

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

Hasan Rahim AĞHDAM<sup>1</sup>\*, Sema BİRLER\*\*  
Serhat ALKAN<sup>1</sup>\*, Serhat PABUCCUOĞLU\*\*

### Studies on oestrous synchronization and embryo transfer in and out of the breeding season in Kivircik ewes

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

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

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

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

Recipient ewes had an oestrus rate 91.67% and 53.85% respectively in and out of the breeding season ( $P < 0.05$ ). This rate was 100% in both donor groups. Oestrus behaviors began earlier ( $P < 0.001$ ) in recipients after the withdrawal of sponges in season (36<sup>th</sup> Hour 66.66%) than out-season (48<sup>th</sup> Hour 46.15%). Similarly most of the recipients (83.33%) were on heat at 36<sup>th</sup> hour in the season. This rate was highest (53.85%) at 48<sup>th</sup> hour out of the season ( $P < 0.001$ ).

In the season  $1.75 \pm 1.71$  and out of the season  $2.3 \pm 1.49$  corpus luteum were observed on the ovaries of the recipients. These values were  $4.43 \pm 2.83$  and  $4.57 \pm 4.19$  in the donors.

In the season  $1.71 \pm 1.83$  embryos and out of the season  $1.86 \pm 2.61$  per ewe were recovered from the donors by uterus flushing. In the season total 24 embryos were recovered from 14 ewes and 20 of these (83.33%) were transferable. Out of the season total 26 embryos were recovered from 14 ewes and 21 (87.50%)

\*: İlk yazarın Doktora çalışmasından üzelenmiştir.

\*\* : İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Döllerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı 34851, Avcılar, İstanbul

of these were transferable. In the season 14 of the recovered embryos were transferred to the uteri of 7 recipients and out of the season 20 embryos were transferred to 13 recipients. At the end of the gestation 3 of 7 ewes (42.86%) in the season and 3 of 13 ewes (23.07%) out of the season delivered ( $P>0.05$ ). Only one ewe from the out-season group had twins (7.69%).

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

**Key Words :** Ewe, embryo transfer, season, estrus synchronization

**Özet:** Çalışmada mevsim içi ve mevsim dışı senkronize Kıvrıkkırkı koyunlarında embriyo kazanımı ve bu embriyoların transferleri ile sezonun embriyo transferi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Bunun için mevsim içinde 12 alıcı ve 14 verici, mevsim dışında ise 13 alıcı ve 14 verici Kıvrıkkırkı koyun kullanıldı. Gruplardaki koyunlara MAP (Medroksi Progesteron Asetat) emdirilmiş süngerler 14 günlük süre için vajeni içine yerleştirildi. Alıcı koyunlarda süngerlerini çıkarılışından 24 saat önce 500 IU verici koyunlarda ise süperovulasyon oluşumuna için 36 saat önce 1500 IU PMSG kas içi yolla uygulandı. Sünger çıkarılışından itibaren her 12 saatte bir arama koçları aracılığı ile kızgınlıkta olan koyunlar belirlendi. Kızgınlık gösteren alıcılara 500 IU, verici koyunlara ise 1000 IU hCG uygulanarak verici koyunlar elde sıfat yitme mi ile tohumlandı. Vericilerin kızgınlık belirtileri kayboluncaya kadar her 12 saatte bir çiftleşmeleri sağlandı.

Östrus siklusunun 7. gününde verici koyunlar operasyonu alınarak uterus yıkaması ile embriyolar kazanıldı ve sağlığına görünümüne sahip olanlar senkronize edilmiş alıcı koyunların uteruslarına transfer edildi.

Alıcı koyunların mevsim içinde (%91.67) mevsim dışındaki kiler göre (%53.85) daha fazla oranda östrus gösterdikleri belirlendi ( $P<0.05$ ). Vericilerde ise östrus oranlarının her iki grupta da %100.0 olduğu gözlemlendi. Alıcı koyunlarda mevsim içinde hem östrüsün daha erken dönemde (36. saatte) başladığı, hem de östrüs gösteren hayvanlarda bu dönemde bir yoğunlaşma olduğu (%83.33) belirlendi ( $P<0.001$ ).

Mevsim içinde alıcı koyunların ovaryumlarında ortalama  $1.75 \pm 1.71$  adet korpus luteum belirlenen mevsim dışında ise bu sayı  $2.31 \pm 1.49$  oldu. Verici koyunlarda ise bu değerler sırasıyla  $4.43 \pm 2.82$  ve  $4.57 \pm 4.19$  olarak belirlendi.

Verici koyunlardan uterus yıkaması ile mevsim içinde koyun başına ortalama  $1.71 \pm 1.83$ , mevsim dışında ise  $1.86 \pm 2.61$  adet embriyo kazanıldı. Mevsim içinde kazanılan embriyoların %83.33 ünün (20/24), mevsim dışında kazanılan toplam embriyoların ise %87.50 sinin (21/26) transfer edilebilir olduğu gözlemlendi. Kazanılan embriyoların mevsim içinde 14 tanesi 7 alıcı, sezon dışında 20 tanesi ise 13 alıcının uterusuna transfer edildi. Gebelik süreleri sonunda mevsim içi 7 alıcıdan 3 tanesi (%42.86) 3 adet kuzu, mevsim dışında ise 13 alıcıdan 3 tanesi (%23.07) 4 kuzu doğurdu ( $P>0.05$ ). Mevsim içinde doğuran koyunlarda ikizlik gözlenmezken, sezon dışında doğum yapan koyunlardan sadece 1 tanesinde (%7.69) ikizlik gerçekleşti.

