T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİVO OLARAK ELDE EDİLEN SAANEN KEÇİSİ EMBRİYOLARININ FARKLI KRİYOPROTEKTANLAR KULLANILARAK YAVAŞ YÖNTEMLE DONDURULMASI

Sakine Ülküm ÇİZMECİ

DOKTORA TEZİ

DOĞUM ve JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet GÜLER

KONYA-2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİVO OLARAK ELDE EDİLEN SAANEN KEÇİSİ EMBRİYOLARININ FARKLI KRİYOPROTEKTANLAR KULLANILARAK YAVAŞ YÖNTEMLE DONDURULMASI

Sakine Ülküm ÇİZMECİ

DOKTORA TEZİ

DOĞUM ve JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet GÜLER

BAP 11102035

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11102035 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Keçi varlığının Türkiye ve dünyada yaygınlaşması ve keçi ürünlerine olan ilginin artması sebebiyle keçi yetiştiriciliği popüler hayvancılık alanları arasına girmiştir. Özellikle yüksek süt ve tiftik verimi olan keçi ırklarına olan ilgi ile birlikte yetiştirme oranları da artmaktadır. Yakın geçmişte Türkiye'ye getirilen Saanen keçileri, süt verimlerinin yüksek olması nedeniyle saf olarak ya da diğer ırkların verimlerini yükseltebilmek amacıyla melezleme yapılarak yetiştirilmektedir. Saanen yetiştiriciliği daha çok Ege Bölgesi'nde yoğunlaşsa da İç Anadolunun bazı bölgelerinde de yetiştirilmeye başlanmıştır. Türkiye'deki keçi sayısı 2001 yılında 7 022 000 baş iken, 2013 yılında 9 225 548 başa kadar çıkmıştır.

Teknolojinin ilerlemesi ve bilimsel çalışmaların artması sonucunda hayvancılık sektöründe de bir takım biyoteknolojik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu biyoteknolojik yöntemlerin en önemlilerinden birisi de embriyo transferidir. Embriyo transferi yüksek verimli ve sağlıklı hayvanlardan kısa sürede çok sayıda yavru almayı hedefleyen bir sistemdir. Embriyo transferi ile elde edilen yavru sayısı bir keçinin yaşamı süresince alınabilecek yavru sayısının yaklaşık 10 katını geçebilmektedir. Bu sayede genetik ilerleme süresi kısalmakta, mevcut genetik potansiyeli yüksek keçi varlığı kısa sürede artırılabilmekte, reprodüktif hastalık ve bozukluklarla mücadele kolaylaşmakta ve ıslah çalışmaları daha hızlı ve başarılı olabilmektedir.

Elde edilen ve genetik özellikleri iyi olan yavruların farklı bölgelere daha sorunsuz taşınmasını ve uzun yıllar saklanabilmesini sağlayan en önemli aşama ise embriyoların dondurulmasıdır. Dondurulan embriyolar sıvı azot içerisinde muhafaza edilirse teorik olarak canlılıklarını bir milyon yıl koruyabileceği düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında soyu tükenmekte olan hayvan türleri ve ırklarında gen koruma işlemleri için de önemli bir gelişmedir. Embriyoların dondurulmasında birçok metot ve kriyoprotektan kullanılmaktadır. Embriyoların dondurulmasında başarıyı etkileyen önemli faktörlerden birisi de kriyoprotektanlardır. Farklı metotlarda birbirlerine üstünlükleri bulunan bu maddeler, embriyolarda oluşabilecek hücre hasarını minimuma indirmek amacıyla kullanılmaktadır.

Sunulan çalışmada, ticari firmalar tarafından da kullanılan yavaş dondurma yönteminde farklı kriyoprotektanların Saanen keçisi embriyolarının canlılıkları üzerine etkileri değerlendirildi.

Araştırmanın planlanıp tamamlanmasına kadar tüm aşamalarına emeği geçen danışman hocam Prof. Dr. Mehmet GÜLER'e, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nın değerli Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Hüseyin ERDEM, Prof. Dr. Tevfik TEKELİ, Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ, Prof. Dr. Ahmet SEMACAN ve Doç. Dr. İbrahim AYDIN'a, embriyoların çözdürme ve değerlendirilmeleri esnasında yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ 'a, tezimin istatistik analizlerindeki yardımlarından ötürü Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Şeref İNAL ve Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Enver YAZAR'a, tez çalışmamda emeği geçen mesai arkadaşlarım Arş. Gör. A. Merve KÖSE ve İrfan TUR'a, operasyonlar ve uygulamalar esnasında özveriyle çalışan öğrenci arkadaşlarıma, eşim ve en büyük destekçim Mustafa ÇİZMECİ'ye, biricik oğlum H. Toprak ÇİZMECİ'ye, bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip annem, babam ve kardeşlerime çok teşekkür ediyorum.

Projenin yürütülmesine mali destek sağlayan, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

1.4.1. Embriyoların İn Vivo Olarak Elde Edilmesi 28
Cerrahi Yöntem 28
Laparoskopik yöntem 29
Servikal Yöntem 29
1.4.2. Embriyoların Değerlendirilmesi 29

1.5. Embriyoların Kısa Süreli Korunması 33

1.6. Kriyoprotektanlar 34

1.7. Embriyoların Dondurulması 36

1.8. Embriyoların Çözdürülmesi 40

2. GEREÇ ve YÖNTEM 42

2.1. Hayvan Materyali 42

2.2. Metot 42
2.2.1. Süperovulasyon Protokolü 42
2.2.2. Embriyoların Elde Edilmesi 43
2.2.3. Embriyoların Değerlendirilmesi 45
2.2.4. Embriyoların Dondurulması 45
2.2.5. Embriyoların Çözdürülmesi 47

2.3. İstatistiksel Analiz 49

3. BULGULAR 50

4. TARTIŞMA 59

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 67

6. ÖZET 68

7. SUMMARY 70

8. KAYNAKLAR 71

9. EKLER 77

Ek A: Etik Kurul Kararı 77

10. ÖZGEÇMİŞ 78

SİMGELER ve KISALTMALAR

βME: Beta mercaptoethanol

BSA: Bovine Serum Albumin

CIDR: Controlled internal drug release

Cl: Corpora lutea

CPA: Kriyoprotektan

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DPBS: Dulbecco phosphate buffer solutions

eCG: Equine chorionic gonadotropin

EG: Etilen glikol

ES: Ekilibrasyon solüsyonu

ET: Embriyo transferi

FCS: Fötal calf serum

FGA: Fluorogestone acetate

FSH: Folikül sitümülan hormon

g: Gram

GnRH: Gonadotropin releasing hormone

hCG: Human chorionic gonadotropin

IETS: Internatinal embryo transfer society

IM: Kas içi

IU: International unit

IV: Damar içi (intravenöz)

LH: Luteinizing Hormone

M: Molar

mg: Miligram

µg: Mikrogram

MGA: Melengesterol Acetate

MOET: Multiple ovulasyon ve embryo transfer

MPA: Medroxyprogesterone acetat

PBS: Phosphate buffer solution

PG: Prostaglandin

PMSG: Pregnant mare's serum gonadotropin

SC: Deri altı

ST: Suni tohumlama

UFO: Unfertilize ovum

ZP: Zona pellucida

1. GİRİŞ

Keçi yetiştiriciliği, dünyanın birçok ülkesinde özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde girdi maliyetlerinin daha az olması bakımından hayvansal üretim için önemli bir sektördür (Kaymakçı ve Engindeniz 2010). Türkiye'de de doğal bitki örtüsü, toprak yapısı, ekolojisi ve sosyo-ekonomik yapısı ile keçi yetiştiriciliğine çok uygundur (Kesenkaş ve ark 2010).

Keçi, bakım-besleme koşullarının kolay olması, elverişsiz koşullarda dahi rahatlıkla yetiştirilebilmesi, diğer çiftlik hayvanlarına göre selülozu yüksek, düşük kaliteli ot ve besin maddelerini rahatlıkla değerlendirerek et ve süte çevirebilmesi nedeniyle önemli hayvansal ürün kaynaklarından biridir (Şimşek ve Bayraktar 2006). Keçi yetiştiriciliğinin öne çıkan diğer bir özelliği de başka şekilde değerlendirilemeyen marjinal alanların (dağlık, fundalık ve taşlık arazilerin) hayvansal ürünlerin elde edilmesinde kullanılmasını sağlamasıdır (Kaymakçı ve Engindeniz 2010).

Türkiye'de keçi yetiştiriciliği; ya tarım işletmesi içinde, ya da köy sürüleri, yayla ya da göçer sürüler şeklinde sürdürülmektedir. Günümüzde İzmir, Manisa, Balıkesir, Çanakkale ve Bursa gibi batı illerinde peynir üretimi yapan ya da peynir üreten mandıralara süt sağlayan entansif işletmelerde Saanen melezi keçiler yetiştirilmektedir (Kaymakçı ve Engindeniz 2010, Kesenkaş ve ark 2010). Türkiye'de ki keçi sayısı 2013 yılı itibariyle 9 225 488 baş olup, sağılan toplam keçi sayısı 3 943 318 baş, elde edilen süt miktarı 415 743 ton olarak gerçekleşmiştir. Türkiye'deki keçi popülasyonunun büyük çoğunluğunu (% 97,92) Kıl keçisi oluştururken geriye kalanını ise Ankara, Malta, Kilis ve Saanen gibi keçi ırkları oluşturmaktadır (TÜİK 2013).

Orta ve Kuzey Avrupa'da yetiştirilen keçi ırkları genellikle yüksek süt verimine sahiptir. Bu ırkların en tanınmışı "Saanen" keçileridir. Dünyanın çeşitli bölgelerinde yerli keçilerin ıslahı amacı ile yapılan melezleme çalışmalarında Saanen ırkının önemli bir yeri bulunmaktadır. Melezleme çalışmaları ile Saanen ırkına dayalı yeni tipler geliştirilmiş bu sayede yerli ırklara oranla 7-8 kat daha fazla süt veren ve var olan koşullara rahatlıkla uyabilen genetik yapılar oluşturulmuştur. Türkiye'de de Saanen ırkı, Kilis ve Kıl keçilerinin süt ve döl

verimini ıslah etmek amacıyla kullanılmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalar özellikle Türkiye'nin batı bölgelerinde ağırlıklı olarak devam etmektedir (Kesenkaş ve ark 2010).

Saanen ırkı keçiler İsviçre'nin Saanen vadisinde yetiştirilmektedir. Bu ırk dünyanın hemen hemen her tarafına götürülmüştür. Saanen keçisi 1959 yılı başında Türkiye'ye de getirilmiş ve halen saf ve melez olarak yetiştirilmektedir (Ceyhan ve Karadağ 2009). En önemli fiziksel özellikleri dik kulağı, iç bükey yüzü, beyaz rengi ve irilikleridir (Reynolds 2009).

Saanen keçileri sağlam yapılıdır ve gelişme hızı ve süt verimi oldukça yüksektir. Ergin canlı ağırlık 50–55 kg arasındadır (Teke ve ark 2011). Ancak bir saanen keçisinin 170 kilograma kadar çıkabileceği de bildirilmektedir (Reynolds 2009). Saanen keçisi cidago yüksekliği 78–80 cm arasında olan döl verimi yüksek bir ırktır (Teke ve ark 2011). Yüksek süt verimine sahiptirler ve süt yağı oranları diğer sütçü keçilere nazaran biraz düşüktür. Saanen keçilerinin sütü ortalama % 3-3,7 protein ve %3,5-5 yağ içermektedir (Gordon 1997, Kesenkaş ve ark 2010).

Keçi sütü dünyanın birçok ülkesinde insan beslenmesinde önemli bir gıda maddesi olarak kabul edilmektedir. Bunun en önemli nedeni besin değerleri ve biyoyararlanımının yüksek olmasıdır. Ancak keçi sütünün yüksek besin maddesine sahip olması günlük tüketimde içme sütü olarak inek sütüne tercih edilmesine yetmemektedir (Litopolou-Tzanetaki 2012). Yapılan bir çalışmada (Alferez ve ark 2001) yetersiz beslenme sorunu bulanan bebeklerin keçi sütü ve inek sütüyle beslenmesi sonucunda keçi sütüyle beslenen bebeklerde kilo ve boy artışı, bağırsaktan yağ emilimi, iskelet mineralizasyonu ve kan serumunda A vitamini, kalsiyum ve diğer vitamin oranlarının inek sütüyle beslenenlerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Keçi sütü, inek sütü ve insan sütünün besin madde bileşimleri Çizelge 1'de verilmiştir (Coşkun ve Öndül 2004).

Çizelge 1.1. Keçi, inek ve anne sütünün besin madde bileşimleri (Coşkun ve Öndül 2004).

Bileşen/100 g	Keçi Sütü	İnek Sütü	Anne Sütü
Protein (mg)	3,6	3,3	1,0
Yağ (mg)	4,2	3,3	4,4
Karbonhidrat (mg)	4,5	4,7	6,9
Kalori (mg)	69	61	70
Fosfor (mg)	111	93	14
Kalsiyum (mg)	134	119	32
Magnezyum (mg)	14	13	3
Demir (mg)	0,04	0,05	0,03
Çinko (mg)	0,30	0,38	0,17
Sodyum (mg)	50	49	17
Potasyum (mg)	204	152	51
Vitamin A (IU)	185	126	241
Tiamin (mg)	0,05	0,04	0,014
Riboflavin V	0,14	0,16	0,04
Niasin (mg)	0,28	0,08	0,18
Vitamin B6 (mg)	0,05	0,04	0,01

Keçi sütünün daha çok ev içi tüketim için kullanılması, gelişmiş ülkelerde keçi sütünden yapılan peynir ve yoğurda olan ilginin artması ve en önemlisi inek sütüne karşı gelişen alerjik reaksiyonların keçi sütünde görülmemesi tercih edilme sebepleridir (Coşkun ve Öndül 2004). Keçi sütü inek sütüyle karşılaştırıldığında oldukça hipoallerjeniktir ve inek sütüne allerjisi olan birçok insan keçi sütünü tolere

edebilmektedir. İki süt arasındaki en önemli fark protein yapılarındaki değişikliklerdir. İnek sütünde bulunan proteinler 0-3 yaş arasındaki çocukların % 2,5'inde alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar insanların mide bağırsaklarında keçi sütünde bulunan proteinlerin inek sütünde bulunan proteinlerden daha hızlı sindirildiği bildirilmektedir (Litopolou-Tzanetaki 2012).

Modern hayvan yetiştiriciliğinde yüksek verimli genotiplerin yaygınlaştırılması, döl veriminin artırılması ve yüksek verimli yavruların elde edilebilmesi amacıyla bazı teknolojik yöntemler, biyoteknolojik ürünler ve yeni geliştirilen hormonlardan yararlanılmaktadır (Ishwar ve Memon 1996, Alaçam 2001b). Üremenin denetlenmesi çerçevesinde uygulanan teknikler; üreme mevsiminde östrus senkronizasyonu, anöstrus döneminde üremenin uyarılması ile yavrulama sayısını artırmak, pubertas öncesi üremenin uyarılması ile daha erken yaşta üretime kazandırılması, fekondasyon oranının artırılması, erken gebelik tanısı, suni tohumlama ve embriyo transferidir (Vivanco 2008).

Yüksek verimli hayvanların saflıkları korunarak hızla popülasyonlarının artırılması amacıyla kullanılan embriyo üretiminin önemli aşamalarından biri embriyo dondurma işlemidir. Bu işlem esnasında kullanılan yöntemlerin embriyo canlılığı üzerine bir takım olumsuz etkileri olduğu ve bunların embriyo canlılık oranlarını düşürdüğü bilinmektedir.

Yapılan bu çalışmada kullanılan kriyoprotektanların yavaş dondurma işlemlerindeki etkileri belirlenerek keçi embriyolarında uygulanacak yavaş dondurma protokolünde kullanılacak doğru kriyoprotektanın tespit edilebileceği düşünülmüştür. Yapılan bu çalışmada dünyada olduğu gibi Türkiye'de de her geçen gün yaygınlaşan yüksek verimli Saanen keçilerinin popülasyonunu artırmak ve daha ileriki dönemlerde kullanılmak üzere embriyoların saklanabilmesi için kullanılacak yavaş embriyo dondurma yönteminin ve farklı bazı kriyoprotektanların embriyo canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Keçilerde Reprodüktif Fizyoloji

1.1.1. Pubertas

Evcil hayvanlarda ovaryumun siklik faaliyetleri ancak türe ait belirli bir yaşa gelince başlar ve değişik sürelerde düzene girer (Kalkan ve Horoz 2001). Pubertas olarak adlandırılan bu dönemde dişi ve erkek başarılı üreme yeteneği kazanmaktadır (Senger 1997). Pubertasa erişen hayvanlar ovulasyon yeteneği kazansa da seksüel açıdan henüz olgunlaşmamıştır (Noakes 2001, Canooğlu ve Sarıbay 2012). Pubertas keçilerde 3-15 ay arasında değişmektedir (Gordon 1997, Noakes 2001). Optimal çevre şartlarında keçiler 6 aylıkken pubertasa (5-10 ay) ulaşırlar. Seksüel olgunluk yaşı hem genetik hem de çevre faktörleri tarafından olumlu/olumsuz yönden etkilenmektedir. Canlı ağırlık pubertas yaşını etkileyen diğer önemli faktördür. Keçiler ergin ağırlığının yaklaşık olarak % 40-50'sine ulaştıklarında pubertasa erişirler. Yavruların yıl içerisinde doğduğu zaman, yavrularda pubertas yaşını belirleyen önemli bir faktör olarak bildirilmektedir. (Greyling 2000). Kış mevsiminin sonlarına doğru doğan bir oğlak vücut gelişimi yeterli düzeydeyse 7-8 aylıkken pubertasa ulaşabilirler. Ancak, yılın geç döneminde doğan ve vücut gelişimi yetersiz olan oğlakların pubertasa ulaşması bir sonraki sezona kalır ve yaklaşık 18 aylıkken pubertasa ulaşmış olurlar (Greyling 2000, Canooğlu ve Sarıbay 2012).

