torell DT, Hume ID, Weir WC. Effect of level of protein and energy during flushing on lambing performance of Range ewes. J Anim Sci. 1972;34: 479-482.

163. Trevaskis LM, Fulkerson WJ.The relationship between various animal and management factors and milk urea and its association with reproductive performance of dairy cows grazing pasture. Livestock Production Science. 1999;57: 255-265.

164. Turgut K. Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis. Üriner sistem hastalıkları ve testleri. Sayfa; 354. 2. Baskı. 2000. ISBN: 975-94595-1-5.

165. TÜİK. Türkiyedeki Koyun varlığı. Haber Bülteni, Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2013, Sayı 16183.

166. Uysal H. Orköy kredileriyle desteklenen koyun ırkları ve özellikleri.

Erişim:http://www.orkoy.gov.tr/ORKOY/AnaSayfa/desteklenenkoyunirklari.aspx?sfl

Erişim tarihi 14.03.2013.

167. Vatja G, Holm P, Greve T, Callesen H. Vitrification of procine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. Acta Vet Scand. 1997;38: 349-352.

168. Veiga-Lopez A, Gonzales-Bulnes A, Tresguerres JAF, Dominguez V, Ariznavarrete C, Cocero MJ. Causes, characteristics and consequences of anovulatory folliCles in superovulated sheep. Domest Anim Endocrinol. 2006;30: 76-87.

169. Vinoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. Effect of long term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyClic ewes. Theriogenology. 1999;55: 993-1004.

170. Wankowska M. Influence of testicular hormones on somatostatin-GH system during the growth promoted transition to puberty. Theriogenology. 2012;77: 615-627.

171. Webb EC, van Niekerk WA, Lee K, Marais WJ. Reproductive performance of semi-intensively kept Döhne Merino ewes fed with different protein supplements. South African Journal of Animal Science, 2012;40: 451-454.

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

173. Wildeus S. Current concepts in synchronization of estrus: sheep and goats. J Anim Sci. 2000;77: 1-14.

174. Wilkins JF. Method of stimulating ovulation rate in merino ewes may affect conception but not embryo survival. Anim Reprod Sci. 1997;47: 31-42.

175. Wright JM. Photographic Illustrations Of Embryo Developmental Stage and Quality Codes. In: Seidel DA and Seidel SM. Manual of The International Embryo Transfer Society. 3rd edition, IETS Inc., USA. 1998: 167.

176. Wu W, Hanikezi, Yang M, Gong P, Wang F, Tian Y, Xu X, Fu X, Haqikezi, Tian K, Guo Z. Effect of two folliCle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep. African Journal of Bitotechnology. 2011;10: 15834-15837.

177. Yadi J, Moghaddam MF, Khalajzadeh S, Solati AA. Comparision of estrus synchronization by PGF2α, CIDR and sponge with PMSG in Kalkuhi ewes on early anestrous sheep. International Conference on Asia Agriculture and Animal IPCBEE vol. 13. Press, Singapore. 2011.

178. Yalçın S. Proteinler ve Metabolizması. In: Ergün A, Tuncer ŞD, Çolpan I, Yalçın S, Yıldız G, Küçükersan MK, Küçükersan S, Şehu A. Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları 1. Baskı, Ankara, Pozitif Matbaa. 2001; 43-55.

179. Yavuzer U, Zonturlu AK, Aral F. Effect of recombinant folliCle stimulating hormone (rFSH) on some fertility parameters in Awassi ewes syncronized with PGF2alfa in the breeding season. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2010;57: 241-245.