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

**Anahtar Kelimeler:** Koyun, embriyo transferi, sezon, östrus senkronizasyonu.

## Giriş

Embriyo transfer amacıyla vericilerde süperovulasyon oluşması için gonadotropinlerden PMSG, Porcine Follicle Stimulan Hormone (pFSH), Horse Anterior Pituitary Hormon (HAP), ve Human Menaposal Gonadotropin (HMG) hormonları kullanılmaktadır (6, 8, 10, 21, 23, 28, 33).

Mevsime bağlı kızgınlık gösteren ırklar, anöstrus döneminde süperovulasyona daha düşük düzeyde cevap vermektedirler (6). Süperovulator ajanlar genellikle siklustaki hayvanlarda luteal fazın sonuna doğru, progesteron uygulamasının bitiminde veya 48 saat öncesinde, prostaglandin kullanımı söz konusu ise 2. PGF<sub>2α</sub> uygulamasından 24 saat önce enjekte edilir (6). Ovulasyonların oluşması için koyunlara, bu hormon uygulamalarını izleyen birkaç gün içinde hCG, LH veya GnRH uygulanırken (4, 5, 10, 11, 22), ergin hayvanlarda bu hormonların verilmesi zorunlu görülmemektedir (11).

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

MAP içeren vajinal süngerleri (60 mg) 10 gün süreyle uygulayarak hayvanları senkronize eden Bary ve ark. (3), PMSG enjeksiyonundan 24 saat önce kas içi PGF<sub>2α</sub> (tiaprost-iliren-0.196 mg) uygulamış ve süngerlerin çıkarılmasından 48 saat önce de 1200 IU PMSG vererek ortalama 4.4 ± 6.0 korpus luteum elde etmişlerdir.

Çalışmalarında progesteronlu süngerlerle senkronize edilen koyunların bir grubuna 17 mg FSH'yi bölerek 5 enjeksiyonla ve diğer gruba da 1200 IU PMSG vererek süperovulasyon sağlayan Heard ve Walker (11), süngerler çıkarıldıktan 24-72 saat sonra 40 µg GnRH vererek ovulasyon oluşturmuşlardır. Birinci grupta ovulasyon sayısını, embriyo sayısını ve fertilizasyon oranını sırasıyla ortalama 11.3 ± 0.36, 7.88 ± 0.27, %83.7 ± 2.02 ve 2. grupta sırasıyla 7.47 ± 0.22, 4.78 ± 0.15 ve %86.9 ± 1.36 olarak saptamışlardır. Norgestomet miktarı üzerinde çalışan Hofman ve ark. (12), 3 veya 6 mg arasında kızgınlık gösterme açısından belirgin bir fark belirleyemezlerken, FSH'nin tek ve çift enjeksiyon uygulamaları arasında korpus luteum sayısı açısından (sırasıyla 0.98 ± 0.41 ve 6.15 ± 0.30) büyük fark bulmuşlardır.

Süperovulator ajan olarak Fin koyunlarında 1200, 1500, 1800 IU dozda PMSG kullanan Rainio (25), ortalama ovulasyonları sırasıyla 7.5 ± 4.4, 10.9 ± 7.1, 12.3 ± 4.9; transfer edilebilir embriyo sayısını da 5.5 ± 3.2, 5.7 ± 6.2 ve 5.1 ± 4.1 olarak saptamıştır. En ideal PMSG dozunun 1500 IU olduğunu belirten araştırmacı, elde edilen sonuçların PMSG'nin farklı dozuna ve ırka bağlı olarak değişebileceğini vurgulamıştır.

Koyunlarda östrusu ve tohumlamayı takiben embriyoların beşinci günde morula (32 blastomer), altıncı günde ise geç morula veya erken blastosist aşamasında olduğu bildirilmektedir (6). Embriyo kazanma işlemi fertilizasyondan itibaren embriyo zona pellucidayı terk edene kadar yapılabilmektedir (6). Ancak erken dönemdeki embriyolar çok hassas olduklarından ve manipulasyonlara fazla dayanıklı olmadıklarından genelde embriyo toplama işlemi 3-7. günlerde (Östrus-0. gün) gerçekleştirilmektedir (6, 8, 10, 20, 33). Ayrıca uterusu inmiş embriyolar genelde yüksek gebelik şansına sahip ve dondurma işlemine daha uygun olmasından dolayı tercih edilmektedirler (10). Yapılan çalışmalarda elde edilen embriyo sayısının, ovaryumlarda bulunan korpus luteum sayısının %40-80'i kadar olduğu bildirilmektedir (10).

Koyunlarda embriyo transferi cerrahi ve cerrahi olmayan yöntemlerle yapılabilmektedir (6, 10). Cerrahi yöntemler genel yada lokal anestezi altında laparotomi, laparoskopik veya basitleştirilmiş operatif yolla yapılabilmektedir; ancak günümüzde en yaygın kullanılan metod laparoskopik yöntemdir (7, 8, 18, 24, 28, 33, 39).