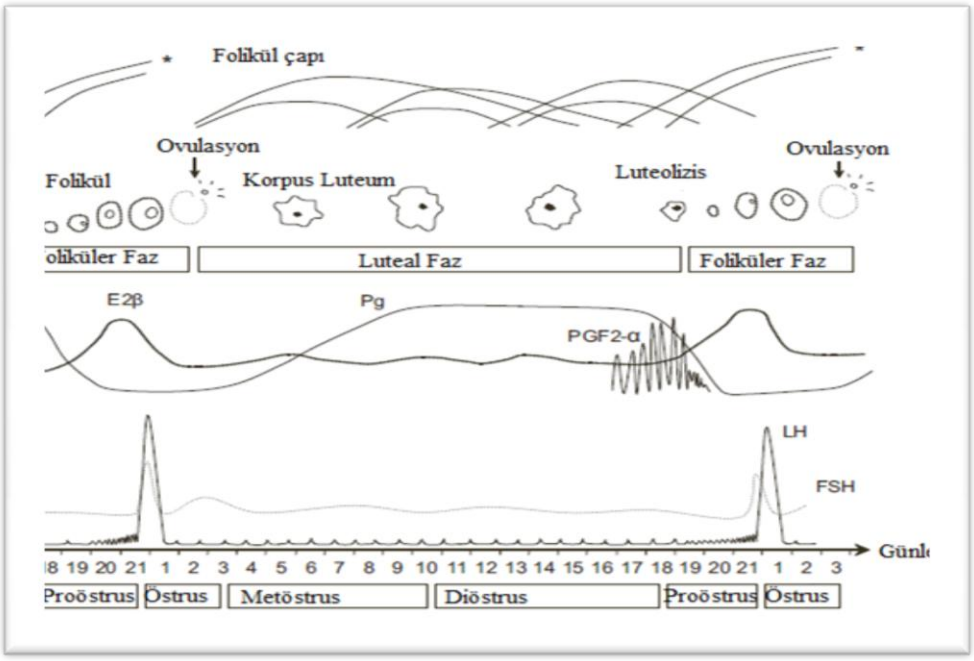
1.1.2. Keçilerde Üreme Sezonu

Gün ışığının azalması keçilerde pineal bezden melatonin salınımını artırmaktadır. Melatonin keçilerde gonadotropik etkilidir ve GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon) salınımını sağlayarak sezonu başlatmaktadır (Yellon ve ark 1992). Östrus siklusu; ovaryumlar ve genital organların östrus, ovulasyon, çiftleşme, fertilizasyon ve embriyonun implantasyonuna hazırlanması için morfolojik ve fizyolojik değişimlerin tamamını içermektedir. Keçiler bir sezonda birkaç kez ardışık östrus siklusu gösterebilirler. Östrus siklusu sayısı üreme mevsiminin uzunluğuna ve ırka bağlı farklılık gösterebilmektedir. Östrus siklusunun uzunluğu iki ardışık östrus yada iki ardışık ovulasyon arasındaki süre olarak tanımlanmaktadır (Fatet ve ark 2011).

Keçiler; mevsime bağlı üreme aktivitesi göstermeleri nedeniyle mevsimsel poliöstrik hayvanlar olarak tanımlanmaktadır (Greyling 2000). Keçilerde seksüel

aktivite, Türkiye'nin de içinde bulunduğu kuzey yarımkürede gün uzunluğunun azaldığı, yaz sonu ve sonbahar aylarında görülmektedir. Keçilerde seksüel siklus süresi ortalama 21 (19–24) gün, östrus süresi ise ortalama 28-33 saat (1–3 gün) sürer (Greyling 2000, Kılboz ve Karaca 2010, Fatet ve ark 2011). Siklus süresi; ırk, yaş, üreme mevsiminin dönemi, bakım, besleme, çevre ısısı, teke ile bir arada bulunma gibi faktörlerden etkilenmektedir. Keçilerde üreme mevsiminin başlangıcında sakin kızgınlığa rastlanmaz fakat corpus luteumun (Cl) prematüre regresyonu ya da anovulasyon nedeniyle kısa sikluslar görülebilir (Greyling 2000).

Östrus siklusu sırasında, ovaryumlarda bir dizi morfolojik (folikül gelişimi ve büyümesi), biyokimyasal (folikülün olgunlaşması) ve fizyolojik (ovulasyonu sağlayan hormonal düzenlemeler) değişiklikler oluşur. Gonadlardaki bu döngüsel değişiklikler ovaryum döngüsü olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.1.2.1). Östrus siklusu luteal ve foliküler olmak üzere iki fazdan oluşmaktadır (Fatet ve ark 2011).



Şekil 1.1.2.1. Keçilerin östrus siklusunun fizyolojik gelişiminin şematik görünümü. Folikül gelişimi, ovarian siklus ve hormonal düzen (Fatet ve ark 2011).

Foliküler evrede hipofiz bezinden salgılanan FSH (Folikül Sitümülan Hormon) folikül gelişimini uyarır ve 2-3 mm boyutundaki bir grup antral folikül gelişmeye devam eder. Bu antral foliküllerden 4 mm'den daha büyük olan 2-3 tanesi gelişimini sürdürerek dominant hale geçer. LH (Luteinizing Hormone) etkisiyle 9-10 mm'ye kadar büyüyerek ovulasyon öncesi döneme ulaşırlar. Kalan

diğer foliküller ise atreziye olurlar (Fatet ve ark 2011, Amiridis ve Cseh 2012). Ovulasyon, preovulatör LH pikinden 20-24 saat sonra (Canooğlu ve Sarıbay 2012); östrus başlangıcından ise 24-36 saat sonra spontan olarak meydana gelmekte ve her siklusta ortalama 2-3 oosit ovule olabilmektedir (Kalkan ve Horoz 2001, Kılboz ve Karaca 2010). Luteal evre ovulasyonla başlar. Bu yaklaşık siklusun 5. gününe karşılık gelmektedir. Ovule olan folikülün hücreleri luteal hücrelere dönüşür ve Cl oluşur. Cl progesteron salgılamaya başlar ve luteal döneme progesteron hormonu hakimdir. Progesteronun artması ile gonadotropin salınımı ve foliküler gelişim baskılanarak muhtemel gebelik için uterusun hazırlanması sağlanmış olur (Canooğlu ve Sarıbay 2012).

Foliküler dinamik küçük çaplı bir folikül topluluğundan bir veya daha fazla folikül grubunun senkronize gelişimi, takiben dominant folikülün seçilmesi, büyümesi ve regrese veya ovule olması sürecidir. Keçilerde bir siklusta 2-6 foliküler dalga görülebilmekle birlikte en çok 3-4 dalgalı siklusa rastlanır (Fatet ve ark 2011). Dört dalgalı bir siklusta foliküler dalgalar sırasıyla 0, 5-6, 10-11, 15. günlerde görülür (Canooğlu ve Sarıbay 2012).

1.1.3. Proöstrus

Proöstrus, östrustan hemen önceki evredir. Üreme sisteminin aktivitelerinin artması ile karakterizedir. Keçilerde ortalama 2 gün süren proöstrus evresinde hızlı bir foliküler gelişme, östrojen düzeyinde artış, corpus luteumun regresyonu ve progesteron düzeyinde azalma olmaktadır. Bu dönemde uterus dolgunlaşır, endometriyumda konjesyon ve ödem şekillenir. Uterus ve endometriyumdaki bezlerde sekresyon artışı şekillenir (Noakes 2001). Keçiler proöstrus evresinde tekeye yaklaşır, fakat aşımı kabul etmez. Ayrıca tekenin vücudunu ve genital bölgesini koklama, teke ya da başka keçinin üzerine atlama ve vurma gibi belirtiler gösterebilmektedir (Canooğlu ve Sarıbay 2012).

1.1.4. Östrus

Proöstrus ve östrüs evreleri süresince foliküler gelişme devam eder ve aktif bir Cl yoktur. Esas ovaryum hormonu olan östrojen hakimiyeti vardır. Proöstrus ve östrus evreleri siklusun foliküler evresini oluştururlar (Noakes 2001). Östrus dönemi çiftleşmeyi kabulle başlar. Bu evre östrus siklusu içerisinde başlangıcı ve

bitişi tam olarak belirlenebilen tek evredir. Östrus süresinin uzunluğuna göre siklusun süresi tespit edilir (Noakes 2001). Östrus süresi yaklaşık 24-48 saat sürer. Östrusun 66 saate kadar uzadığı da rapor edilmiştir (Greyling 2000). Meleme, kuyruğu hızla sallama, tekenin etrafında gezinme, altında durma ve tekeyi koklama gibi belirtiler gösterir. İştahta azalma, sık ürinasyon ve süt veriminde düşme de diğer belirtilerdir (Fatet ve ark 2011, Canooğlu ve Sarıbay 2012).

Ovulasyon östrus başlangıcından 12-36 saat sonra şekillenir. Ovaryumun şekli ve boyutu içerdiği yapılara göre değişiklik gösterir. Maksimum boyutu yaklaşık 2,2 cm uzunluğunda, folikül ise en çok 1,2 cm çapındadır (Noakes ve ark 2001).

Östrus süresi boyunca yüksek östrojen seviyesine bağlı olarak vagina, uterus ve serviks mukozaları hiperemik ve ödemlidir. Servikal mukus spermatozoonların genital kanalda ilerlemesinde büyük rol oynamaktadır (Fatet ve ark 2011).

1.1.5. Metöstrus

Çiftleşmenin reddedilmesi ile başlayan ve aktif Cl oluşması ile son bulan bir periyottur ve ortalama 2-3 gün sürer (Canooğlu ve Sarıbay 2012). Ovule olan foliküldeki granuloza hücreleri Cl oluşumu için lüteinize hücrelere dönüşür. Uterus, vagina ve serviksteki akıntı miktarının azaldığı dönemdir (Noakes 2001).

1.1.6. Diöstrus

Bu periyot Cl'un hakimiyetindedir. Cl bütün evre süresinde aktiftir ve yoğun progesteron sentezi yapmaktadır (Noakes 2001). Diöstrus, siklusun 3-4. günlerinde başlar ve ortalama 14-15 gün sürer. Siklusun 16-17. günlerinde uterustan salınan $PGF_2\alpha$ (Prostaglandin $F_2\alpha$) tarafından Cl regrese edilir ve kan progesteron seviyesi düşmeye başlar (Canooğlu ve Sarıbay 2012). Uterus bezlerinde hiperplazi ve hipertrofi şekillenir, serviks daralır, vagina mukozası solgunlaşır, genital organlardaki salgılar azalır ve kıvamları koyulaşır (Noakes 2001). Yeni bir siklusun başlayabilmesi için progestronun baskılayıcı etkisinin sona ermesi gerekmektedir (Canooğlu ve Sarıbay 2012).

1.1.7. Anöstrus

Uzun bir seksüel durgunluk dönemidir. Folikül gelişimi çok azdır. Cl mevcuttur ancak regrese olmuştur ve fonksiyonel değildir. Serviks kapalıdır ve genital organlardaki bezlerden salgılanan sıvıların miktarı oldukça azalmıştır (Noakes 2001). Anöstrus süresi ırk, beslenme durumu, laktasyon (Canooğlu ve Sarıbay 2012), iklim ve coğrafi konum gibi faktörlerden etkilenir (Fatet ve ark 2011).

1.2. Üremenin Denetlenmesi

Üremenin denetlenmesi ile döl veriminin artırılması, yüksek verimli hayvanların genetiklerinin korunması ve ilerletilmesi, mevsimsel östrus gösteren hayvanların mevsim dışında da üreme faaliyetleri göstermeleri, ovulasyon ve gebelik şansının artırılması sağlanmaktadır (Uçar ve Özyurtlu 2012).

Keçilerde gebelik süresinin 148 gün (140-159) olması (Güler 2001) ve bir batında ortalama 2-3 yavru vermesi sebebiyle üreme potansiyeli yüksek bir türdür. Bu hayvanlarda üretim potansiyelini artırmak için farklı üreme teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikler; üreme mevsiminde östrus senkronizasyonu, süperovulasyon, anöstrus döneminde östruslerin uyarılması ile yavrulama sayısının artırılması, hayvanların daha genç yaşta üretime katılması, fekondasyon oranının artırılması, doğumun uyarılması, erken gebelik tanısı, suni tohumlama ve embriyo transferi şeklinde sıralanmaktadır (Alaçam 2001b, Kılboz ve Karaca 2010, Vivanco 2008).

Keçilerde üremenin denetlenmesi amacıyla üreme mevsimi, anöstrus ve geçiş dönemlerinde hormonal [progesteron, GnRH, melatonin, $PGF_2\alpha$ ve progesteron+PMSG (Pregnant mare's serum gonadotropin)] veya hormonal olmayan uygulamalar (ışık uygulamaları, teke katımı, besleme) kullanılmaktadır (Çınar ve ark 2011).

1.2.1. Seksüel Siklusun Senkronizasyonu

Östrus siklusunun hormonal manipülasyonlarla düzenlenmesine senkronizasyon adı verilir. Var olan Cl'un zamanından önce geriletilerek luteal

evrenin kısaltılması veya eksojen progesteron desteğiyle luteal evrenin uzatılması ile uygulanmaktadır (Wildeus 2000).

Dişi hayvanların seksüel aktivitelerinin düzenlenmesi kompleks bir süreçtir. Bu süreçte hipotalamik-hipofiz-ovarian eksenin kontrol altına alınması gerekmektedir. Ekstrahipotalamik alanlar (serebral kortex, talamus ve beyin) ışık, koku ve dokunma duyularını uyararak bu ekseni etkileyebilmektedir. Diğer etkilenen organlar ise uterus ve ovaryumdur (Noakes 2001).

Keçilerde seksüel senkronizasyon ve östrusların uyarılması uygulamaları; bir batında doğan yavru sayısının artırılması, 2 yılda 3 yavru elde edilebilmesi, tohumlama ve doğumların toplulaştırılması ile iş gücünün azaltılması ve kayıtların düzenli tutulabilmesi, tüm yıl boyunca et süt üretiminin devam etmesi yada istenen zamana göre et ve süt üretiminin artırılması amacıyla yapılmaktadır (Alaçam 2001b, Holtz 2005). Keçilerde östrus senkronizasyonu, östrus sikluslarının değişken olması ve teke olmadan östrus tespitinin güvenli şekilde yapılamaması nedeniyle önem arzetmektedir (Amiridis ve Cseh 2012).

Embriyo transferi uygulamalarında taşıyıcı ve verici hayvanların aynı zamanda senkronizasyonunun yapılması önemlidir. Embriyonun yaşaması için uygun ortam oluşturmak amacıyla alıcı ve vericilerin östrusları arasındaki süre 12 saatten fazla olmamalıdır (Kaymaz 2012).

Seksüel senkronizasyonun sıkça uygulandığı küçük ruminantlarda sürüye koç katımı, hayvanların ağıldan karanlık saatlerde çıkarılması, gölgede dolaştırılması, ısı ışık ayarlanması gibi doğal yöntemlerle sağlanabilmekteyse de yeterli cevap alınamayabilir. Rasyonel bir sonuç için $PGF_2\alpha$ ve analogları, eCG (Equine chorionic gonadotropin), GnRH, hCG (human chorionic gonadotropin) gibi gonadotropinler, progestagenler, östrojenler, melatonin gibi hormonlar veya kombinasyonları uygulanabilmektedir (Alaçam 1994). Keçilerde hormonal yada hormonal olmayan uygulamaların aşım sezonu içinde, aşım sezonu dışında ve geçiş dönemlerinde yapılması ile üremeler denetlenebilmektedir (Çoyan 2002).

1.2.2. Aşım Sezonu İçerisinde Yapılan Uygulamalar

Aşım sezonu içindeki keçilere en sık eksojen hormonlar verilerek senkronizasyon yapılmaktadır. Eksojen hormon olarak progestagenler ve prostaglandinler verilmektedir (Amarantidis 2004).

Keçilerde östrus senkronizasyonu için iki temel yaklaşım vardır. Bunlar; progesteron ve progestinlerle döngünün uzatılması yada PGF2α ile foliküler evrenin başlatılmasıdır (Alaçam 1994).

Progestagenler

Progesteron veya anologları olan progestagenler östrus siklusunda Cl'un aktif olduğu süreye eşit zaman aralığında (12-14 gün) uygulandığında kızgınlık ve dolayısıyla ovulasyonu baskılamaktadır. Uygulamanın sona erdirilmesi sonucunda LH piki, östrus ve ovulasyon senkronize edilmiş olur (Alaçam 1994).