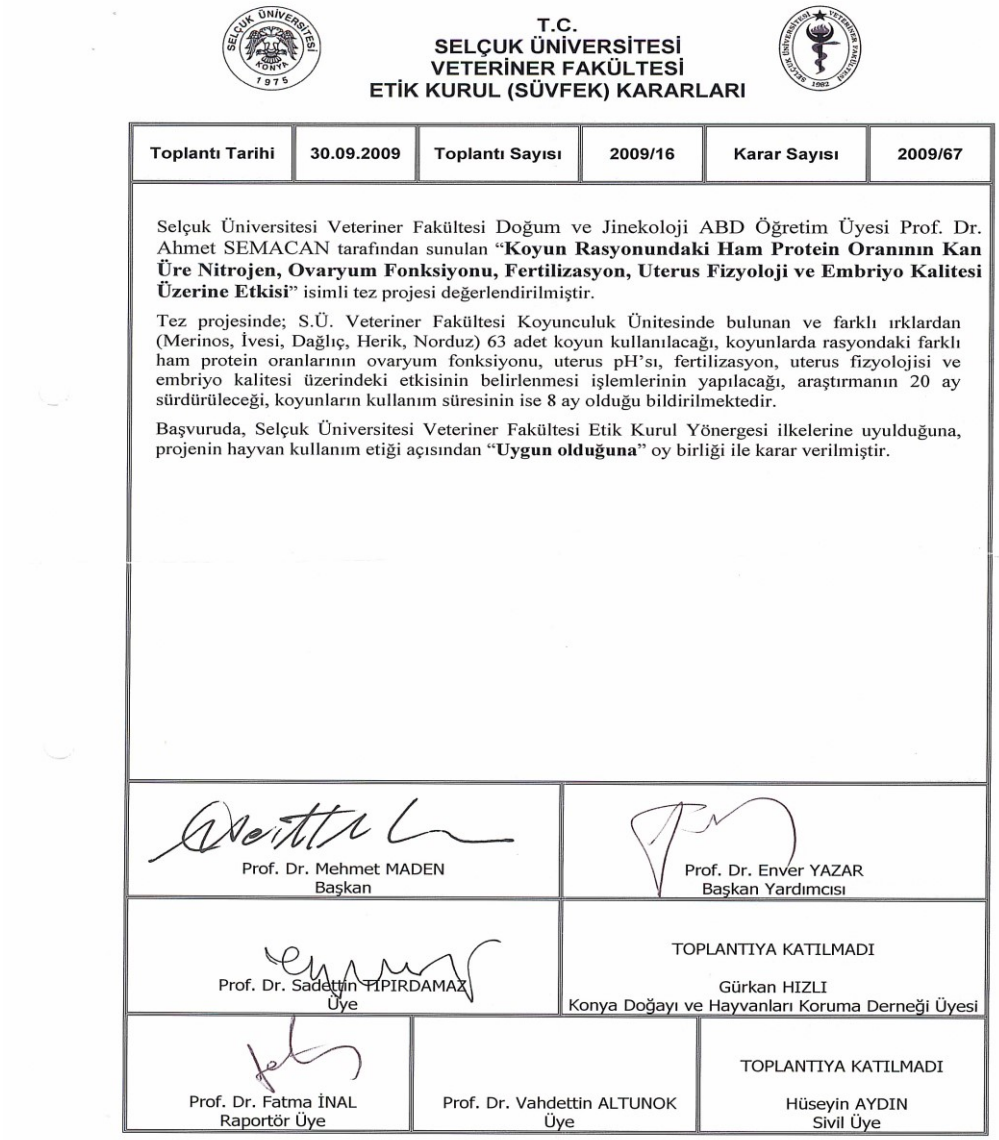
180. Yıldız G, Bayram İ, Küçükersan K. Kurutulmuş tavuk dışkısı ve rumen içeriğinin koyunlarda bazı kan parametrelerine etkisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1998;45: 53-59.

181. Young JM, Henderson S, Souza C, Ludlow H, Groome N, McNeilly AS. Activin B is produced early in antral follicular development and supresses thecal androgen production. Reproduction. 2012;143: 637-650.

182. Young LE, SinClair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. Rev Reprod. 1998;3: 155-163.

# 9. EKLER

## EK A. Etik Kurul Kararı



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURUL (SÜVFEK) KARARLARI

| Toplantı Tarihi | 30.09.2009 | Toplantı Sayısı | 2009/16 | Karar Sayısı | 2009/67 |
|---|---|---|---|---|---|

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet SEMACAN tarafından sunulan "**Koyun Rasyonundaki Ham Protein Oranının Kan Üre Nitrojen, Ovaryum Fonksiyonu, Fertilizasyon, Uterus Fizyoloji ve Embriyo Kalitesi Üzerine Etkisi**" isimli tez projesi değerlendirilmiştir.

Tez projesinde; S.Ü. Veteriner Fakültesi Koyunculuk Ünitesinde bulunan ve farklı ırklardan (Merinos, İvesi, Dağlıç, Herik, Norduz) 63 adet koyun kullanılacağı, koyunlarda rasyondaki farklı ham protein oranlarının ovaryum fonksiyonu, uterus pH'sı, fertilizasyon, uterus fizyolojisi ve embriyo kalitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi işlemlerinin yapılacağı, araştırmanın 20 ay sürdürüleceği, koyunların kullanım süresinin ise 8 ay olduğu bildirilmektedir.

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin hayvan kullanım etiği açısından "**Uygun olduğuna**" oy birliği ile karar verilmiştir.

| | | |
|---|---|---|
| Prof. Dr. Mehmet MADEN<br>Başkan | Prof. Dr. Enver YAZAR<br>Başkan Yardımcısı | |
| Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ<br>Üye | TOPLANTIYA KATILMADI<br>Gürkan HIZLI<br>Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi | |
| Prof. Dr. Fatma İNAL<br>Raportör Üye | Prof. Dr. Vahdettin ALTUNOK<br>Üye | TOPLANTIYA KATILMADI<br>Hüseyin AYDIN<br>Sivil Üye |

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Tunceli'de doğdu. Babası adalet dairesi memuru annesi ev hanımı idi. Biri kendisinden büyük üç kardeşi vardı. Türkiyenin çeşitli yerlerinde geçirdiği ilköğretim ve orta öğrenimi sonrası Ankara ili Elmadağ ilçesinde Elmadağ

Lisesinde lise eğitimimi tamamladı. Yine Ankara'da Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde 2006 yılında tamamladığı lisans eğitim ve öğrenimi sonrası 2007 yılı Şubat ayında Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladı. Ders dönemimi tamamladıktan sonra 2008 yılı 31 Aralık günü resmi olarak Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Burada doktora eğitimime tekrar başladı. 2009 yılı Nisan ayında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında yapılan doktora yeterlilik sınavını başarı ile geçtikten sonra, aynı yılın sonbahar aylarında tez çalışmalarına fiilen başladı. Şubat 2011'de Erasmus lisansüstü öğrenci hareketliliği başvurusu sonrası gittiği University of Life Sciences in Lublin/Polonya'da doktora eğitiminin beş aylık kısmında önemli klinik ve paraklinik tecrübeler edindi. Şubat 2013 itibarı ile de İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde akademik hayatına devam etmektedir.