Gelişmiş dünya ülkeleri günümüzde bu ileri teknolojik çalışmalar için büyük hayvanlarında rutin olarak kullanılmasına rağmen Türkiye'de embriyo transferi gündeme gelememiştir. Ancak sınırlı da olsa veteriner fakülteleri bazında sığız, keçi ve koyunlarda deneysel embriyo çalışmaları yapılmıştır (14-17, 31, 34, 35).

Embriyo transferi pahalı bir yöntem olduğu için, hem yüksek gebelik oranları elde etmek, hem de yılın herhangi bir zamanında embriyo transferini gerçekleştirmek oldukça önem kazanmaktadır. Bundan dolayı sunulan çalışmada koyunlarda embriyo transferi tekniği ile elde edilecek gebelik oranları üzerine sezonun etkisini araştırılması hedeflenmiştir.

### Materyal ve Metot

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

Çalışma alıcı ve vericilerde östrus senkronizasyonu, vericilerde süperovulasyon, embriyoların kazanılması ve değerlendirilmesi ile embriyoların transferi olmak üzere dört aşamada gerçekleştirildi.

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

Mevsim dışı 27 koyun 13 alıcı ve 14 verici olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Daha sonra verici ve alıcılar transfer tarihlerine göre sırasıyla 5 gruba ayrılarak aynı gün vajinal süngerler uygulandı. Süngerler 14 gün süreyle vajinaya yerleştirildi. Alıcı koyunlara süngerlerin çıkarılışından 24 saat önce 500 IU PMSG kas içi enjekte edildi. Sünger çıkarıldıktan sonra her 12 saatte bir arama koçu ile kızgınlıklar tespit edilip, ilk kızgınlık görüldüğü anda alıcılara 500 IU hCG (Chorulon<sup>®</sup>, Intervet) kas içi yolla uygulandı. Vericilere ise, süperovulasyon oluşturmak için süngerlerin çıkarılışından 36 saat önce 500 IU PMSG kas içi uygulandı. Süngerler çıkarıldıktan sonra her 12 saatte bir arama koçu yardımıyla kızgınlık tespiti yapıldı. Östrusu başladığı tespit edilen koyunlara hemen 1000 IU hCG kas içi yolla enjekte edildi.

Mevsim içi grubunda bulunan 26 koyun, 12 alıcı ve 14 verici olarak 2 gruba ayrıldılar. Mevsim dışında olduğu gibi, yine alıcı ve vericilere aynı günlerde süngerler yerleştirildi ve 14 gün süreyle vajinada bırakılarak günlük kontrolleri yapıldı. Mevsim dışında olduğu gibi alıcı ve vericilerin PMSG ve hCG enjeksiyonları aynı şekilde gerçekleştirildi. Arama koçu ile kızgınlıkları tespit edildi ve vericilerin tohumlamaları gerçekleştirildi. Mevsim içi ve dışında vericiler elde sıfat yöntemi ile östrusları sonlanmaya kadar 12 saat ara ile tohumlandı.

Embriyoların kazanılması kızıgnlığın başlangıcından 7 gün sonra gerçekleştirildi. Embriyoların kazanılmasında ve transfer edilinceye kadar in vitro koşullarda saklanmasında %20 (v/v) inaktive edilmiş sığır serumu ile zenginleştirilmiş PBS (NaCl 136.9 mMol, CaCl<sub>2</sub> 0.9 mMol, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.5 mMol, KCl 2.7 mMol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mMol, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 8.1 mMol, kristal penisillin 100 IU/ml, Streptomisin sulfat 0.05 mg/ml) medyumunu kullanıldı.

Uterus yıkaması veya transfer yapılacak koyunlar (alıcı ve vericiler) 7 gün önceden operasyona hazırlık amacıyla aç bırakıldı. Genel sedasyon için 0.5 - 1.0 ml Rompun<sup>®</sup> (Xylazin) kas içi enjekte edildi.

Genel sedasyon sağlandıktan sonra 3 ml lidokain ile lumbo sakral anestezi uygulandı.

Lumbo sakral anestezi uygulanmasını takiben, embriyolar cerrahi yöntemle uterus yıkaması yapılarak kazanılırken, ovaryumlar üzerindeki korpus luteum ve folliküller sayılıp follikül çapları ölçülerek ovaryum bulguları saptandı.

Yıkama işleminde folley katateri uterus korpusunun apeksine yakın olarak yerleştirildi. Daha sonra ucu kütleştirilmiş bir enjektör iğnesi, uterotubal birleşme yerine yakın bir yerden lümenine sokularak 20 ml PBS medyumunu yavaş yavaş verildi. Folley kataterin dışında kalan ucu ise petri kutusuna yerleştirildi ve uterus içine verilen yıkama sıvısına, kornuya hafif masaj uygulayarak folley katateri aracılığı ile petri kutusuna akması sağlandı. Yıkama işlemi diğer kornu uteriye de tekrarlandı ve yıkamalar bitince uterus normal situsuna yerleştirilerek karın boşluğu kapatıldı.