Senkronizasyon için kullanılan progesteron türleri ve uygulama metotları şöyledir;

- Yem katkısı olarak (Melengesterol Asetate, MGA) günde 0,25 mg dozda 10 gün oral yolla (Jackson ve ark 2006),

- Kulak kökü derisi altına 8-10 gün süreyle deri altı implant (Norgestomet, Synchromate B, 3-6 mg) şeklinde (Troxel ve ark 1980, Ishwar ve Memon 1996, Petroman ve ark 2009),

- Vagina içi sünger'in (FGA; fluorogestone acetate 20-40 mg, MPA; medroxyprogesteron acetat 60mg) 9-14 gün süreyle kullanılması (Uslu ve Gülyüz 2009, Doğan ve ark 2004, Amiridis ve Cseh 2012),

- Vagina içi slikon implant'ın [CIDR-G (Controlled internal drug release), 300 mg] 12 gün süreyle uygulanması gibi (Holtz 2005, Güngör ve ark 2009, Amiridis ve Cseh 2012).

Sürü yönetiminde üremenin denetimi için progesteron temelli protokoller, kalıntı sebebiyle oluşan çevre kirliliği ve progesteron içeren araçların oluşturduğu vajinite rağmen, daha çok tercih edilmektedir (Abeica 2012, Fierro ve ark 2013).

Senkronizasyon için en sık başvurulan metot vagina içi progesteron emdirilmiş sünger yerleştirilmesidir. Progesteron emdirilmiş süngerlerin vagina içinde tutulma süreleri değişkenlik göstermektedir. Uzun uygulamada FGA preperatları 11-18 gün MPA preperatları ise 15-18 gün uygulanır (Ishwar ve Memon 1996). Progesteron içeren süngerlerin 18-21 gün süreyle uygulanması ile luteolitik ajana gerek duyulmadan senkronizasyon sağlanabilmektedir. Ancak spermatozoonları dişi genital kanalda taşınmasının zayıflaması nedeniyle düşük fertilizasyon oranına neden olduğu bildirilmektedir (Baldassare ve Karatzas 2004, Holtz 2005).

Kısa süreli uygulamada ise 5 günlük progesteron uygulamasının ardından süngerin çıkarılacağı gün 200-300 IU eCG verilmektedir (Baldassare ve Karatzas 2004). Diğer bir uygulama ise 5-12 gün süreyle uygulanan progesteronun çıkarılmasından önceki son 24-48. saatte luteolitik dozda prostaglandin verilmesi şeklinde yapılmaktadır (Holtz 2005). En sık kullanılan protokolde süngerler 9-11 gün süreyle vagina içinde tutulur ve süngerin çıkarılmasından 24-48 saat önce luteolitik dozda prostaglandin enjekte edilerek östrus senkronizasyonu sağlanır (Baldassare ve Karatzas 2004, Rahman ve ark 2008).

Siklusu bilinen hayvanlarda östrusa yakın zamanlarda GnRH uygulanması ile de senkronizasyon sağlanabilmektedir. Bu uygulama ile sabit zamanlı tohumlama, oosit ya da embriyo toplanması gibi bazı uygulamalar yapılabilmektedir (Baldassare ve Kratzas 2004).

Prostaglandinler

Luteolizis sağlayarak Cl'u lize eder ve foliküler evreyi başlatır (Abeica 2012). Prostaglandin (PG) $F_2\alpha$ ve sentetik analogları uzun yıllardan beri güçlü bir luteolitik ajan olarak kullanılmaktadır. $PGF_2\alpha$, akciğerde hızla metabolize olması ve dokularda kalıntı bırakmaması nedeniyle seksüel senkronizasyonda iyi bir alternatiftir (Abeica 2012, Fierro ve ark 2013).

$PGF_2\alpha$ küçükbaş hayvanlarda kullanılan en etkili luteolitiktir ve östrus senkronizasyonu için siklusun aktif Cl bulunan 4. ve 16. günleri arasında uygulanır ve 10-11 gün sonra doz tekrarlanabilmektedir (Ishwar ve Memon 1996, Baldassare ve Karatzas 2004, Holtz 2005). $PGF_2\alpha$ küçükbaş hayvanlara 50-250 µg dozunda kullanılabilmektedir (Amiridis ve Cseh 2012, Fieero ve ark 2012). Östrus

siklusunda luteal evrenin ortasında tek doz $PGF_2\alpha$ uygulaması ile de östrus senkronize edilebilmektedir (Amiridis ve Cseh 2012).

Gonadotropinler

Anovulatör hayvanlarda intravaginal progesteron uygulamalarına ilave olarak ovulasyonu uyarmak için gonadotropinler uygulanabilmektedir. Gonadotropinler anöstrus dönemindeki hayvanlarda östrus ve ovulasyonu uyararak senkronizasyonu sağlamak, üreme mevsiminde de daha etkili bir senkronizasyon sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Uçar ve Özyurtlu 2012). Genellikle progesterona ilave olarak süngerin çıkarılmasında ya da en fazla 2 gün önce eCG uygulaması yapılmaktadır. eCG progesteron konsantrasyonunun düşmesini hızlandırmaktadır. eCG mevsim, ırk, vücut kondüsyonu, laktasyon, teke etkisi yada diğer çevresel faktörler göz önünde bulundurularak; üreme sezonunda 300-600 IU, anöstrus döneminde ise 400-700 IU dozunda da kullanılabilmektedir (Baldassare ve Karatzas 2004, Uçar ve Özyurtlu 2012). LH piki sünger çıkartılmadan 48 saat önce eCG uygulanan hayvanlarda sünger çıkarıldığında uygulananlardan 3 saat (sezon dışı) yada 10 saat (sezonda) daha erken şekillenir (Holtz 2005).

İneklerde kullanılan ovsynch programı keçilere uyarlanmış ve kullanımına başlanmıştır. Bu amaçla ilk GnRH uygulaması ile dominant bir folikül gelişir ve ovule olur. GnRH'yı takip eden 7. günde luteolitik dozda prostaglandin ve takip eden 48. saatte ikinci GnRH uygulanır. Ovulasyon 24 saat içinde gerçekleşeceği için son GnRH uygulamasından 16 saat sonra suni tohumlama yapılır (Holtz 2005).

Flushing

Koyun ve keçilere aşım zamanından 4-6 hafta önce başlanarak hayvanın kondüsyonuna göre aşamalı olarak artırılarak ilave besleme yapılır. Döl verimi ve ikizlik oranını arttırmak için enerjice zengin tahıl karmaları (arpa, darı, mısır ve yulaf) verilir (Çolpan 2006).

Küçük ruminantların önemli bir avantajı da rasyonlarında yapılacak değişikliklerle, hormon uygulamalarına gerek kalmadan, ovulasyon oranlarının azaltılıp artırılabilmesidir. Besin madde takviyelerinin düzgün kullanılmasıyla uzun vadede önemli faydalar sağlanabilmektedir. Bunlar;

- Çiftleşme öncesi sperma üretimini artırmak,
- Potansiyel ovulasyon oranını maksimuma çıkarmak,
- Erken embriyonik kayıpları engellemek,
- Gelişen fetüsün gelecekteki verimliliğini planlamak,
- Doğum sonrası yaşama ve gelişmeyi maksimuma çıkarmak (Martin ve ark 2004)

Besleme stratejisi östrus siklusunun her bir evresinde ihtiyaçlar ile metabolik durum ve üreme performansı arasındaki etkileşim dikkate alınarak belirlenmelidir. Uzun süreli besin madde takviyesinde vücut ağırlığı artarken kısa süreli uygulanmasında folikülogenezisi artırmaktadır. Beslemedeki hedef ovulasyon oranını artırarak bir batındaki yavru sayısını artırmaktır. Besleme üreme performansını ancak biyolojik limitler çerçevesinde artırabilmektedir (Fatet ve ark 2011)

1.2.3. Aşım Sezonu Dışında Yapılan Uygulamalar

Keçilerde üreme sezonu dışında; ışık uygulamaları, melatonin, teke etkisi ve diğer hormonal uygulamalar ile östruslar uyarılabilir (Sarıbay ve ark 2008).

Işık Uygulamaları (Fotoperiyot)

Türkiye'nin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede mevsime bağlı poliöstrik hayvan türlerinde üreme ve özellikle de seksüel aktiviteyi etkileyen en önemli faktör fotoperiyodizmdir. Bazı türler üzerinde gün uzunluğundaki kısalmalar bazılarında ise uzamalar etkili olmaktadır. Bütün bu etkileşimin temelinde ise melatonin yatmaktadır (Çevik ve Yurdaydın 1998).

Keçilerin üreme sezonları daha çok fotoperiyoda bağlıdır. Sıcak ve ılıman bölgelerde fotoperiyodun manipülasyonlarıyla sezon dışı senkronizasyon uygulamaları sıkça kullanılmaktadır. Fotoperiyot uygulamaları kısa-uzun gün değişimi temeline dayanmaktadır. Hayvanlara kışın suni ışık, sonbahar ve yaz aylarında ise doğal ışık yardımıyla uzun gün etkisi oluşturulabilmektedir. Kısa gün etkisi ise melatonin implantları sayesinde kolayca sağlanabilmektedir. Işık

uygulamaları, dişilere uygulanan hormon tedavileri benzeri bir etkiyi dişi ve erkeklerde sağlayarak seksüel aktiviteyi artırmaktadır ve genellikle hormonal tedaviler ve teke etkisiyle kombine olarak kullanılmaktadır (Fatet ve ark 2011).

Koyun ve keçilerde ışık uyarımlarının gonadotropin salınımına dönüşmesi üç aşamada gerçekleşmektedir;

- Gün uzunluğunun algılanması ve uygun sinirsel işaretlerin epifiz bezine geçmesi,
- Sinirsel işaretlerin epifiz bezi tarafından endokrin uyarımlara dönüştürülmesi,
- Endokrin uyarımların hipotalamo-hipofizer eksende gonodotropin salınımına dönüşmesi şeklinde olmaktadır (Çevik ve Yurdaydın 1998).

Aşım sezonu dışındaki keçilere teke katımından 30 gün öncesi ve 30 gün sonrasını içeren yaklaşık 60 günlük süreyle 16 saat karanlık ve 8 saat ışık uygulaması ile en iyi östrus cevabının alınabildiği bildirilmektedir (Chemineau ve ark 1992, Delgadillo 2004, Whitley ve Jackson 2004). Fotoperiyot uygulamasına ilave olarak 3 ay süreyle oral yada implant şeklinde melatonin uygulanmasının gebelik oranlarını artırdığı da bildirilmektedir (Wuliji ve ark 2003). Ayrıca kısa süreli ışık uygulamalarının etkinliğini artırabilmek için hayvanlara melatonin de verilebilmektedir. Saanen keçilerinde 37 gün süreyle melatonin+ışık uygulamasının sadece ışık uygulamasıyla karşılaştırıldığı bir çalışmada, ışık+melatonin uygulanan hayvanlarda gebelik ve yavrulama oranlarının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (du Preez ve ark 2001).

Teke Etkisi

Keçi ve tekeler sosyal çevrelerine oldukça hassastır ve feromenlar seksüel sikluslarının düzenlenmesinde kullanılabilmektedir. Yeni bir tekenin sürüye katılmasıyla dişilerde ovulasyon tetiklenebilir fakat laktasyondaki yada üreme sezonu dışındakilerde östruslar sakin görülebilmektedir (Martin ve ark 2004). Teke etkisi olarak adlandırılan bu durum anöstrus döneminde olan keçilerde seksüel aktivitenin uyarılmasında kullanılmaktadır. Birçok keçide teke etkisiyle 5-7 günlük

kısa östrus siklusu görülmektedir. Takip eden ikinci ovulasyon; östrus davranışları ve normal bir luteal evreyle ilişkilidir (Fatet ve ark 2011).

Üreme sezonundaki keçilerde siklusun luteal evresindeki güçlü progesteron baskılayıcı etkisi nedeniyle teke etkisi çok kullanılmamaktadır. Çünkü tekeler siklik keçilerde ovulasyonu indükleyememektedir sadece LH sekresyonunu artırarak siklusun dönemlerindeki sürelerde değişikliklere neden olabilmektedir (Delgadillo ve ark 2009).

Teke etkisinin genç hayvanların ilk östruslarının düzenlenmesi amacıyla da kullanılabileceği bildirilmektedir. Teke etkisi senkronizasyon amacıyla kullanılarak suni tohumlama ve doğumların toplulaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda doğan yavruların bakım ve beslenmesinin düzenlenmesi içinde avantaj sağlamaktadır (Martin ve ark 2004).

Feromenlerin kimyasal bir iletişim mekanizması vardır. Görme ve koklama duyularının etkisi ile özel iletimler hipotalamusa taşınır. Feromenler, vücuttaki bazı salgı bezlerinden salgılanmanın yanı sıra, dışkı ve idrar ile doğrudan dışarı atılarak da etkisini göstermektedir. Uzun süre erkek hayvanlardan ayrı tutulan dişiler arasına teke katılmasıyla feromonların, dişilerin üreme mekanizmasını etkilediği aynı zamanda dişilerin vaginal salgısında ya da idrarlarında bulunan feromonların da benzer şekilde erkekler üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark 2009).

Melatonin

Sonbaharda gün ışığının azalmasıyla birlikte epifiz bezinden salgılanarak kandaki miktarı artan melatonin prolaktin salınımını baskılar. Melatonin hipotalamusu etkileyerek GnRH salgısını uyarır ve seksüel aktiviteyi başlatır (Çınar ve ark 2011, Abeica ve ark 2012). Kan melatonin seviyesi geceleri pik seviyesinde seyrederken gündüzleri bazal seviyelere inmektedir. İmplantlar tüm gün boyunca kan melatonin seviyesini yüksek tutmakta ve endojen salınımı da baskılamaktadır (Abecia ve ark 2012).

Anöstrus süresince ekzojen melatonin uygulamasının gametlerin kalitelerini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca melatonin implatlarının fertilizasyon oranlarını da artırdığı tespit edilmiştir (Casao ve ark 2010, Çınar ve ark 2011, Abeica ve ark

2012). Melatonin implantlarının koyunlarda ovaryum aktivitelerini daha erken başlattığı, ikizlik ve gebe kalma oranlarını da artırdığı belirlenmiştir (Baştan ve Küplülü 1995).

Melatonin, eksojen olarak implant, enjeksiyon, vaginal sünger ve oral formda uygulanabilmektedir (Çınar ve ark 2011). Melatonin en yaygın kullanımı, 18 mg melatonin içeren implantların, anöstrus döneminde ovaryum aktivitelerinin uyarmak maksadıyla, üreme sezonundan 40-60 gün önce kullanılmaya başlanmasıdır (Uçar ve Özyurtlu 2012).

Hormonal Uygulamalar

Anöstrusta bulunan keçilerde progesterona dayalı yöntemler daha sık kullanılmaktadır. Progesteron kullanılarak üreme mevsiminde mevcut olan Cl taklit edilerek gonadatropinler üzerinde baskılayıcı etki yaratılır. Progesteron uygulamasının sona ermesiyle birlikte gonadotropinlerin üzerindeki baskılayıcı etki ortadan kalkar ve yaklaşık 72 saat sonra ovulasyon şekillenir. Vagina içi sünger şeklinde de olan progesteron preperatları aşım sezonu dışında kısa süreli (5-7 gün) yada uzun süreli (11-21 gün) olarak kullanılabilmektedir (Uçar ve Özyurtlu 2012).

Üreme sezonu dışındaki keçilerde östrusların uyarılması amacıyla progesteronlarla birlikte gonadotropinler de kullanılmaktadır ve alınan sonuçlar çok daha başarılıdır. Progesteronun uzaklaştırılmasından 1-2 gün önce uygulanan gonadotropinler östrus ve ovulasyon şekillenmesine destek olmaktadır (Baldassare ve Karatzas 2004).

Anstrüs döneminde olan kıl keçisi üzerinde yapılan bir çalışmada 14 gün süreyle FGA uygulanan hayvanlara süngerler uzaklaştırılmadan 48 saat önce 500 IU eCG ve 0,075 mg $PGF_2\alpha$ uygulanmıştır. Üç gruba ayrılan hayvanların ilk grubuna süngerler çıkarıldıktan 48 saat sonra 5 mcg GnRH, ikinci gruba 500 IU hCG uygulanmıştır. Üçüncü grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Uygulama sonrasında üç grupta da hayvanların tamamında (%100) östrus gözlenmiştir. Gebelik oranları ise sırasıyla %36.8, %38.9 ve %33.6 olarak belirlenmiştir (Sarıbay ve ark 2008).

1.3. Süperovulasyon

Süperovulasyon gonodotropinler vasıtasıyla dişinin ait olduğu ırk özelliğine göre her östrusta normal olarak ürettiği sayıdan daha fazla sayıda ovum üretmesini sağlamak ve böylece embriyo sayısını artırmak amacıyla yapılan işlemlerdir (Kanagawa ve ark 1995, Bowen 2003). Dişilerde ovulasyon cevabını artırmak için uygulanan farmakolojik teknikler olarak da tanımlanmaktadır (Bowen 2003). Süperovulasyon folliküllerden salınan kullanılabilir oositlerin sayısını artırmakla beraber, ovulasyonu ve oositin maturasyonunu da sağlamaktadır (Tekeli 2001,Rahman ve ark 2008, Sağırkaya 2009, de Sousa ve ark 2011).

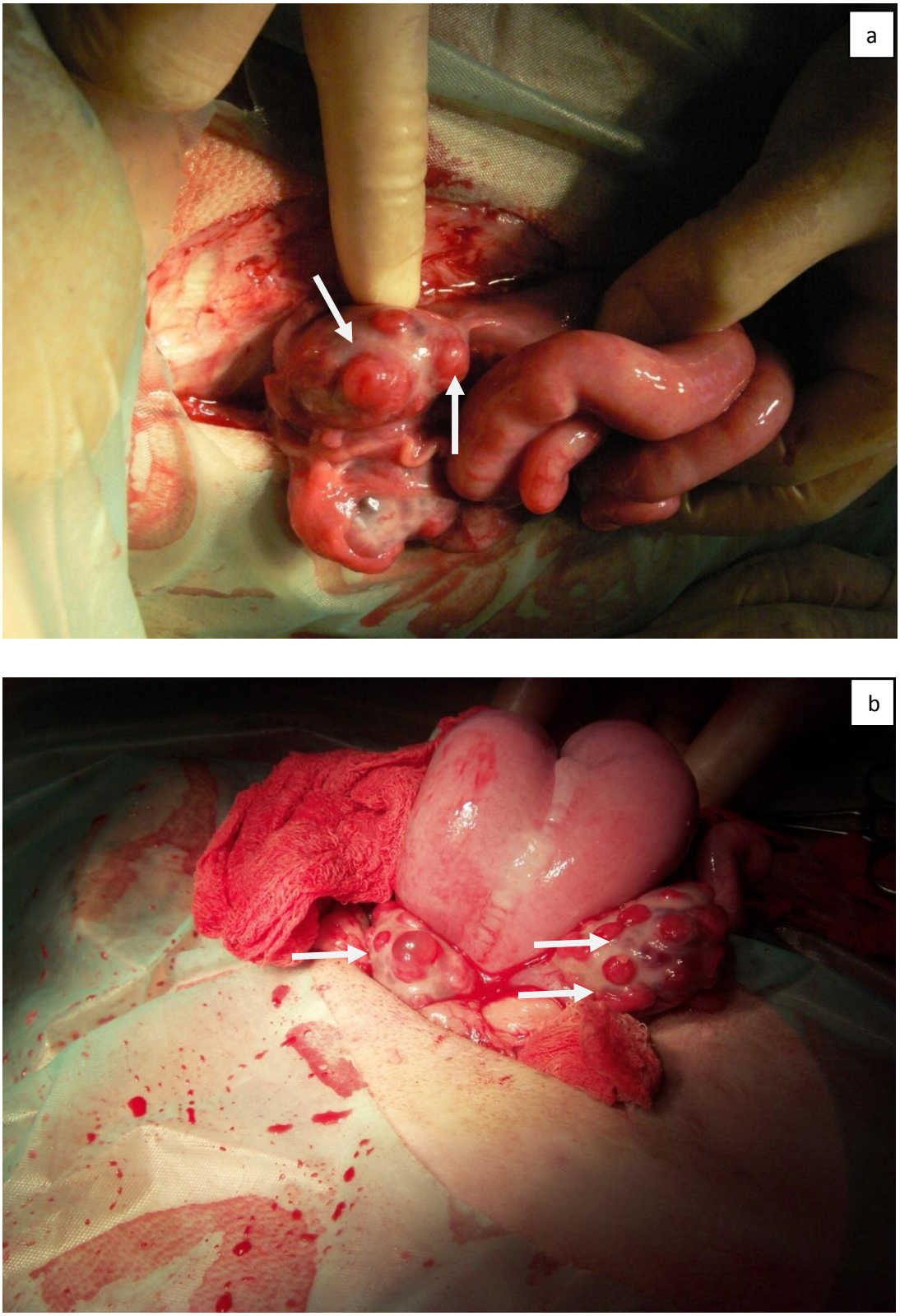
Süperovulasyon, son yıllarda yaygınlaşan biyoteknolojik yöntemlerden biri olan embriyo transferinin en önemli aşamalarından biridir (Gordon 2004). Donör olarak kullanılan dişi hayvanlara ekzojen hormon enjeksiyonu yapılarak ovaryumlarında çok sayıda folikül gelişiminin sağlanması ve ovulasyon oluşturulması şeklinde (Resim 1.3.1) de tanımlanmaktadır (Tekeli 2001, Son ve ark 2007).

Süperovulasyon uygulamalarında donör seçimi oldukça önemlidir. Donör seçiminde iki önemli kriter vardır: Genetik değer ve reprodüktif performans (Noakes 1997, Noakes 2001, Christie 2001). En az iki kere postpartum normal östrus siklusu gözlemlenen sağlıklı keçilerden seçilmelidir. Reprodüktif hastalık, düzensiz östrus siklusu, endometritis, postpartum anöstrus yada diğer problemleri bulunan hayvanlar kullanılmamalıdır (Noakes 1997, Noakes 2001).

Hayvanların süperovulasyona verecekleri cevap, ırka, yaşa, genel kondüsyona, hormon tipine, uygulama şekline, iklime, beslenmeye ve çevresel koşullara az ya da çok bağlıdır (Mapletoft ve ark 2002, Akyol 2004).

Genelde normal ve fertil olan tüm verici hayvanların % 85'i süperovulasyon uygulamasına cevap verir ve her bir vericiden ortalama 5 adet transfer edilebilir embriyo elde edilebilir. Elde edilen embriyoların sayısında azalma olmakla birlikte 40-60 gün arayla tekrar süperovulasyon uygulanabilmektedir (Tekeli 2001). Alınacak cevaplar net olarak öngörülemediği için, süperovulasyon embriyo transfer programlarının en kritik aşamasıdır. Alınacak cevap endojen (genetik, beslenme, üreme sezonu) ve eksojen (süperovulasyon protokolü, gonadotropinlerin doğal ve

katkısız olması) nedenlerden etkilenmektedir. Ancak her bir faktörün etkisini değerlendirmek neredeyse imkansızdır (Amiridis ve Cseh 2012).



Resim 1.3.1. (a, b) Uterus yıkaması sırasında ovaryumlardaki Cl'lar (süperovulasyon cevabı, ok: Cl). (Çizmeci SÜ, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).

1.3.1. Süperovulasyon Amacıyla Kullanılan Hormonlar

Süperovulasyon amacıyla gonadotropik hormonlardan yararlanılmaktadır (Lehloenya ve Greyling 2009). Bunların başında follikül uyarıcı hormon (FSH) ve gebe kısrak gonadotropini (eCG veya PMSG) gelmektedir. Bu hormonlardan eCG, gebeliğin 40-180. günleri arasında bulunan kısrakların kan serumlarından, FSH ise domuz ve koyunların hipofiz bezi ekstraktından elde edilmektedir. Bu hormonların temel etki mekanizmaları, küçük ve orta büyüklükteki foliküllerde FSH reseptörlerini aktive etmek ve bağlanmak suretiyle follikül gelişimini uyarmalarıyla açıklanmaktadır (Rahman ve ark 2008).

FSH

Bu hormona folikül stimüle edici hormon (FSH), folikül uyaran hormon da denir ve hipofiz ön lobundaki gonadotrop hücrelerde oluşur. Büyük moleküllü bir glikoprotein olan FSH, % 32 oranında karbonhidrat içerir. Moleküldeki aminoasitlerin her biri birer peptit zincirinden oluşan iki alt birim halinde düzenlenmiştir. Bunlara alfa ve beta alt birimleri denir. Alfa alt birimlerinde 92 aminoasit, beta alt birimlerinde ise 118 aminoasit bulunmaktadır (Yılmaz 1999).

FSH, foliküllerin gelişimi, antrum oluşumu ve östrojen salınımı için gereklidir (Alaçam 2001a). FSH, gelişen foliküllerin teka interna ve granuloza hücrelerinden başta östradiol-17β olmak üzere östrojenlerin salınımını uyarır. Foliküllerin östrojen salabilmesi için FSH ve LH birlikte etkimektedir. FSH ve LH ovulasyona dek sinerjik olarak etki gösterir. Östrojen, foliküllerin gelişiminde FSH`ya yardım eder. Östrojen düzeyi kanda yükseldikçe FSH salınımı azalır ve LH etkin duruma geçer (Yılmaz 1999, Akyol 2001).

Dünyada embriyo transferi çalışmalarında çeşitli FSH preparatları kullanılmakta ve bu preperarlar değişen oranlarda LH etkisi de göstermektedir. Ancak son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte saf FSH preparatları (Rekombinant-FSH) ya da minimum LH içeren FSH preparatları elde edilir hale gelmiştir. Bahsedilen rekombinant FSH ile iyi sonuç alınır olmasına rağmen bunların maliyeti oldukça yüksektir (Mori 1999).

Keçilerde FSH'nın yarılanma ömrü sadece 5 saattir ve günde 2 kez olmak üzere 3-4 gün süreyle uygulanması gerekmektedir. Bireysel değişiklikler çok olmasına rağmen ortalama 8-16 adet folikül ovule olabilmektedir (Holtz 2005).

eCG (PMSG)

PMSG, gebe kısrak serum gonadotropini olarak bilinir ancak son zamanlarda terminolojide daha çok eCG olarak anılmaktadır (Bowen 2003). Gebe kısrakların serumlarından elde edilen plasenta kaynaklı bir gonadotropindir (Tekeli 2001). Kısraklarda endometriumun fincan biçimindeki çukurlarından gebeliğin 40-130. günleri arasında salınır. Daha çok FSH benzeri etkileri olup bunun yanı sıra LH benzeri etki de gösterir (Yılmaz 1999, Kaymaz 2012).

Bazı durumlarda, eCG (antikorsuz ya da antikorlu) uygulanan keçilerde beklenen cevaplar alınamamaktadır. Bunun sebebinin keçilerde eCG'nin çabuk yıkımlanması olabileceği düşünülmektedir. Keçilerde eCG'nin yarılanma ömrü sadece 10-15 saattir ve bu ineklerdeki sürenin oldukça altındadır (Holtz 2005). Tekrarlayan eCG uygulamalarıyla yapılan süperovulasyon çalışmalarında, eCG'ye karşı antikor oluşumundan dolayı düşük fertilite ile karşılaşıldığı da bildirilmektedir. (Baldassarre ve Karatzas 2004). Yapılan birçok çalışmada keçilerde FSH'nın eCG ve hMG'den daha etkili olduğu vurgulanmaktadır (Rosnina ve ark 1992, Cognie 1999, Menchaca ve ark 2007, Rahman ve ark 2008, Hu ve ark 2010).

hMG

Pubertaya erişen bir kadında, gonadotropik hormonların etkisi ile folikül gelişimi olur ve gelişen bu foliküllerden salınan östrojenin kandaki miktarı artar. Artan östrojen miktarına bağlı olarak ise FSH ve LH salınımı baskılanarak kandaki düzeyleri azalır. Ancak insanlarda menapoz sonrası gelişecek folikül kalmadığından östrojen salınımı da önemli ölçüde düşer, FSH ve LH salınımı baskılanmadığından, kandaki dolayısıyla idrarla çıkarılan miktarları 4-10 katı kadar artar (Yılmaz 1999, Macun 2006). Bu düşünceden yola çıkarak menapoz sonrasındaki bir kadının idrarından elde edilen gonadotropinlerin süperovulasyon amacıyla kullanılabileceği düşünülmüş ve bu hormona da hMG adı verilmiştir (Akyol 2001, Macun 2006). hMG'nin süperovulasyon cevabı eCG ile benzerlik

göstermektedir. Ancak erken luteal regresyon gibi ciddi bir yan etkisi olduğu için kullanımı oldukça sınırlıdır (Amiridis ve Cseh 2012).

LH ile kontamine olan FSH preperatlarının erken luteal regresyon, ovule olmayan folikül yada luteinize folikül gibi bir takım olumsuzluklara neden olması nedeniyle saf FSH preperatları üretilmeye başlanmıştır. Ancak superovulasyon uygulanmış keçilerde erken luteal regresyonun etkisi hala oldukça önemlidir ve insidansı yaklaşık olarak % 10-32 arasındadır (Cognie ve ark 2003). Süperovulasyondan 3-4 gün sonra büyük östrojenik foliküllerin devamlılığı nedeniyle luteolizisin erken başlamasını tetiklemektedir (Gordon 2004). Bu nedenle süperovulayon uygulanan keçilerde, östruslardan 3,5 gün sonra yeni bir ovulasyon şekillenebileceği ve erken luteal regresyon meydana gelebileceği düşünülmektedir. Ovulasyon ve embriyo toplama günü arasında fluniksin meglumin uygulamasının erken luteal regresyon oranını azalttığı ve transfer edilebilir embriyo sayısını artırdığı da bildirilmektedir (Cognie ve ark 2003).

1.3.2. Süperovulasyon Protokolleri

Keçilerde çok çeşitli süperovulasyon protokolleri olduğu bildirilmektedir (Çizelge 1.3.2.1, Çizelge 1.3.2.2, Çizelge 1.3.2.3, ve Çizelge 1.3.2.4). Genellikle süperovulasyon protokolünün, progestagen içeren vaginal süngerin intravaginal olarak 9-11 gün süreyle uygulanması ve süngerin çıkartılmasından 24-48 saat önce de gonadotropinlerin enjeksiyonu şeklinde olduğu ifade edilmektedir (Lehloenya ve ark 2008, Rahman ve ark 2008, Perera ve ark 2009, Sağırkaya ve ark 2009, Lehloenya ve Greyling 2010a). Bu amaçla FSH 6 veya 8 bölünmüş doz halinde 3-4 gün süreyle azalan dozlarda, eCG seksüel siklusun 17. gününde tek enjeksiyon tarzında uygulanır. Gonadotropin uygulamasını takiben 24-72 saat sonra $PGF_2\alpha$ enjeksiyonu yapılır ve bunu izleyen 24-36 saat içinde de östrusler gözlenir (Tekeli 2001).

Progesteronların, süperovulasyon uygulaması ardından elde edilen ovulasyon sayısını ve embriyo kalitesini negatif etkileri bildirilmektedir. Koyunlarda progesteron içermeyen protokolün (WSF) geleneksel yöntemle (SF) karşılaştırıldığı çalışmada, toplamda 38 embriyo taze (SF ve WSF) olarak 22 embriyoda vitrifikasyonla (WSV) dondurularak transfer edilmiştir. Araştırmanın sonucunda S ve WS gruplarında sırasıyla embriyo toplama oranı %67 ve %80,

fertilizasyon oranı %100 ve %80 olarak belirlenmiştir. SF, WSF ve WSV gruplarında gebelik oranları sırasıyla % 78, % 70 ve % 82 olarak tespit edilmiştir (Mayorga ve ark 2011).

Çizelge 1.3.2.1. Örnek süperovulasyon ve embriyo toplama programı I (Paramio 2010)

	Sabah	Akşam
-12. Gün	Sünger takılması	
-3. Gün	FSH (50 mg)	FSH (50 mg)
-2. Gün	FSH (30 mg)	FSH (30 mg)
-1. Gün	FSH (20 mg), Süngerin çıkarılması	FSH (20 mg)
0. gün	GnRH (4,2 µg) + Doğal aşım ya da ST	Doğal aşım ya da ST
1. gün	Doğal aşım ya da ST	Doğal aşım ya da ST
7. gün	Embriyo toplanması	

ST: Suni Tohumlama

Keçiler üzerinde yapılan bir çalışmada 0. gün protokolü ile 14 süreyle CIDR uygulaması karşılaştırılmıştır. Ovulasyon ve oosit toplama oranları değerlendirilmiş ve sonuçta her iki gruptada istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır (Ayres ve ark 2011).

Taşdemir ve ark (2011), Angora ve Kilis keçileri üzerinde 0. gün protokolü uygulayarak yapılan çalışma sonucunda süperovulasyon cevaplarında ırklar arasında istatistiki fark bulunmadığını, ancak Angora keçilerinin Kilis keçilerinden daha yüksek transfer edilebilir embriyo oranına sahip olduğunu ($p<0,05$) bildirdiler.

Sezon içi ve sezon dışında yapılan süperovulasyon çalışmasında, her iki gruptada östruslar % 100 iken, sezon dışında uygulanan grupta östrusların daha geç şekillendiği görülmüştür. Cl sayıları, ovulasyon oranı, embriyo sayıları ve embriyo kaliteleri arasında istatistiki bir fark tespit edilememiştir (Lehloenya ve ark 2008).

Çizelge 1.3.2.2. Örnek süperovulasyon ve embriyo toplama programı II (Lehloenya ve ark 2008)

	Sabah	Akşam
-17. Gün	Sünger takılması	
-4. Gün	FSH (50 mg)	FSH (25 mg)
-3. Gün	FSH (25 mg)	FSH (25 mg)
-2. Gün	FSH (25 mg), Süngerin çıkarılması	FSH (25 mg)
-1. Gün	FSH (25 mg)	
0. gün	GnRH (4,2 µg), Doğal aşım ya da ST	Doğal aşım ya da ST
1. gün	Doğal aşım ya da ST	Doğal aşım ya da ST
6. gün	Embriyo toplanması	

ST: Suni Tohumlama

Çizelge 1.3.2.3. Örnek süperovulasyon ve embriyo toplama programı III (Cognie 1999)

	Sabah	Akşam
-12. Gün	Sünger takılması, PGF2α (250 µg)	
-3. Gün	1000-2000 IU eCG	
-1. Gün	Süngerin çıkarılması	
0. gün	GnRH (4,2 µg) + Doğal aşım ya da ST	Doğal aşım ya da ST
1. gün	Doğal aşım ya da ST	Doğal aşım ya da ST
7. gün	Embriyo toplanması	

S T: Suni Tohumlama

Farklı gonadotropinlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Armstrong ve ark 1983), 1. Gruba sünger+eCG, 2. Gruba eCG, 3 Gruba ise FSH uygulanarak süperovulasyon yapılmış ve çalışma sonucunda 3. grupta ovulasyon oranları diğer iki gruptan daha yüksek bulunmuştur. İkinci grupta diğer iki gruptan daha büyük folikül çapına rastlanmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri sonucu, gonadotropinlerin yarılanma ömürlerinin farklı olmasına ve eCG uygulaması sırasında kandaki hormon düzeyinin uzun süre yüksek seyretmesine bağlamışlardır.