Yıkama sıvısı içinden mikropipet aracılığıyla dışarıya alınan embriyolar, uterusdan gelen sıvı ve hücrelerden arındırılmak amacıyla, üç ayrı petri kutusu içinde bulunan PBS medyumundan ayrı ayrı geçirilerek yıkandılar.

Yapılan kontrollerde sağlıklı olarak nitelendirilen embriyolar kısa bir süre içinde (Yaklaşık 60 dakika içinde) taşıyıcı koyunlara transfer edildi.

Alıcılara vericilerde uygulanan cerrahi prosedürün aynısı uygulanarak ovaryum bulguları tesbit edildi. Korpus luteum şekillenmiş ovaryum tarafındaki kornu uteri saptandı ve transfer edilecek embriyolar 0.02 ml medyum içinde mikro pipete çekildi. Transferin gerçekleştirileceği kornu uteri önce kütt bir iğne ile delindi ve pipetin ucu bu delikten uterus sokularak, embriyo kornu uterinin apeksine doğru uterus lumenine verildi. Uterus özenle karın boşluğundaki normal yerine yerleştirilerek ensizyon yeri yöntemine uygun bir şekilde kapatıldı. Muhtemel enfeksiyonları önlemek için tetrasiklin grubu antibiotik (Panterramisin<sup>®</sup>- 3 cc) kas içi uygulandı ve bir hafta sonra dikişler alındı.

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

## Bulgular

Mevsim içi alıcı gruptaki 12 baş koyunun sadece 1 tanesinde kızıgnlık görüldü ve %91.67 oranında östrus elde edildi (Tablo 1). Kızıgnlık göstermeyen koyunun

**Tablo 1.** Mevsimlere göre alıcı ve verici koyunlarda sünger çıkarılışından itibaren yapılan kontrollerde kaydedilen östrus bulguları.

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

\*<sup>b</sup>: Farklı harfle belirtilen değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).

ovaryum incelenmesinde sol ovaryumun inaktif olduğu ve sağ ovaryumda 1 adet korpus luteumun varlığı saptandı. Mevsim dışı alıcılarda ise 13 koyundan 7 tanesinde (%53.85) kızgınlık saptandı (Tablo 1). Kızgınlık göstermeyen koyunlarda yapılan operatif incelemede 6 koyundan 5'inin ovaryumlarında korpus luteum ve follikül bulunduğu saptandı.

Mevsim içi alıcılarda senkronizasyon oranları mevsim dışı ile karşılaştırıldığında, mevsim içi bulguları mevsim dışına göre önemli derecede yüksek bulundu (P<0.05). Bu alıcılarda kızgınlıkların 24. saate başladığı, 72. saate bittiği ve 36. saate koyunların %83.3'ünün kızgınlıkta olduğu görüldü (Tablo 1).

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

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

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

Operasyonlar sırasında yapılan ovaryum incelemelerinde mevsim içi alıcılarda koyun başına düşen patlamamış follikül sayısı (Follikül sayısı/koyun) ortalama  $2.50 \pm 2.29$ , mevsim dışında ise  $1.69 \pm 1.20$  olarak saptandı (Tablo 2). Aynı şekilde alıcılarda mevsim içi korpus luteum sayısı ortalama  $1.75 \pm 1.71$ , mevsim dışında ise  $2.31 \pm 1.49$  olarak bulundu (Tablo 2). Mevsim içi ve mevsim dışı operasyona alınan alıcıların ovaryumlarında karşılaşılan mevcut normal ve kistik görünümlü folliküllerin ölçülerine göre dağılımları ise tabloda belirtildiği gibi gözlemlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Mevsim içi ve mevsim dışı senkronize edilen alıcılarda ovaryum bulguları ortalamaları.

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

Mevsim içi vericilerde patlamamış follikül sayısı ortalama  $9.07 \pm 5.57$ , mevsim dışı vericilerde ise  $4.57 \pm 3.01$  olarak gerçekleşti (Tablo 3). Bu hayvanlardaki ortalama korpus luteum sayısı  $4.43 \pm 2.82$ , mevsim dışında  $4.57 \pm 4.19$  olarak saptandı (Tablo 3). Mevsim içi ve mevsim dışı operasyona alınan vericilerin ovaryumlarında karşılaşılan mevcut folliküllerin ölçülerine göre dağılımları ise tabloda belirtildiği gibi görüldü (Tablo 3).

Tablo 3. Mevsim içi ve mevsim dışı senkronize edilen vericilerde ovaryum bulguları ortalamaları.

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

Kızgınlıkların belirlenmesinden 7 gün sonra operasyona alınan mevsim içi vericilerden koyun başına ortalama  $1.71 \pm 1.83$  adet embriyo kazanıldı. Kazanılan embriyoların değerlendirilmesi sonucu sağlıklı bulunanlardan ortalama  $1.43 \pm 1.55$  tanesinin transfer edilebilir nitelikte olduğu görüldü (Tablo 4). Mevsim dışı vericilerden ortalama  $1.86 \pm 2.61$  embriyo elde edilerek, bunlardan ortalama  $1.50 \pm 1.84$  ünün transfer edilebilir nitelikte olduğu görüldü (Tablo 4).