Sezon içi ve sezon dışı yapılan bir çalışmada (Menchaca ve ark 2007), sezon içi ve sezon dışındaki uygulamalar kendi içinde de ikiye ayrılarak 1. Gruba geleneksel yöntem 2. Gruba ise 0. gün protokolü uygulanmıştır. Çalışma sonucunda süperovulasyon cevabı, sezondaki hayvanlarda 1. Grupta 2. Gruptan sırasıyla %85 ve % 50 iken sezon dışındaki hayvanlarda % 88 ve % 93olarak bildirilmiştir. Cl sayıları (9,6; 6,3/ 14,3; 10,7) ve fertilizasyon oranlarının (% 83; % 77/ %80; %76) sezonda ve sezon dışında 1. grupta 2. gruptan daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 1.3.2.4. Örnek süperovulasyon ve embriyo toplama (0. gün protokolü) programı IV (Taşdemir ve ark 2011, Ağaoğlu ve ark 2014).

0. Gün	CIDR + $PGF_2\alpha$	
5. Gün	CIDR çıkarılması+eCG	
6. Gün		GnRH
9. Gün	FSH	FSH
10. Gün	FSH	FSH
11. Gün	FSH	FSH+ GnRH
12.Gün	Doğal aşım ya da ST	Doğal aşım ya da ST
13. Gün	Doğal aşım ya da ST	Doğal aşım ya da ST
18. Gün	Embriyo toplanması	

ST: Suni Tohumlama

Yerli karalar üzerinde 700-490 IU FSH'nın azalan dozlarda 4 gün süreyle uygulanmasının 350 IU FSH'nın (175 IU epidural+175 IU IM) tek doz olarak uygulanması ile karşılaştırıldığı çalışmada Cl sayıları, transfer edilebilir embriyo oranları ve UFO sayıları arasında istatistiki fark bulunmadığını bildirmişlerdir (Taşdemir ve ark 2012).

Keçiler üzerinde yapılan bir başka çalışmada (Lehloenya ve Greyling 2009), FSH'nın kas içi (IM) ve deri altı (SC) uygulaması karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda ovulasyon oranı, embriyo toplama oranı, fertilizasyon oranı ve transfer edilebilir embriyo oranında bir fark çıkmamıştır. Unfertilize ovum (UFO) oranı IM uygulamada SC'dan fazla iken, dejenere embriyo oranı SC'da daha yüksek tespit edilmiştir.

1.4. İn-Vivo Embriyo Elde Edilmesi ve Değerlendirilmesi

Donör hayvanlardan (in-vivo) veya laboratuvar koşullarında elde edilen (in-vitro) embriyoların taşıyıcı annelere transfer edilmesine embriyo transferi adı verilir (Kaymaz 2012). Üreme teknolojisinde genetik ilerlemeyi hızlandırmak için en sık kullanılan yöntem suni tohumlama (ST) olmuştur. Ancak rutin bir üreme teknolojisi olmayan multiple ovulasyon ve embriyo transferi (MOET) sayesinde seçilmiş dişi ve erkekten üretilen embriyoların nakledilmesi ile çok daha hızlı bir genetik ilerleme sağlanmaktadır (Paramio 2010).

İn vivo embriyo üretimi ya da multiple ovulasyon embriyo transferi (MOET) ve in vitro embriyo üretimi, keçi üremesindeki çok önemli iki gelişmedir. Her iki yöntem de hayvanların genetik yapısını geliştirmek veya işlemek için kullanılmaktadır (Paramio 2010).

Embriyo üretiminin aşamaları

- Verici ve taşıyıcı hayvanların seçimi ve senkronizasyonu,
- Verici hayvanların süperovulasyonu ve tohumlanması,
- Uterusun yıkanması, embriyoların toplanması ve değerlendirilmesi
- Embriyoların dondurularak saklanması veya transferi (Kaymaz 2012).

İstenen genetik ilerlemenin sağlanabilmesi için embriyo naklinde kullanılacak verici hayvanların;

- Genetik potansiyeli yüksek olmalı (Tekeli 2001),
- Kalıtsal bazı hastalıklar ve üremesini etkileyecek enfeksiyöz hastalıklar taşımamalı (Kanagawa ve ark 1995),
- Doğmasal bozukluğu bulunmamalı ve sağlıklı olmalı,
- Verimli ve pazar payı yüksek olmalı,
- Reprodüktif özellikleri iyi olmalı ve düzenli östrus göstermeli,
- Uygun yaş ve kondüsyonda olmalıdır (Kaymaz 2012).

Taşıyıcı hayvanların da vücut kondüsyon skorlarının normal sınırlarda olması, reprodüktif açıdan sağlıklı, genç ve fertil olması gerekmektedir (Kaymaz 2012).

Embriyo transferinin başarısında donör ve taşıyıcıların seçimi, vericilerin süperovulasyonu, döllenme (çiftleşme ya da suni tohumlama), embriyoların toplanması ve değerlendirilmesi ile embriyoların transfer yöntemleri oldukça etkili olmaktadır (Rahman ve ark 2008).

Embriyo transferinin başarısını etkileyen diğer faktörler ise;

- Verici hayvanlarla beraber taşıyıcı hayvanların da senkronize edilmesi (aralarında en fazla 12 saat olmalıdır),
- Embriyonun transfer edileceği (ovaryumunda Cl bulunan kornunun apeksine) bölge (Kaymaz 2012),
- Embriyonun kalitesi, taze veya donmuş olması, in vivo yada in vitro olarak üretilmesi,
- Enfeksiyon varlığı,
- Taşıyıcının ilk gebeliğinin olup olması,
- Uygulama yapan kişinin tecrübe ve becerisi,
- Transferin cerrahi yöntemle yapılıp yapılmamasıdır (Gordon 2003).

1.4.1. Embriyoların İn Vivo Olarak Elde Edilmesi

Keçilerde in vivo embriyo üretimi çalışmaları uzun yıllardan beri yapılmaktadır. Ancak sonuçlar oldukça değişkendir. Bu değişkenliğin ana sebepleri hormonal uygulamalar, fertilizasyon problemleri ve hala tam olarak netleştirilemeyen CL'un erken regresyonudur (Paramio 2010).

Uygulanan gonadotropin enjeksiyonlarının bitiminden sonraki 24-48. saatte hayvanlara suni tohumlama veya doğal aşım yaptırılmaktadır (Tekeli 2001). Fertilizasyon sonrasında oosit tek hücreli embriyo yani zigot aşamasındadır. Daha sonra embriyolar bölünerek 2 hücreli, 4 hücreli, 16 hücreli aşamalara gelirler. Hücre bölünmeleri devam eder ve morula aşamasına ulaşırlar. Morula aşaması embriyo içerisinde şekillenen bir boşluğun (blastosel) ortaya çıkmasına kadar devam eder ve bu aşamadan sonra embriyo blastosist olarak adlandırılırlar. Morula aşamasında embriyo hücrelerinin şekli küreselden poligonal forma dönüşür. Bu dönüşüm kompaktlaşma olarak adlandırılır. Bu dönemden sonra içi boş zona pellusida, fertilize olmamış oosit, erken dönemde gelişimi durmuş, dejenere olmuş embriyolar ve zonasından dışarı çıkmakta ya da tümüyle çıkmış olan embriyolarla da karşılaşmak mümkündür (Sağırkaya 2009).

Keçilerde uterus yıkaması cerrahi, servikal ve laparoskopik yolla yapılmaktadır.

Cerrahi Yöntem

Cerrahi yöntemde ovidukt ve uterus dışarı alınarak yıkandığı için embriyo toplama oranı oldukça yüksektir (Ishwar ve Memon 1996). Serviksin kıvrımlı olması ve katater uygulama güçlüğü nedeniyle embriyolar genellikle genel anestezi altında operatif olarak toplanır. Aşım gününü izleyen 6-7. günde hayvanlara laparotomi uygulanır ve ovaryum cevapları oluşan Cl sayısına göre belirlenir. Uterus kornularına Foley kateteri yerleştirilerek yıkama yapılır. Kornu başına yaklaşık olarak 50 ml yıkama medyumu kullanılır. Toplanan yıkantıda embriyolar bulunarak morfolojik değerlendirme yapılır ve kalitelerine göre sınıflandırılırlar (Tekeli 2001, Holtz 2005). Bir hayvana operatif embriyo toplama uygulaması 2-3 kez uygulanabilir. Çünkü sık yıkama sonucunda oluşan post operatif yapışmalar tekrarlanmaları sınırlamaktadır (Paramio 2010).

Laparoskopik yöntem

Laparoskopik yöntemde hayvanlara yaklaşık 36 saat yem ve su verilmemektedir. Genel anesteziye alınan hayvanlara periton içine yaklaşık 4-5 lt. hava verilerek pnemoperitoneum oluşturulur. Laparoskop yardımıyla uterus yıkanarak embriyolar toplanır. Her bir uterus kornusu için 60 ml yıkama vasatı kullanılır. Embriyolar mikroskop yardımıyla bulunarak değerlendirilir (Ishwar ve Memon 1996).

Servikal Yöntem

Cerrahi ve laparoskopik yöntem kullanılan hayvanlarda genital organ ve dokularda yapışmalar meydana gelmektedir. Oluşan yapışmalar nedeniyle verici hayvanların kullanımı sınırlanmaktadır. Servikal yıkama yapılacak hayvanlara serviksin genişletilmesi için PGE_2 ve östradiol uygulanır. Hayvanlara genel anestezi uyguladıktan sonra servikal dilatatör kullanılarak serviks genişletilir. Yıkama için 3 yollu katater kullanılır. Yıkantı mikroskopta incelenerek embriyolar bulunup değerlendirilir (Ishwar ve Memon 1996).

1.4.2. Embriyoların Değerlendirilmesi

Çiftleşme yada suni tohumlamayı takip eden 5. günde embriyolar hızla bölünerek uterusa ilerlemeye başlarlar. Bu dönemde embriyonun kalitesini belirlemede kullanılan kompaktlaşma da başlar. Kompaktlaşma ineklerde 5-6, koyunlarda ise 3. günden sonra başlar. Bu aşamadaki embriyoya erken morula denir. Kompaktlaşmanın artmasıyla embriyonun perivitellin boşluğunda artış meydana gelir ve kompakt morula oluşur. Embriyo iç ve dış hücre katmanlarını geliştirir ve dış hücre katından sodyumun aktif transportu sonucu ozmotik basınç değişikliğine bağlı sıvı birikimi oluşur. Bu dönem erken blastosist dönemi olarak adlandırılır. Embriyonun blastosist kavitesi % 50'yi geçtiğinde blastosist olarak adlandırılır. Blastosist içindeki osmotik basınç artışı devam ederken embriyonun dış çapı büyür ve expansiyon başlar. Bu evreden sonra expanded blastosist gelişir. Zona pelusidanın incelmesi sonucu ruptur şekillenir ve hatching başlar. Embriyo zonadan tamamen kurtulduğunda hatched embriyo olarak adlandırılır (Kaymaz 2012).

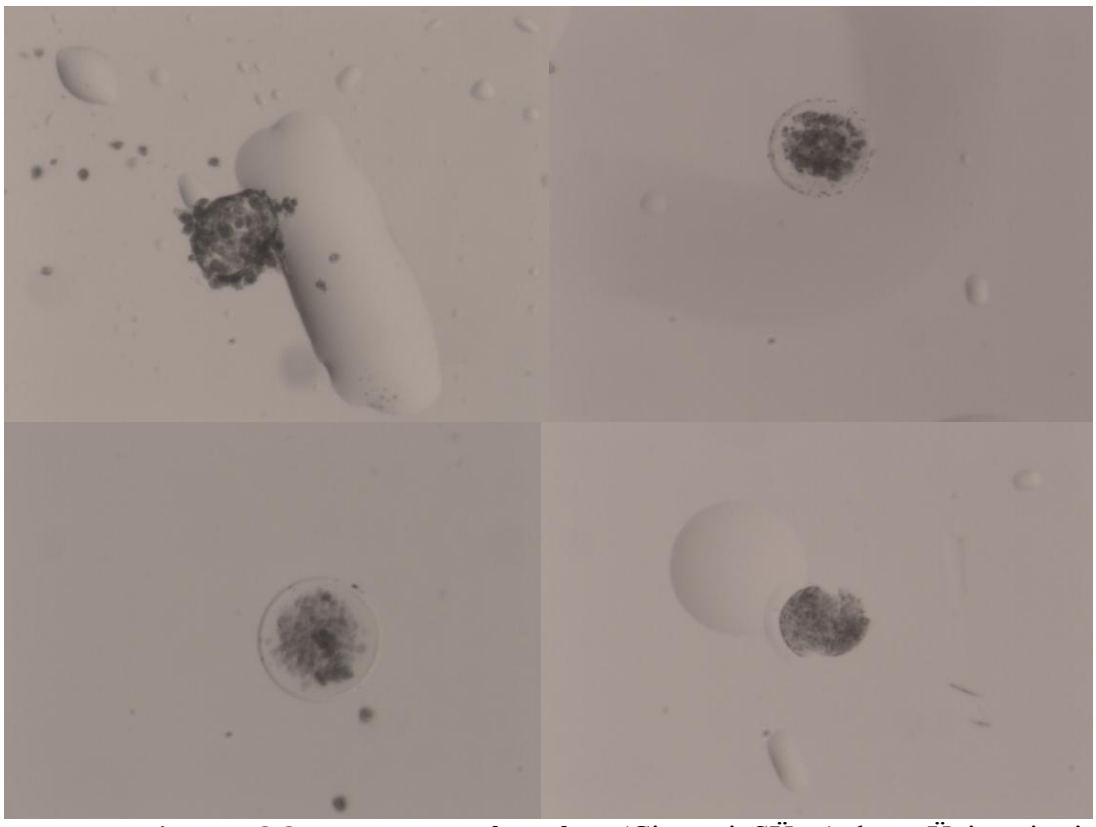
Embriyolar Internatinal Embryo Transfer Society (IETS; Uluslar Arası Embriyo Transfer Topluluğu)' nin kriterlerine göre değerlendirilir. Gelişme dönemine (Resim 1.4.2.1) göre 1'den (UFO) 9'a (Expanded-hatching blastosist) kadar (Çizelge 1.4.2.1) sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.4.2.1). Embriyo kalitesi ise embriyonun morfolojisine göre değerlendirilmektedir (Çizelge 1.4.2.2). Embriyo morfolojisinde; embriyonun yapısı, sitoplazma yoğunluğu, rengi ve dejenere (Resim 1.4.2.2) alan oranı değerlendirilir (Wright 2010).

Çizelge 1.4.2.1. Gelişme dönemlerine göre embriyolar (Wright 2010).

Numara	Derece
1	Oosit (döllenmemiş)
2	2 -12 hücre arası
3	Erken morula
4	Morula
5	Erken blastosist
6	Blastosist
7	Expanded blastosist
8	Hatched blastosist
9	Expanded hatched blastosist



Resim 1.4.2.1. Farklı aşamalardaki embriyoların görünümleri (Çizmeci SÜ, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, IVF laboratuvarı, 2014).



Resim 1.4.2.2. Dejenere embriyolar. (Çizmeci SÜ, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, IVF Laboratuvarı, 2014).

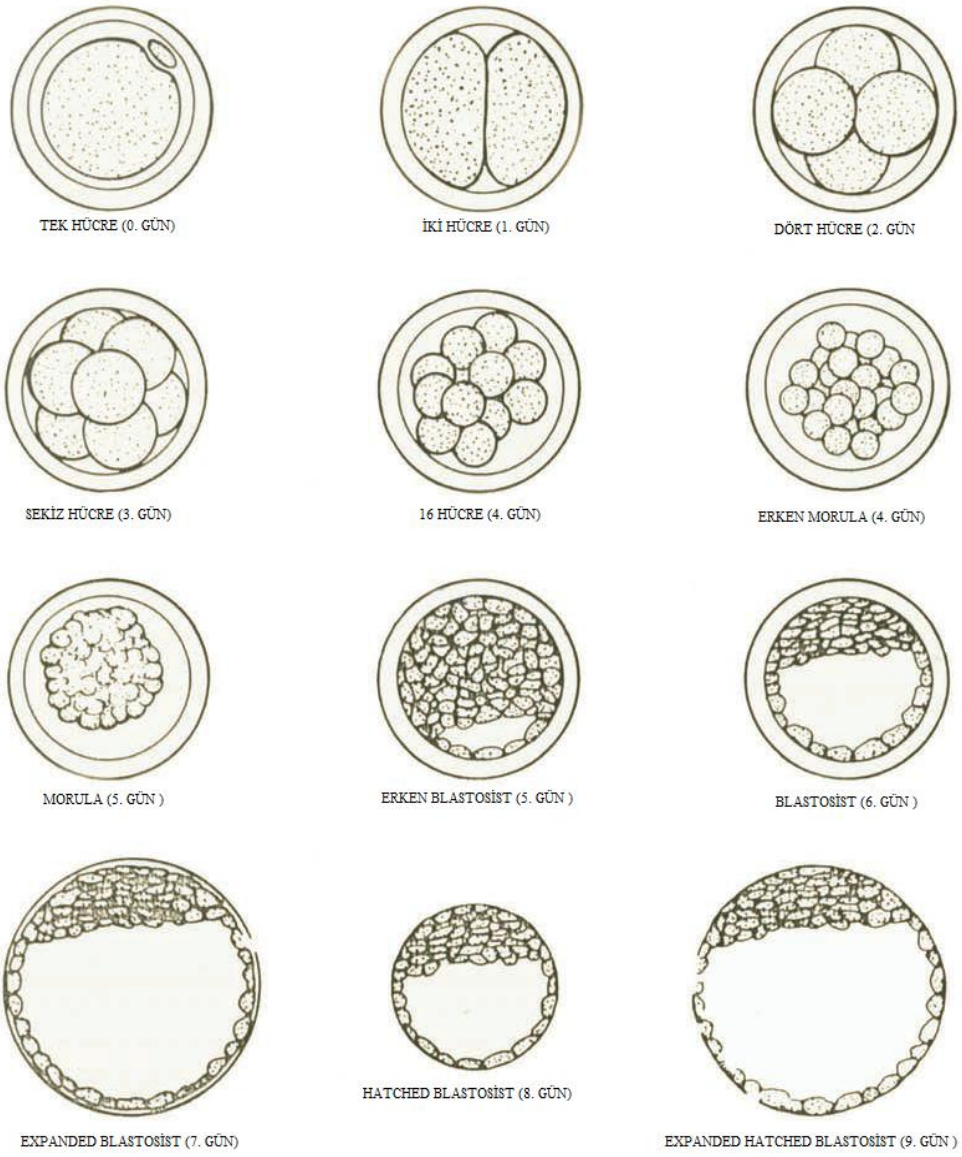
Çizelge 1.4.2.2. Morfolojik yapılarına ve derecelerine göre embriyolara yapılacak işlemler (Kaymaz 2012).