Vericilerde yapılan yıkamalarda, mevsim içinde kazanılan toplam 24 adet hücreden 20 tanesinin (%83.33) transfer edilebilir nitelikte olduğu, 1 tanesinin (%4.17) 8 blastomerli, 9 tanesinin (%37.50) morula, 10 tanesinin (%41.67) blastosist ve 4 tanesinin de

Tablo 4. Mevsim içi ve mevsim dışı senkronize edilen vericilerde kaydedilen korpus luteum sayıları ve kazanılan embriyo ortalamaları.

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

(%16.67) dejenere olduğu belirlendi. Mevsim dışında ise bu değerler sırasıyla 26, 21 (%87.50), 3 (%12.50), 12 (%50.00), 6 (%25.00) ve 5 (%20.83) olarak kaydedildi (Tablo 5).

Tablo 5. Mevsim içi ve mevsim dışı senkronize edilen vericilerde kazanılan embriyoların gelişim safhalarına göre sayıları ve oranları (%).

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

Bl: blastomer

Kazanılan embriyoların transfer edilebilir nitelikte olanlarından mevsim içinde 14 tanesi ve mevsim dışında ise 20 tanesi alıcılara transfer edildi (Tablo 6). Gebelik oranları doğum sonuçları esas alınarak saptandı. Mevsim içinde embriyo verileri 7 alıcıdan 3 tanesinin (% 42.86), mevsim dışı ise 13 alıcıdan 3 tanesinin (% 23.07) doğurduğu belirlendi (Tablo 6). Mevsim içinde ikizlik elde edilemezken, mevsim dışı % 7.69' luk bir ikizlik oranı sağlandı (Tablo 6).

Tablo 6. Mevsim içi ve mevsim dışı vericilerden kazanılan ve transfer edilen embriyo sayıları ile transfer gerçekleştirilen alıcı koyunlar ve doğum oranları.

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

## Tartışma ve Sonuç

Koyunların embriyo transfer çalışmalarında çeşitli östrus senkronizasyon yöntemleri kullanılmaktadır (1, 26, 32, 37, 40). Bu yöntemlerden intravajinal progesteron emdirilmiş sünger ile birlikte PMSG kullanımı, yüksek senkronizasyon oranları sağlamaktadır (1, 9, 21, 29, 37).

Sunulan çalışmada, vericiler mevsim içi ve mevsim dışında progesteron emdirilmiş süngerler 14 gün vajende bırakılarak senkronize edilmiştir. Süngerlerin çıkarılışından 48 saat önce 1500 IU PMSG enjeksiyonu uygulanmasıyla tüm verici hayvanların (%100.0) kızgınlık gösterdiği ve çiftleştikleri gözlenmiştir (Table 1).



Alaçam ve ark. (2), mevsim içi iki ayrı grupta sırasıyla progesteron emdirilmiş süngerler ve prostoglandin enjeksiyonu kullanarak senkronizasyon gerçekleştirdikleri koyunlarda %91.48 ve %90.90 gibi çok yakın oranlar kaydetmişlerdir. Öte yandan Tekin ve ark. (36), Merinos koyunlarında progestagen (PGA) + PMSG uygulamasıyla %96.7 senkronizasyon elde etmişlerdir. Sunulan çalışmada vericilerde saptanan senkronizasyon oranları diğer araştırmacıların elde ettikleri senkronizasyon oranlarından daha yüksek gerçekleşmiştir. Bunun sebebi, yapılan çalışmada PMSG'nin süperovulator dozda uygulanmasına bağlanabilir. Diğer taraftan, mevsim içi ve mevsim dışı alıcılarda senkronizasyon oranları sırasıyla %91.6 ve %53.84 olarak gerçekleşmiş ve mevsim içi senkronizasyon oranı mevsim dışına göre oldukça yüksek bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Mevsim içi alıcılardan elde edilen senkronizasyon oranları diğer çalışmalara benzer şekilde olmasına karşın, mevsim dışındaki oranlar oldukça düşük düzeyde kalmıştır (2, 36). Bununla birlikte mevsim içi alıcı ve vericilerden elde edilen bulgular, İleri'nin (13), tiaprostol'a elde ettiği %100 kızgınlık oranı hariç, prostoglandinlerle yapılan diğer çalışmalara göre yüksek şekillenmiştir (19, 36). Mevsim içi ve mevsim dışı elde edilen bulgular göz önünde tutulduğunda, mevsim içinde progestagen + PMSG ile elde edilen sonucun üstünlüğünü diğer araştırmaların sonuçları da desteklemektedir (2, 19, 36). Oysa, mevsim dışı alıcılardan elde edilen sonuçların, literatür verilerinden düşük olduğu görülmektedir. Bu düşüklüğün sebebi, arama koçlarının mevsim dışındaki libido yetersizliği nedeniyle koyunlardaki kızgınlıkların tam olarak tesbit edilememesi ve hayvanlarda kızgınlık semptomlarının zayıf şekillenmesine bağlanabilir. Çünkü, mevsim dışında kızgınlık göstermeyen alıcı koyunların ovaryum bulguları göz önünde tutulduğunda, kızgınlık gösteren koyunlarla önemli bir farkın olmadığı ve kızgınlık semptomlarını göstermemelerine rağmen ovaryumlarında aktif korpus luteumların bulunduğu saptanmıştır.