Derece	Morfolojik Durum	Uygulama
Çok iyi	1	Dondurma veya ET
İyi	1	Dondurma veya ET
Orta	2	Dondurma veya ET
Sağlıksız	3	Kültür Sonrası Dondurma veya ET
Ölü veya dejenere	4	Kullanılamaz

ET: Embriyo Trasnferi

Embriyolar:

- Çok iyi: Embriyo küre şeklinde büyüklük, renk ve yapı bakımından üniform hücrelere sahip gelişim dönemlerine göre kusursuz embriyolardır. Embriyo transferi veya dondurma yapılabilir,
- İyi: Oval zona pellusida, çok az sayıda ve embriyo kütlesi dışında kalmış küçük hücreler veya hafif düzeyde asimetrik şekil gibi önemsiz kusurlara sahip embriyolardır. Embriyo transferi veya dondurma yapılabilir,
- Orta: Makul sayıda embriyo kütlesi dışında kalmış hücreler, normalden küçük büyüklük, az miktarda dejenerasyon ve gelişimde bir güne kadar gecikme gibi net fakat ciddi olmayan anormalliklere sahip embriyolardır. Embriyo transferi veya dondurma yapılabilir,
- Zayıf: Önemli derecede dejenerasyon, veziküllü hücreler, embriyo hücrelerinin büyüklüklerinde önemli değişiklikler, kompaktlaşmanın gerçekleşememesi ve aynı zamanda gelişimde 2 güne kadar gecikme gibi bozukluklara sahip embriyolardır. Kültür sonrası embriyo transferi veya dondurma yapılabilir,
- Dejeneratif (veya ölü): Transfer edilemeyecek kadar şiddetli dejenerasyona sahip embriyolardır ve kullanılamazlar,
- Fertilize olmamış ya da 2-3 hücreli embriyolar olarak tanımlanabilir (Robertson ve Nelson 2010).



Şekil 1.4.2.1. Embriyo gelişiminin kronolojik şeması (Robertson ve Nelson 2010).

1.5. Embriyoların Kısa Süreli Korunması

Embriyolar 1-2 gün süreyle buzdolabında (4-5 ºC) canlılıklarını kaybetmeden saklanabilirler. Embriyolar saklama süresince herhangi bir gelişme göstermezler (Kanagawa ve ark 1995). Sekiz ya da onaltı hücreli embriyolar 5 ºC'de 4 gün saklanabilmektedir (Gordon 1997). Embriyolar 24-48 saat dondurulmadan saklanması gerektiği durumlarda M-199 ve Ham's F10 vasatları gibi kompleks yada PBS (Phosphate Buffer Solutions) + %10 FCS içeren vasatlarda 0-4 ºC'de steril test tüplerinde saklanabilmektedir (Kanagawa ve ark

1995). Saklama işlemi 0,25 ml'lik payetlerde de yapılabilmektedir. Dondurmada kullanılan kriyoprotektanların toksik etkileri ve ani soğutmaya bağlı gelişebilecek zona hasarı gibi embriyoya zarar verecek durumlar düşünüldüğünde transfer için uzun süre beklemeye ihtiyaç duyulmuyorsa kısa süreli saklama uygulanabilir. Ancak oda ısısında tutulan embriyoların yaşam şansının 12 saatten sonra düşmeye başladığı unutulmamalıdır (Kaymaz 2012). Oda ısısında 4-6 saaten fazla tutuluduktan sonra dondurulup çözdürülen embriyolarda canlılık oranlarının düştüğü ve dondurma işlemi uygulanacaksa en kısa sürede yapılması gerektiği bildirilmektedir (Mapletoft ve ark 2010).

Kısa süreli saklamada embriyo canlılığını etkileyen faktörler;

- Işık: Embriyolar mikroskop ışığı altında maksimum 30 dakika kalmalıdır.
- Sarsıntı ve ısı değişimi: Taşıma esnasında yaşanabilecek ısı değişimi ve sarsıntılardan sakınılmalıdır.
- Saklama süresi: Oda ısısında yada buzdolabında 1 gün saklanıp transfer edildiğinde gebelik şansı % 50 iken iki gün saklandığında bu şans oldukça düşmektedir.
- Saklama süresi ve sıcaklık ilişkisi: embriyolar toplandıktan sonra 25-38 ºC de 5 saat saklandığında ortam ısısından çok etkilenmezler. İkinci saatten sonra canlılıklarda biraz düşüş yaşanabilir. Ancak 25 ºC'den daha yüksek ortamlarda 5. saatten sonra embriyo kayıp oranı artmaktadır (Kanagawa ve ark 1995).

1.6. Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar dondurma ve çözme uygulamalarının hücreler üzerinde oluşturabileceği bazı zararları önlemek maksadıyla kullanılan kimyasal maddelerdir. Ortamdaki donmamış fraksiyon miktarını arttırıp iyon miktarını azaltarak etki gösterirler. Dondurulacak hücreler önce kriyoprotektanlarla ekilibre edilerek hücre içi denge sağlanmaktadır (Palasz ve Mapletoft 1996). Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, moleküler ağırlıklarının düşük olması ve ancak belirli oranların üzerinde katıldıklarında (1 M'dan yüksek) toksik etki oluşturmalarıdır (Dinnyes ve Nedambale 2009). Kriyoprotektan maddeler hücre

membanından geçebilen (Permeabl-hücre içi) ve hücre membranından geçemeyenler (Non permeabl-hücre dışı) olarak iki ayrı grupta incelenmektedir (Çizelge 1.6.1) (Prentice ve Anzar 2011).

Düşük molekül ağırlıklı hücre içi kriyoprotektanlar; etilen glikol, metanol, 1.2-propandiol, DMSO (Dimetilsülfoksit), bütandiol, gliserol ve diğer alkollerdir. Düşük moleküler ağırlıklı hücre dışı kriyoprotektanlar; galaktoz, glikoz, sükroz, trehaloz ve diğer şekerlerdir. Yüksek molekül ağırlıklı (> 50, 000 Dalton) hücre dışı kriyoprotektanlar polivinilpirolidon, polivinil alkol, hidroksietil nişasta, sodyum hiyalironat ve diğer polymerlerdir (Palasz ve Mapletoft 1996).

Çizelge1.6.1. Molekül ağırlıkları ve permabilitelerine göre kriyoprotektanların dağılımı.

Düşük Molekül Ağırlıklı		**Yüksek Molekül Ağırlıklı**
Hücre İçi	**Hücre Dışı**	**Hücre Dışı**
Etilen Glikol	Galaktoz	Polivinilpirolidon
Metanol	Glikoz	Polivinil alkol
1.2-propandiol	Sükroz	Hidroksietil nişasta
DMSO	Trehaloz	Sodyum hiyalironat
Bütandiol	Diğer şekerler	Diğer polymerler
Gliserol		
Diğer alkoller		

Hücre içi kriyoprotektanlar, H_2O'ya bağlanabilme özellikleri ve yüksek konsantrasyonlu diğer bileşenlerin toksik etkilerini azaltmaları ile etkilerini göstermektedir. Bu gruptaki kriyoprotektanlar genellikle suda yüksek çözünebilme özelliğine sahiptir. Bu sayede suyun hidrojen bağlarını koparark yapısını değiştirir. Aynı zamanda bu kriyoprotektanlar su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilmektedir (Bozkurt 2011). Kullanılan bu kriyoprotektanlar hücreye penetre olup dehidrasyonu sağlayarak sitoplazmanın korunmasına yardımcı olurlar

(Kaymaz 2012). Dehidrasyon işleminin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesi, hücrelerin ölümüne neden olabileceğinden kriyoprotektanlar düşük konsantrasyonda hazırlanmalı ve yavaş bir şekilde ilave edilmelidir (Holtz 2005).

Embriyoların dondurulmasında kullanılan hücre içi kriyoprotektan maddeler etilen glikol, gliserol (Holtz 2005), 1-2 propanediol, propilen glikol (Kaymaz 2012), DMSO, asetamid ve proetilen glikoldür (Arav 2014). Gliserol, DMSO ve etilen glikol (EG) gibi bazı kriyoprotektanlar küçük moleküllüdür ve dondurma esnasında buz haline dönüşen hücre içi ve hücre dışı su miktarını sınırlarlar (Prentice ve Anzar 2011). Etilen glikolün molekül ağırlığı gliserol ve DMSO'dan daha düşüktür ve bu sayede kazandığı yüksek permabilite sayesinde etkisini göstermektedir. Gliserol sitoplazmik membran üzerinde etkili olurken, etilen glikol hücre içindeki tüm membranı korumaktadır. Ayrıca etilen glikol özellikle çözdürme esnasında oluşabilen ve hücrelerin şişip patlamasına neden olan ozmotik basınç değişimlerine neden olmamaktadır (Kaymaz 2012).

Embriyo dondurma vasatının içerisinde kriyoprotektanlara ilave olarak % 10 oranında FCS (Fetal Calf Serum) bulunmaktadır. Aynı zamanda % 0,4 oranında BSA (Bovine Serum Albumin) da ilave edilebilmektedir (Kaymaz 2012).

1.7. Embriyoların Dondurulması

Elde edilen embriyoların dondurulmasının birçok avantajı vardır. Genetik değeri yüksek dişilerin yavrularının başka bölgelerde de yayılımı sağlanır. Genetik ıslah çok daha hızlı gelişir. Ulusal ya da uluslararası hayvan hareketleri göz önüne alındığında dondurulmuş embriyoların taşınması canlı hayvan taşınmasından daha kolaydır. Çünkü nakliye esnasında hastalık ya da ölüm riski yoktur. Ayrıca embriyoların dondurulması gen kaynaklarının korunması ve depolanmasında da oldukça önemlidir (Amiridis ve Cseh 2012). Embriyoların dondurulması ile taşıyıcılarda senkronizasyona gerek kalmadan transfer işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Bunun yanında kurulacak olan embriyo bankası ile nesli tükenmekte olan hayvan varlıklarının korunması da sağlanabilmektedir (Sağırkaya ve Bağış 2003).

Embriyoların dondurulmasındaki asıl amaç, embriyoyu o andaki hali ile korumak ve çözdürüldüğünde kaldığı yerden devam edebilmesini sağlamaktır.

Embriyoların dondurularak saklanmasıyla hücrenin enzim aktivitesi, metabolizma, gelişim ve bölünme gibi birçok olay neredeyse durmaktadır. Bu işlemlerin sonucunda fizyolojik aktivite belirgin bir şekilde durdurulmakta ve çok uzun süre yaşama yeteneğine zarar vermeden ve genetiği bozulmadan saklanabilmektedir. (Kaymaz 2012).

Memelilerde oositlerin ve embriyoların dondurulması hayvan ve insanların üremesinde, biyomedikal araştırmalarda, tıbbı ve biyolojik çeşitliliğin korunmasında uygulanmaktadır. Genel olarak hücrelerin dondurulma ve çözdürülmesi kriyoprotektanlarla (CPA) sıfırın altındaki sıcaklıklara soğutma, depolama, çözdürme, son seyreltme ve CPA'nın ortadan kaldırılması, fizyolojik ortama dönüşü içermektedir (Liu 2009).

Hemen hemen tüm kriyoprezervasyon stratejileri iki ana faktöre dayanır: kriyoprotektan ve soğutma oranları (Vajta ve Kuwayama 2006). İyi kalitede olan embriyolar geleneksel yavaş dondurma, hızlı dondruma veya vitrifikasyon (çok hızlı dondurma) yöntemleriyle dondurulabilmektedir (Sağırkaya ve Bağış 2003, Uysal 2007).

Geleneksel yavaş dondurma kullanılmaya başlanan ilk yöntemdir ve birçok hayvan ve insan hekimi için tercih edilen metottur (Vajta ve Kuwayama 2006). Yavaş dondurma aynı zamanda kontrollü veya dengeli dondurma yöntemi olarak da adlandırılır (Vajta ve Kuwayama 2006, Kaymaz 2012). Metot zamanla ticari ve sanayi gelişmelerle oldukça standardize edilmiştir. Geleneksel yavaş dondurma buz kristal oluşumu, kırılma, toksik ve ozmotik hasar gibi çeşitli zararlı faktörler arasında hassas bir denge oluşturmak için geliştirilmiştir. Kontrollü soğutma oranı ciddi ozmotik etkilenme ve hücre deformasyonu olmadan ekstrasellüler ve intrasellüler membranlar arasında sıvı geçişine izin vermektedir. Bu metotta embriyo oda ısısında dondurma vastatıyla 10-30 dakika kadar temas halindedir ve bu süreye dondurma vasatlarında bekleme ve pipetleme işlemleri de dahildir (Kaymaz 2012).

Çizelge 1.7.1. Dondurma metotlarının karşılaştırılması (Dinnyes ve Nadambale 2009, Prentice ve Anzar 2011, Kaymaz 2012- modifiye edilmiştir).

Dondurma Yöntemi	
Yavaş Metot	**Vitrifikasyon**
Standart 0,25 ml'lik payet	0,25 ml'lik payet, OPS, cryo-top vs
Düşük kriyoprotektan konsantrasyonu (%8-10)	Yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu (% 40-60)
Kristalleşme var	Kristalleşme yok
Kontrollü yavaş soğutma	Ultra hızlı soğutma
0,1- 0,6ºC/dk	2500-30000ºC/dk
-30 ºC'ye kadar soğutulup -196 ºC'de sıvı nitrojende saklanır.	Direk -196 ºC'de sıvı nitrojende saklanır.
Yavaş (90-120 dakika) ve pahalı	Çok hızlı (0,1 < saniye) ve ucuz
Embriyonun gelişim aşamalarının hepsinde başarılı	Kompakt morula ve blastosist aşamalarında daha başarılı
Direk transfer yapılabilir	Direk transfer metota bağlıdır
Ozmotik hasar riski düşük	Ozmotik hasar riski yüksek
Toksik hasar riski düşük	Toksik hasar riski yüksek
Soğuk hasarı riski yüksek	Soğuk hasarı riski düşük

Geleneksel yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemlerinin en önemli farkı (Çizelge 1.7.1), geleneksel yavaş dondurmada kullanılan kriyoprotektan maddelerin yoğunluğunun düşük olması ve embriyoların özel bir cihaz yardımıyla programlı bir şekilde soğutulmasıdır (Kaymaz 2012). Vitrifikasyon yönteminde ise yüksek konsantrasyonlu kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Özel bir cihaza ihtiyaç duyulmaması ve hızlı olması en büyük avantajıdır (Holtz 2005). Yavaş dondurma esnasında hücre içinde buz kristalleri şekillenmekte ve bu kristaller embriyoya zarar

verebilmektedir (Kaymaz 2012). Vitrifikasyonda ise buz kristalleri oluşmadan cam benzeri katılaşma sağlanmaktadır. Payetlerin dondurma esnasında zarar görebilmesi de bir diğer dezavantajıdır (Holtz 2005). Aynı zamanda oluşan ozmotik değişiklikler hücreye zarar vermekte ve (Kaymaz 2012) yüksek konsantrasyonlu kriyoprotektanlar nedeniyle kimyasal toksikasyon riski bulunmaktadır (Arav 2014).

Embriyo ve oositler dondurarak saklama sırasında hücre fonksiyonunu bozan ve ölümüne yol açabilen mekanik, termal ve kimyasal etkilere maruz kalmaktadır. Kriyo-hasara karşı oositlerin embriyolardan daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. Genel olarak, yavaş dondurma yönteminde donma işleminin soğutma ve ısınma oranları gibi biyofiziksel özellikleri kontrol edilebilmekte ve kullanılan kriyoprotektanlarla istenmeyen hücresel olayların en aza indirilmesi sağlanabilmektedir. Böylece yavaş dondurmada hücresel dehidratasyon sayesinde hücre dışı buz oluşumu dengelenebilir. Bu yöntem, hücre içi buz kristal oluşumunu azaltarak ozmotik stresin zararlı etkilerini en aza indirerek hücrelerin çok düşük sıcaklıklarda soğutulmasını sağlar. Öte yandan, vitrifikasyonda buz kristallerinin oluşumunu engellemek için çok yüksek konsantrasyonda kriyoptotektan kullanımı ve hızlı soğutma hücre içi kriyo-hasarının başlıca nedenleridir (Smith ve ark 2004).