Süngerlerin çıkarılışından sonra geçen sürelerle göre mevsim dışı alıcılarda 48 saatte koyunların %53.85'inin östrusda olduğu, mevsim içinde ise çoğunluğun 36 saatte (%83.33) östrüs gösterdiği, kızgınlıkların başlama süreleri bakımından mevsim farkının oldukça etkili olduğu ve mevsim içinde kızgınlıkların daha erken dönemde şekillendiği gözlemlendi ( $P < 0.001$ ).

Çalışmada mevsim dışı ve mevsim içi vericilerde, koyun başına ortalama C.L. sayısı sırasıyla  $4.57 \pm 4.19$  ve  $4.43 \pm 2.82$  olarak saptanmıştır. Yapılan istatistik değerlendirmelerde mevsim dışı ve mevsim içi elde edilen sonuçlar arasında önemli bir fark görülmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar, Bondiolli ve ark. (5)'nin bildirdikleri değerlerden düşük, Barry ve ark. (3)'nin buldukları sonuçlarla hemen hemen benzer olarak gerçekleşmiştir. Öte yandan Heart (1)'in çalışmasında saptadığı sonuçlardan oldukça düşük veriler elde edilmiştir. Belirtilen araştırmaların sonuçlarına göre genel bir değerlendirme yapılsa, uygulanan farklı süperovulator ajanın ovaryum bulgularında etkili olabileceğini akla getirmektedir. Sunulan çalışma ile benzer sonuç elde eden Barry ve ark. (3)'ün süperovulator ajan olarak PMSG kullandığı, oysa diğerlerinin (5, 11) FSH kullandıkları görülmektedir. Nitekim, Heart (11) FSH ve PMSG'yi karşılaştırmış ve FSH'dan daha yüksek süperovulasyon oranı elde etmiştir. Bununla birlikte, çalışmada süperovulator ajan olarak 1500 IU PMSG kullanan Rainio (25)'nin elde ettiği ovulasyon oranı, sunu-

lan çalışmada elde edilen ovulasyon oranından yüksektir. Aynı ajan ve doz kullanılması-na karşın şekillenen bu farklılık, koyun ırkı ve çevre faktörlerinin (bakım, besleme ve iklim) değişik olmasına bağlanabilir. Bununla birlikte süperovulör ajan olarak PMSG kullanılması araştırmanın sonuçlarını etkilemiş olabilir. Nitekim, PMSG'nin progesteron salınımını artırarak spermatozoa transportu üzerinde olumsuz etki yapabildiği bilinmektedir (6). Süperovulör ajan olarak FSH'nin kullanılmasının PMSG uygulamalarına nazaran daha başarılı sonuçlar verdiği bilinmektedir (5, 11, 27). Yapılan çalışmada ovaryumlar üzerinde büyük çaptaki follikül sayısının fazla olduğu, ovulasyon oranlarının düşük olduğu ve dolayısıyla kazanılan embriyo sayısının da az olduğu gözlenmiştir. Bondurant (6) hCG'nin LH'ya göre LH etkisinin yanı sıra FSH etkisine de sahip olduğunu, ayrıca hCG'nin yarılanma ömrünün de uzun olduğunu bildirmiştir. Çalışmada büyük çaplı follikül sayılarının fazla olması ve dolayısıyla ovulasyon oranlarının düşüklüğü, Bondurant'ın (6) bildirdiği hCG'nin bu etkileşimine bağlanabilir. Böylece, ovulasyonları indüklemek amacıyla hCG yerine LH'nin kullanılması ile daha üstün sonuçlar alınabileceği düşünülebilir.

Sunulan çalışmada kazanılan embriyo sayısı mevsim içi ve mevsim dışı vericilerde koyun başına sırasıyla ortalama  $1.71 \pm 1.83$  ve  $1.86 \pm 2.61$  olarak saptanmıştır. Bunlardan gruplara göre sırasıyla ortalama  $1.43 \pm 1.55$  ve  $1.50 \pm 1.84$  tanesi transfer edilebilir sağlıklı görünümdeki embriyolar olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçların Heart (11), Smith (30) ve Rainio (25)'un bildirdikleri sonuçlardan düşük olduğu görülmektedir.

Araştırmada mevsim içi alıcılarda %42.86 doğum gerçekleşirken, ikizlik gözlenmemiştir. Mevsim dışı transfer gerçekleştirilen koyunlarda ise %23.08 doğum, %7.69 ikizlik oranı saptanmıştır. Mevsimler arası karşılaştırma yapıldığında mevsim içi doğum oranı daha yüksek bulunmasına rağmen, aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur. Nitekim, Vivianco ve ark. (38) elde ettikleri sonuçlara göre, mevsim içi ve mevsim dışı embriyo yaşam oranı açısından fark saptamadıklarını bildirmişlerdir.