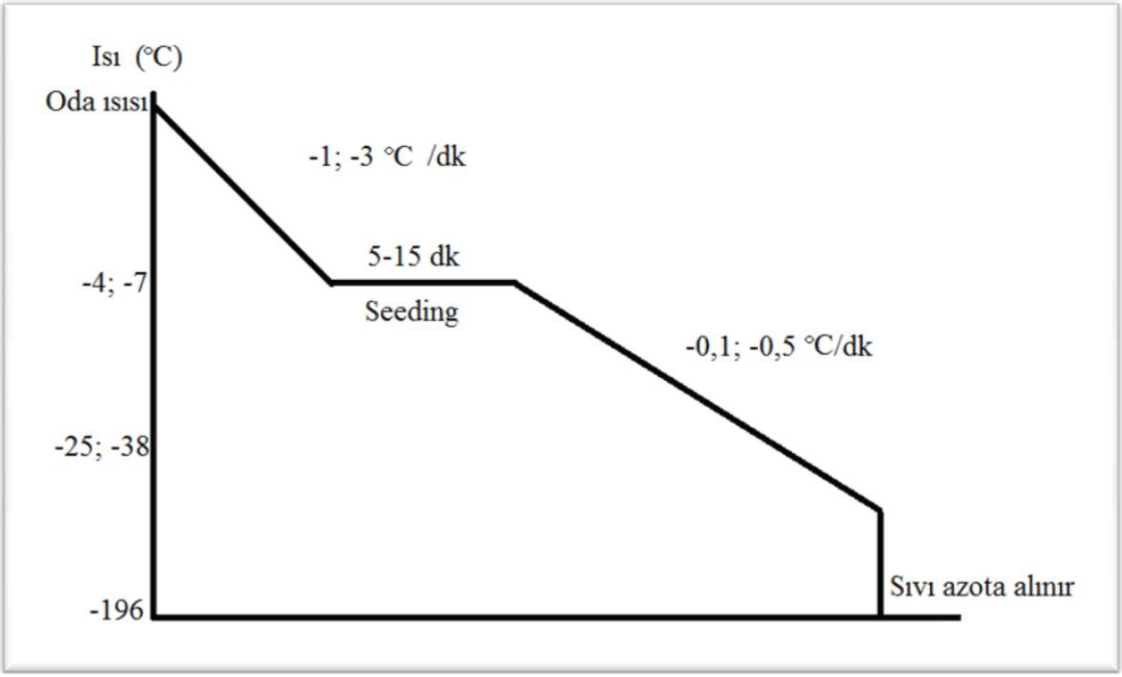
Embriyo dondurma yöntemlerinin içinde en yaygın kullanılan yöntem yavaş dondurma yöntemidir (Liu 2009). Yavaş dondurma yöntemi ile embriyoların dondurulmasında değişik aşamalar vardır (Şekil 1.7.1) bunlar:

a) Gliserol, etilen glikol, DMSO ve propilen glikol gibi hücre içine nüfuz edebilen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektan solüsyonu ile embriyo arasında ozmotik dengenin sağlanması amacıyla oda ısısından -6, -7 ºC'ye kadar dakikada 2 ºC soğutulması (kalibrasyon),

b) Buz kristallerinin -7 ºC'de başlatılması (seeding) ve 10 dakika bu ısıda bekletilmesi,

c) Kontrollü bir biçimde embriyo dondurma makinesi aracılığıyla -30 ile -70 ºC (ort -35 ºC) arasındaki bir sıcaklığa ulaşıncaya kadar dakikada 0,3-0,6 ºC olacak şekilde kademeli yavaş soğutma (0,2-2,0ºC/dk),

d) İstenilen sıcaklığa ulaşıldığında sıvı azot içerisine (-196) daldırma ve saklama (Seidel 1991, Sağırkaya ve Bağış 2003, Liu 2009).



Şekil 1.7.1. Yavaş dondurma protokolü (Kanagawa ve ark 1995, Kaymaz 2012, Modifiye edilmiştir).

1.8. Embriyoların Çözdürülmesi

Embriyolar hızlı yada yavaş yöntemle çözdürülebilmektedir. Çözdürme protokolü dondurma protokolüne uygun olarak seçilmelidir. Son yıllarda daha çok 37 ºC'lik su banyosunda hızlı çözdürme tercih edilmektedir. Çözdürmede önemli olan osmotik basınç nedeniyle embriyoya zarar verebilecek olan kriyoprotaktanın hızla embriyodan uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla farklı yoğunlukta vasatlar kullanılarak kademeli sulandırma ile kriyoprotektanlar uzaklaştırılmaktadır (Kanagawa ve ark 1995). Kriyoprotektanların uzaklaştırılması amacıyla sükroz, trehaloz veya galaktoz gibi hücre içine nüfuz edemeyen şekerler kullanılmaktadır (Sağırkaya ve Bağış 2003).

Çözdürme işlemi için öncelikle gerekli vasatların hazırlanması gerekmektedir. Bunun için %20 FCS içeren Modified Dulbecco phosphate buffer solutions (m-DPBS) ve %20 FCS + 0,1mM Beta mercaptoethanol (βME)+M-199

(Medium 199) solüsyonları hazırlanır ve yıkamaların yapılabilmesi için petrilere koyulur (Kaymaz 2012). Payetler sıvı azottan çıkartılıp 10 sn süreyle havada tutulur ve daha sonra 37 ºC'lik su banyosuna atılır ve tam olarak çözünene kadar (25-30 sn) tutulur. Çıkarıldıktan sonra payet sırasıyla alkollü ve kuru pamukla silinir ve uçları kesilerek petriye aktarılır (McOnie 2004, Youngs 2011).

Mikroskop altında incelenerek bulunan embriyo %20 FCS+m-DPBS solüsyonunda 4 kez yıkandıktan sonra 38,5 ºC'de 10 dk inkübatörde bekletilir. Daha sonra %20 FCS + 0,1mM βME+M-199 vasatında 4 kez yıkanır ve aynı solüsyon içerisinde inkübasyona bırakılır. Embriyo gelişimi 24 saat arayla takip edilir (Kaymaz 2012).

Yapılan bu çalışmada dünyada olduğu gibi ülkemizde de her geçen gün yaygınlaşan yüksek verimli Saanen keçilerinin popülasyonunu artırmak ve daha ileriki dönemlerde kullanılmak üzere embriyoların saklanabilmesi için kullanılacak yavaş embriyo dondurma yönteminin ve farklı kriyoprotektanların embriyo canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmanın Etik Kurul Onayı, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul'u tarafından 18.05.2011 tarihli 2011/10 sayılı toplantıda, 2011/052 sayılı kararıyla alınmıştır.

2.1. Hayvan Materyali

Projenin hayvan materyalini sağlıklı ve fertil, 2-3 yaş aralığında, daha önce bir doğum yapmış ve genital organlarında herhangi bir problem bulunmayan farklı ağırlıktaki (40-65 kg) 15 adet Saanen ırkı keçi ile sağlıklı ve fertil 2-3 yaş aralığında 3 adet teke oluşturdu. Tüm keçiler kulak numaraları kaydedildikten sonra genel klinik muayeneleri (vücut ısısı, solunum/nabız sayısı vb) ve enfeksiyon kontrolleri (brucella, Tüberküloz vb) Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'nde yapıldı. Herhangi bir enfeksiyona rastlanmayan hayvanlar Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğine nakledildi ve aşım sezonu başlayana kadar çiftlikte barındırıldı. Çiftlik 36º-52' N, 32º-29' E koordinatlarında, denizden 1026 metre yüksekte bulunmaktaydı. Keçiler aşım sezonu başladığında senkronizasyon ve süperovulasyon programına alındılar. Elde edilen embriyolardan her kriyoprotektan grubu için en az 30 adet olacak şekilde toplam 100 adet embriyo çalışma materyali olarak kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Süperovulasyon Protokolü

Keçiler aşım sezonu içinde ikişerli gruplara ayrıldı ve aşağıdaki protokol (Şekil 2.2.1.1) uygulandı.

0.gün: Keçilere 20 mg Fluorogeston asetat emdirilmiş intravaginal sünger (Chronogest CR®, vaginal sünger, İntervet, Fransa) yerleştirildi.

9.gün: Sabah 2,2 ml $PGF_2\alpha$ (Eustrumate®, 263 µg/mL Kloprostenol Sodyum, Enjektabl solüsyon, İntervet, Almanya) kas içi (IM) ve sabah/akşam 2,5 ml FSH (Folltropin®, 20 mg/mL NIH-FSH-P1, Enjektabl solüsyon, Bioniche, İrlanda) kas içi (IM) olarak uygulandı.

10.gün: Sabah/akşam 1,5 mL FSH (IM),

11.gün: İntravaginal sünger çıkartılarak sabah/akşam 1,0 mL FSH (IM) uyguladı.

12.gün: Sabah 2 mL GnRH (Receptal®, 0,004 mg/mL Buserelin acetate, Enjektabl solüsyon, İntervet, Almanya) IM olarak uygulanıp dört saat sonra gruplara teke katımı yapıldı. Her dişi bir teke ile çiftleştirilerek kaydı tutuldu. Akşam çiftleştirmeler tekrarlandı.

19.gün: İlk koç katımından sonraki 7. gün keçiler uterus yıkaması için operasyona alındı.

Çizelge 2.2.1.1. Süperovulasyon Protokolü

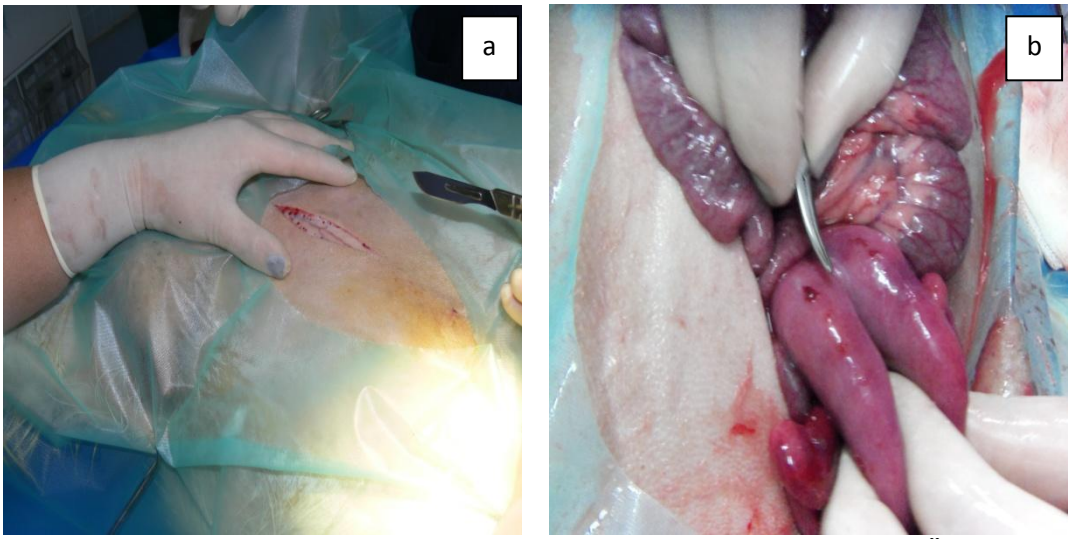
Günler	Sabah	Akşam
0. Gün	Sünger takıldı	
9. Gün	2,2 ml $PGF_2\alpha$ (IM), 2,5 ml FSH (IM)	2,5 ml FSH (IM)
10. Gün	1,5 ml FSH (IM)	1,5 ml FSH (IM)
11. Gün	Sünger çıkarıldı 1 ml FSH (IM)	1 ml FSH (IM)
12. Gün	2 ml GnRH Çiftleştirme	Çiftleştirme

Hayvanlar üreme sezonunda kullanıldı ve diğer sezona kadar barındırılarak yeterli embriyo elde etmek amacıyla aynı işlemler ikinci sezonda tekrarlandı. Bu nedenle hayvanlar 15 ay süreyle gözlem altında tutuldu.

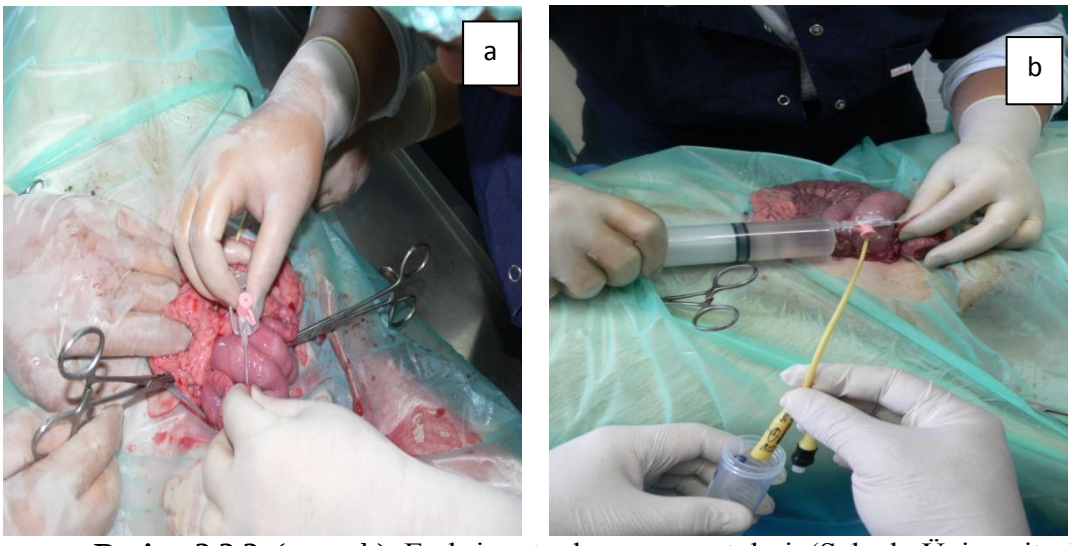
2.2.2. Embriyoların Elde Edilmesi

Keçiler operasyon öncesinde 12 saat süreyle aç bırakıldı. Keçilerde çiftleşme sonrası 7. günde uterus yıkaması yapıldı. Aynı gün içerisinde 2 hayvana operasyon uygulandı. Genel anestezi öncesi sedasyon sağlamak amacıyla 0,22 mg/kg dozunda Xylazin (Rompun® %2, Enjektabl solüsyon, Bayer, İstanbul) IM

olarak uygulandıktan sonra genel anestezi için 2 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Ketasol %10, Enjektabl solüsyon, Richter pharma, İstanbul) uygulandı. Operasyonun yapılacağı bölgenin (memeler ile göbek deliği arasında kalan kısım) temizliği yapıldı.



Resim 2.2.1. (a ve b) Embriyo toplama görüntüleri (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).



Resim 2.2.2 (a ve b) Embriyo toplama görüntüleri (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).

Paramedian hat üzerinden, ensizyon ile karın boşluğuna girildi ve uterus bulunduktan (Resim 2.2.1.a ve Resim 2.2.1.b) sonra ovaryumlar üzerindeki Cl ve folliküller sayılarak ovaryum bulguları not edildi. Uterus yıkamasında iki yollu kateter [Foley kateteri (Rusch, 8-10 ch, Bıçakçıklar, İstanbul)] kullanıldı. Foley

kateteri uterusun corpus bölgesindeki damarsız bir yerden küt olarak açılan delikten lümene sokuldu ve uterus kornularına sırasıyla yönlendirilerek yerleştirildi.

Utero-tubuler birleşim bölgesinden intravenöz kanül (IV kanül,18 G, Bıçakçılar, İstanbul) ile girildikten (Resim 2.2.2.a) sonra stilesi çıkartılıp buradan yıkama medyumu [%1 fötal calf serum (FCS)+medyum 199] yavaş yavaş lümene verildi (Resim 2.2.2.b). Uterusa iki defa 20'şer mL'lik vasat verilerek yıkama yapıldı. Verilen yıkama vasatı steril 50 ml'lik konik tüplere foley kateteri yardımıyla geri alındı. Böylece her iki kornu ayrı ayrı yıkanmış oldu. Alınan yıkantılar embriyoların çökmesi için yaklaşık olarak 30-45 dk. 37ºC' lik su banyosunda bekletildi.

2.2.3. Embriyoların Değerlendirilmesi

Yıkama sonrasında elde edilen yıkantı stereomikroskopta tarandı ve toplanan embriyolar stereo mikroskopta morfolojik olarak incelendi. IETS tarafından belirlenen kriterlere göre 1. kalite (mükemmel yada iyi), 2. kalite (orta), 3. kalite (zayıf), 4. kalite (dejenere yada ölü) olarak sınıflandırıldı (www.iets.org). Birinci ve ikinci kalitedeki embriyolar dondurulduu.

2.2.4. Embriyoların Dondurulması

Dondurulacak embriyolar etilen glikol, gliserol ve DMSO kullanılarak yavaş dondurma yöntemiyle dondurulduu.