Koyunlarda embriyo transferi yapan Eseh ve Sergi (8) %55.2, Stefani ve ark. (33) %65.0, Buckselve ve ark. (7) %76.9 fertilité elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların saptadıkları oranlar sunulan çalışmada elde edilen fertilité oranlarına göre yüksektir. Fakat, sözü edilen araştırmacıların fertilité oranlarının gebelik oranlarına göre, sunulan çalışmada ise doğum oranlarına göre saptandığı, dolayısıyla erken embriyonik ölümlerin gerçekleşmiş olabileceği göz önünde tutulması gerekmektedir. Aynı zamanda bu çalışmalarda kullanılan materyalin farklı ırklar olduğu da dikkate alınmalıdır. Bununla birlikte, çalışmada kaydedilen oranlara benzer olarak yaptıkları transferlerden Mauer (20) %47.7, Walter ve ark. (39) %41.0, Schiewe ve ark. (28) %16.6, Bucksell ve ark. (7) %22.0 oranlarında fertilité elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Yukarıda belirtilen araştırmacıların saptadıkları fertilité oranları değişkenlik göstermektedir. Sunulan çalışmada elde edilen fertilité oranları, kimi araştırmacıların bulduklarından düşük gerçekleşirken (7, 8, 33), çoğu araştırmacının bildirdikleri değerlere benzer veya yüksek olduğu görülmektedir (7, 20, 28, 39). Görülen farklılıkların sebebi, transfer metoduna, ırk faktörüne ve çevresel faktörlere bağlanabilir. Bu faktörlerin çalışma üze-

rinde ayrı ayrı veya birlikte etkili olduğu göz önünde tutulursa ve sonuçların diğer çalışmaların sonuçlarıyla bir ölçüde benzer olduğu dikkate alınırsa, elde edilen fertilité oramı mevcut şartlara göre başarılı olarak kabul edilebilir.

Sonuç olarak, gerekli senkronizasyon ( $P<0.05$ ) gerekse ovaryum bulguları ve doğum oranlarının mevsim içi uygulamalarda daha iyi ( $P>0.05$ ) bulunması nedeniyle, mevsim içi uygulamaların mevsim dışına göre daha başarılı olabileceği sonucuna varılabilir.

### Kaynaklar

1. Alaçam, E. (1993): Koyunlarda sıklık düzen ve üremenin denetlenmesi. Hayvancılık Araştırma Dergisi, 3 (2): 65-69.
2. Alaçam, E., Güler, M., Ding, D.A., Eröz, S., Sezer, A.N. (1986): Anöstrus dönemindeki koyunlarda ovarial aktivitenin Medroksi Progesteron Asetat (MAP) ve PMSG hormona ile kontrol altına alınması üzerinde çalışma. Ulusal Ün. Vet. Derg. Sayı: 1-2-3, Cilt: 5-6, Yıl: 6-7, 103-110.
3. Barry, D.M., Van Niekerk, C. H., Coetzer, W. A., Robertson, M. S. (1988): Superovulatory response and time of ovulation in sheep treated with FSH-P or PMSG followed by GnRH or hCG. Theriogenology, 29 (1): 217.
4. Barry, D.M., Van Niekerk, C. H., Rust, J., Vander Walt, T. (1990): Cervical embriyo collection in sheep after "Ripening" of the cervix with prostoglandin E2 and estradiol. Theriogenology, 33 (1): 190.
5. Bondioli, K. R., Allen, R. L., Wrisht, R. W., Jr. (1982): Induction of estrus and superovulation in seasonally anestrous ewes. Theriogenology, 17 (1): 74.
6. Bondurant, R., H. (1986): Embriyo transfer in sheep and goats. Ed. Morrow, D. A. In: Current Therapy in Theriogenology, 63-66.
7. Buckrell, B. C., Gartley, C. J., Johnson, W. H. (1989): Results of a commercial sheep embriyo transfer program. Theriogenology, 31 (1): 178.
8. Eşeh, S., Seregi, J. (1993): Practical experiences with sheep embriyo transfer. Theriogenology, 39: 207.
9. Hackett, A. J., Wolynets, M. S. (1982): Effect of PMSG on the reproductive performance of totally confined ewes bred at synchronised estrus. Theriogenology, 17 (2): 215-221.
10. Hafez, E. S. E. (1986): Embriyo transfer, IVF and genetic engineering, Ed. E. S. E. Hafez, In: Reproduction In Farm Animals, 528-568.
11. Heard, T. M., Walker, S. K. (1992): Premature ovulation and embriyo collection in the ewe. Theriogenology, 37 (1): 220.
12. Hoffman, K. A., Waller, S. L., Youngs, C. R. (1988): Once daily versus twice daily treatments with Follicule Stimulating Hormone in ewes synchronised with different doses of norgestomet. Theriogenology, 29 (1): 261.
13. İleri, İ. K. (1985): Koyunlarda bir prostoglandin analogu olan Tiaprost (İliren) ile östrus senkronizasyonu ve suni tohumlama çalışmaları. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg. 11 (1): 15-30.

- 14.: İleri, İ. K. (1986): Süperovulasyon ve uterus yıkaması uygulanan ön ineğin daha sonraki dönemde dövl verimi sorunları. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 12 (1): 17-22.
- 15.: İleri, İ. K., Sayın, T. (1986): Sığırlarda embriyo transfer çalışmaları. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 12 (1): 23-35.
- 16.: Kılıçarslan, M. R., Şenüner, A. (1990): Ankara keçilerinde embriyo nakli üzerinde çalışma. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 16 (2): 141-152.
- 17.: Kılıçoğlu, Ç., Alaçam, R., İzgür, H., Tekeli, T. (1984): Koyunlarda Embriyo nakli üzerinde çalışmalar. Doğa Bilim Dergisi, 8 (3): 257-270.
- 18.: Kramer, D. C. (1989): Embriyo collection and transfer in small ruminants. Theriogenology, 31 (1): 141-148.
- 19.: Loubser, P. G., Niekerk, C. H. (1991): Estrus synchronisation in sheep with progesteron-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostoglandin analogue. Theriogenology, 15 (6): 547-552.
- 20.: Maurer, R. R. (1988): Embriyo splitting and transfer in sheep. Theriogenology, 29 (1): 276.
- 21.: Meinecke-Tilman, V. S., Wassmath, R. (1978): Sonderdruck aus Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie Bd. 94 (1977/78), H. 3/4, S. 209-216.
- 22.: Moore, N. W. (1982): Egg transfer in the sheep and goat. Ed. Cyril E. Adams. In: "Mammalian Egg Transfer" Florida, p.119-133.
- 23.: Matiga, E. R., Baker, A. A. (1982): Ovarian response, ova recovery, ovulation and fertility in merino ewes superovulated either during the luteal phase of their oestrus cycle or after intravaginal progesterone treatment. Theriogenology, 17 (5): 537-544.
- 24.: Qin, G., Shu-Li, N. (1980): A simplified method of embriyo transfer in sheep. 9th International Congress on Animal Reproduction, A.I. vol. V Symposia (6 to 9), 16-20 June/Spain-Madrid, 543-547.
- 25.: Rainio, V. (1991): PMSG-dose in Finnsheep embriyo production. Theriogenology, 35 (1): 261.
- 26.: Rhodes, L., Nathanielsz, P. W. (1988): Comparing of a controlled internal drug release device containing progesteron with intravaginal medroxy progesterone sponges for estrus synchronisation in ewes. Theriogenology, 30 (4): 831-836.
- 27.: Ruttle, J., Lucero, S., Key, S., Daniels, M., Rodriguez, E., Yim, H. S. (1988): Ovine oestrus synchronisation and superovulation using norgestomet B and Follicle Stimulating Hormone- Pituitary. Theriogenology, 30 (2): 421-427.
- 28.: Schiewe, M. C., Bush, M., Stuart, L. S., Wildt, D. E. (1984): Laparoscopic embriyo transfer in domestic sheep: A preliminary study. Theriogenology, 22 (6): 675-682.
- 29.: Shelby, D. R., Awagi, S. A. (1987): Estrus synchronisation in the ewe comparing progestins and prostoglandins. Journal of Animal Science, Abst., 65 (1): 424.
- 30.: Smith, C. E. (1984): Dose effect of follicle stimulating hormone for superovulation of crossbred Targhee ewes. Theriogenology, 21 (1): 262.
- 31.: Sönmez, M. E. C., Özkoca, A., İleri, İ. K. (1992): Sığırlarda Embriyo Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 18 (2): 45-62.
- 32.: Spitzer, J. C., Carpenter, R. H. (1981): Estrus and pregnancy rates following synchronisation with chorulonone intravaginal sponge or norgestomet ear implant in cycling ewes. Theriogenology, 16 (3): 287-294.

33. Stefani, J. S., (1990): Laparoscopic versus surgical transfer of ovine embryos. *Theriogenology*, 33 (1):330.
34. Sungur, H., Alaçam, E., Tekeli, T., Kadak, R., Pakdil, N., Whitaker, R. O. (1989): İsviçre'esmeri dölvelerde dondurulmuş embriyo nakli uygulamaları. *Lalahan Hayv. Araş. Enst. Derg.* 29 (1-4): 80-89.
35. Sungur, H., Yurdaydın, N. (1994): Sığır embriyosunun dondurulması ve transferi. *Lalahan Hayv. Araş. Enst. Derg.* 34 (1-2): 1-24.
36. Tekin, N., Günzel-Apel, A. R., Yurdaydın, N., Yavaş, Y., Daşkın, A., Keskin, O., Etem, H. (1991): Östrusları senkronize edilen koyunlarda suni tohumlama yöntemiyle elde edilen döl verimi. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 38 (1-2):60-73.
37. Trejo, G. A., Munoz, L. M., Rico, P. O., Silva, M. C. (1988): Artificial insemination with frozen semen in progesteron synchronised ewes. 11<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Ireland.
38. Vivanco, H. W., Greaney, K. B. (1992): Comparison of survival of bisected and whole sheep embryos transferred in season and out of season. *Theriogenology*, 37 (1): 316
39. Walker, S. K., Warnes, G. M., Quinn, P., Seamark, R. E., Smith, D. H. (1985): Laparoscopic technique for the transfer of embryos in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 62 (3):105-106.
40. Walkwe, S. K., Smith, D. H., Godfrey, B., Seamark, R. E. (1989): Time of ovulation in the south Australian merino ewe following synchronisation of estrus. 1. Variation within and between flocks. *Theriogenology*, 31 (3):545-553.