Grup 1 Etilen Glikol; üç aşamalı dondurma uygulandı ve kullanılan vasatlar PBS içerisinde sırasıyla 0,5-1-1,5 M etilen glikol içerdi (Çizelge 2.2.4.1).

Çizelge 2.2.4.1. Etilen glikolle yavaş dondurma işlemi.

Etilen Glikol	Bileşimi	Süre
1. Aşama	0,5 M etilen glikol	10 dakika
2. Aşama	1 M etilen glikol	10 dakika
3. Aşama	1,5 M etilen glikol	10 dakika



Şekil 2.2.4.1. Embriyo dondurma payetinin şematik görünümü.



Resim 2.2.4.1. Cryocell embriyo dondurma cihazı. (Çizmeci SÜ, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 2012).

Grup 2 Gliserol; üç aşamalı dondurma uygulandı ve kullanılan vasatlar PBS içerisinde sırasıyla 0,5-1-1,4 M gliserol içerdi (Çizelge 2.2.4.2).

Çizelge 2.2.4.2. Gliserolle yavaş dondurma işlemi.

Gliserol	Bileşimi	Süre
1. Aşama	0,5 M gliserol	10 dakika
2. Aşama	1 M gliserol	10 dakika
3. Aşama	1,4 M gliserol	10 dakika

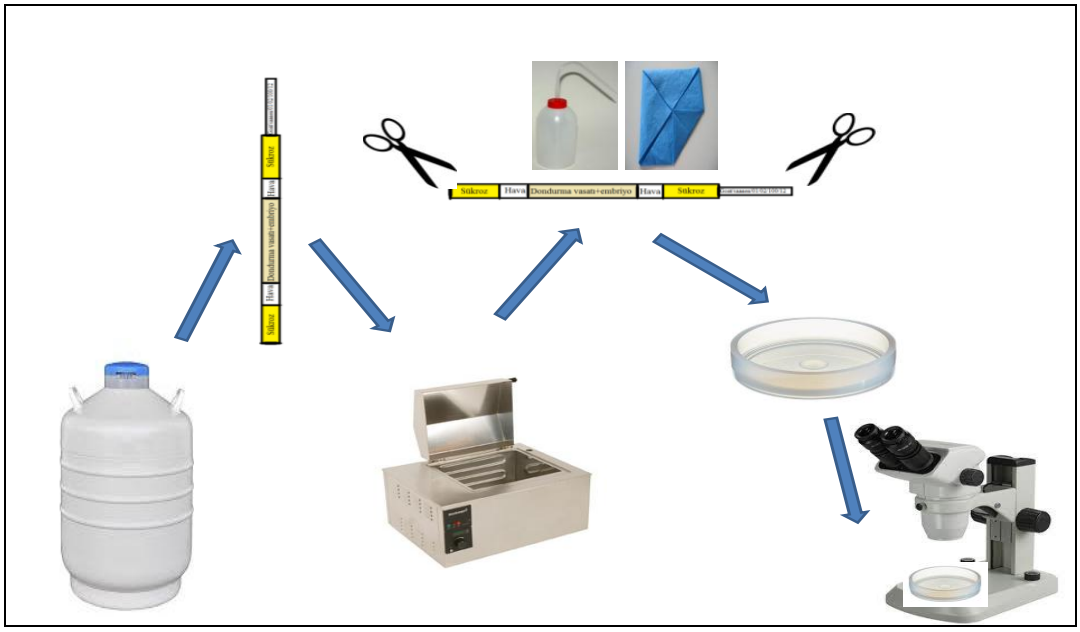
Grup 3 DMSO; üç aşamalı dondurma uygulandı ve sırasıyla % 10 DMSO-DPBS- % 10 DMSO içeren vasatlar kullanıldı (Çizelge 2.2.4.3).

Çizelge 2.2.4.3. DMOS ile yavaş dondurma işlemi.

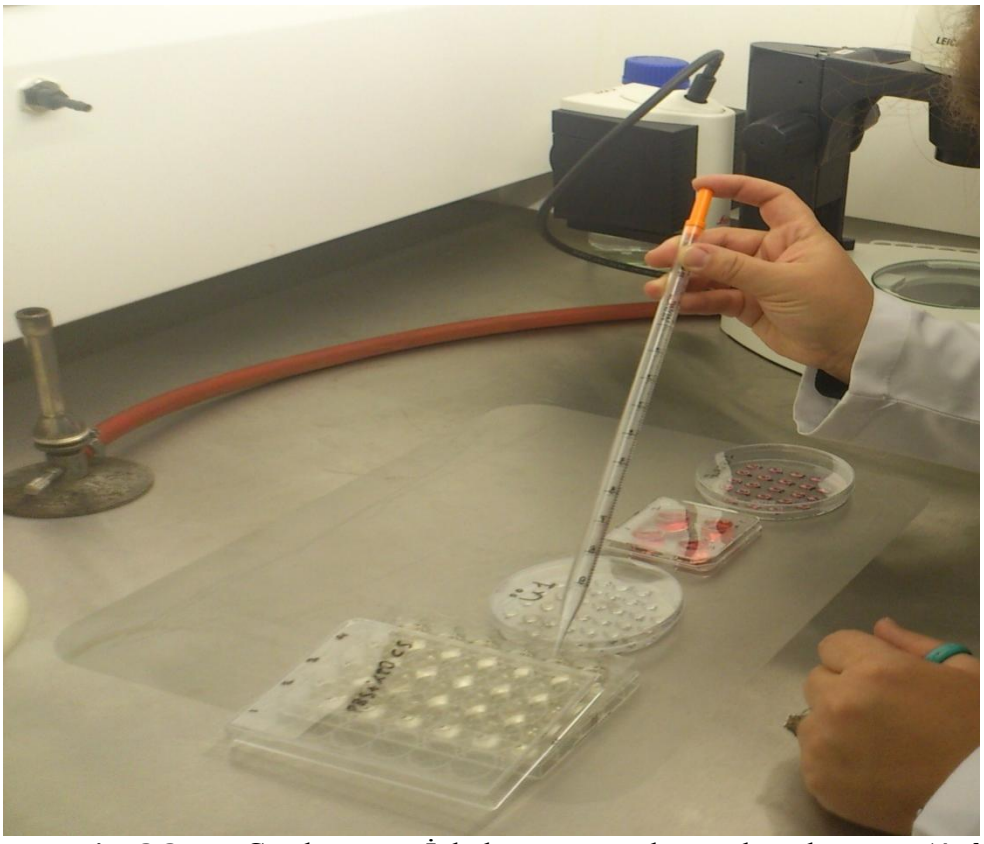
DMSO	Bileşimi	Süre
1. Aşama	% 10 DMSO	10 dakika
2. Aşama	D- PBS	Yıkama
3. Aşama	% 10 DMSO	Freezing

2.2.5. Embriyoların Çözdürülmesi

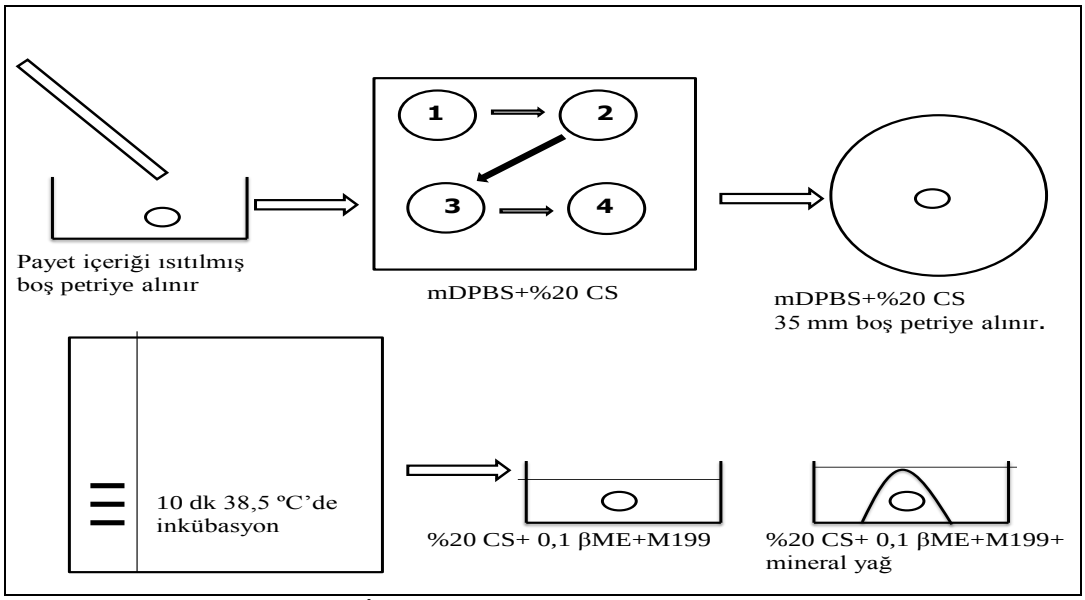
Embriyoların çözdürülme işlemi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı'nda yürütüldü. Çözdürme işlemi için öncelikle %20 Fetal Calf Serum (FCS) içeren Modified Dulbecco phosphate buffer solutions (m-DPBS) ve %20 FCS + 0,1 mM Beta mercaptoethanol (βME)+M-199 vasatları hazırlanarak petrilere droplandı (Resim 2.2.5.1). Payetler sıvı azottan çıkartılıp 10 sn süreyle havada ve daha sonra 20 sn 37 ºC'lik su banyosunda tutuldu. Çıkarıldıktan sonra payetler önce alkollü pamuk daha sonra ise kuru pamukla silindi. Payetin uçları kesilerek embriyonunda içinde buluduğu payet içeriği petriye aktarıldı (Şekil 2.2.5.1.).



Şekil 2.2.5.1. Embriyoların çözdürmesi ve değerlendirilmesi.



Resim 2.2.5.1. Çözdürme ve İnkübasyon vasatlarının hazırlanması. (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı, 2014).



Şekil 2.2.5.2. Çözdürme ve İnkübasyon protokolü.

Mikroskop altında incelenerek bulunan embriyo %20 FCS+m-DPBS solüsyonunda 4 kez yıkandıktan sonra 38,5 ºC'de10 dk inkübatörde bekletildi. Daha sonra %20 FCS 0,1+mM βME+M-199 (Kültür vasatı) vasatında yıkandı ve

aynı solüsyon içerisinde inkübasyona bırakıldı (Şekil 2.2.5.2). Çözdürme ve İnkübasyon. Embriyo gelişimi 24, 48 ve 72. saatlerde takip edildi.

Bu çalışmada embriyolar inkübasyona alındıkları aşamalara göre değerlendirildi. Değerlendirme, embriyo çözdürme esnasında bulunduğu gelişme aşamasından 24, 48 ve 72. saatlerde bir sonraki aşamaya ilerleyip ilerlememesi takip edilerek yapıldı. Canlı ve ölü embriyolar not edildi ve fotoğraflandı.

2.3. İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışma sonrasında embriyo canlılık oranları 24, 48 ve 72. saatler dikkate alınarak değerlendirildi. Etilen glikol, glirserol ve DMSO'nun, embriyo gelişim dönemleri ve kalitelerinin embriyo canlılığı üzerine etkileri 'oranlar arası farklılıkların belirlenmesinde t testi' kullanılarak yapıldı. $P<0,05$ değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi (İnal 2005).

3. BULGULAR

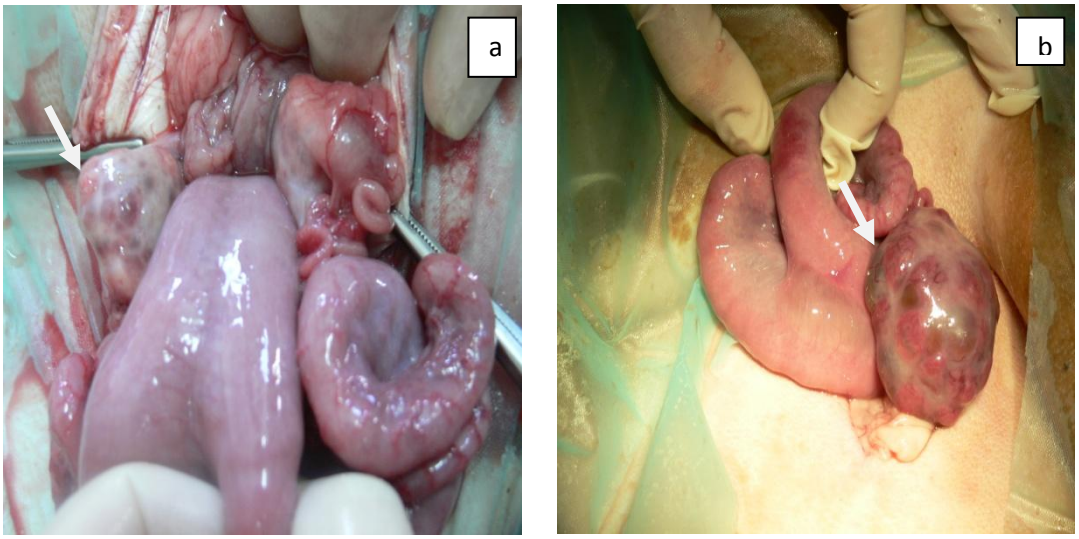
Sunulan çalışmada 15 adet Saanen ırkı keçide iki sezonda uygulanan senkronizasyon ve süperovulasyon uygulamaları sonrasında alınan östrus ve süperovulasyon cevapları, embriyo elde etme oranları, erken luteal regresyon görülme oranları ve yapılan uterus yıkama sayıları Çizelge 3.1. de belirtildi. Birinci sezonda süperovulasyon uygulanan 15 hayvandan 14'ünde 4 ve 4'ten fazla sayıda Cl (Resim 3.1.a, Resim 3.1.b) tespit edildi. İkinci sezonda ise 13 hayvandan 11'inde süperovulasyon uygulamasına cevap alındı (Resim 3.2.a, Resim 3.2.b). Birinci sezonda sayılan toplam 132 Cl'a karşılık 81 hücre, ikinci sezonda ise sayılan 119 Cl'a karşılık 86 hücre toplandı. Birinci ve ikinci sezonda sırasıyla 4 ve 2 hayvanda erken luteal regresyon şekillendi. Erken luteal regresyon görülen ve süperovulasyona cevap vermeyen hayvanlarda uterus yıkaması yapılamadı. Her iki sezonda da senkronizasyon yapılan tüm hayvanlar östrus gösterdiler (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Östrus görülme, süperovulasyon, embriyo toplama, erken luteal regresyon, fertilizasyon ve transfer edilebilir embriyo oranları.

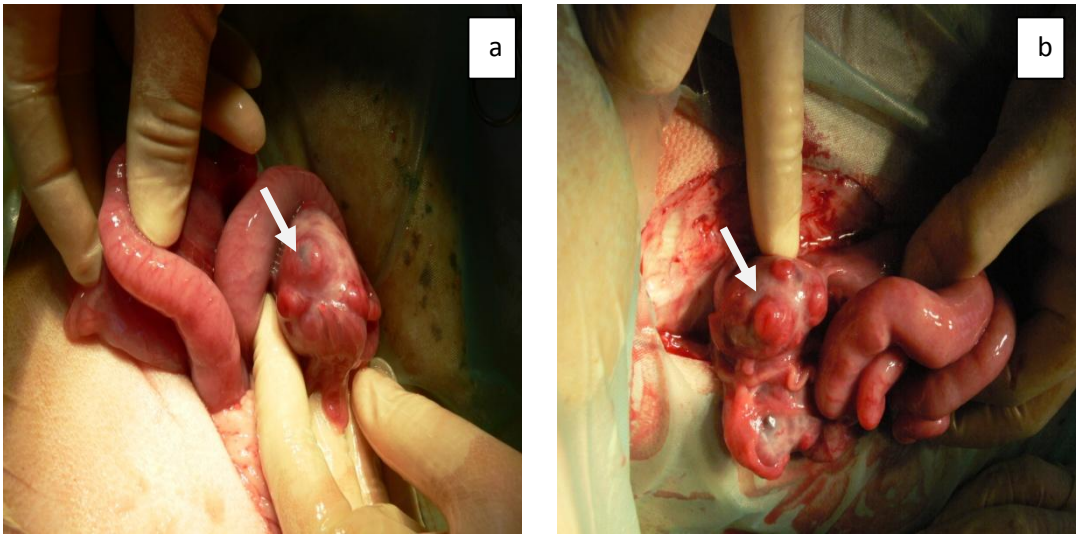
Sezon	1. Yıkama	2. Yıkama
Östrus Görülme Oranı (%)	100 (15/15)	100 (13/13)
Süperovulasyon Oranı (4≥ Cl) (%)	93,33 (14/15)	84,62 (11/13)
Embriyo Toplama Oranı (%)	61,36 (81/132)	72,27 (86/119)
Erken Luteal Regresyon Oranı (%)	26,67 (4/15)	15,38 (2/13)
Transfer Edilebilir Embriyo Oranı (%)	79,66 (47/59)	84,13 (53/63)

Birinci ve ikinci sezondaki uterus yıkamaları sonucunda (Resim 3.2.) toplanan 167 hücrenin 45 adedinin UFO (fertilize olmamış oosit) 122 adedinin ise embriyo olduğu belirlendi (% 73,05). Embriyoların 100 adedi dondurulabilir nitelikte iken 22 adedinin dejenere yada ölü olduğu (% 18,03) tespit edildi. Etilen glikolle 37 adet, Gliserolle 31 adet ve DMSO ile 32 adet olmak üzere toplam 100 adet embriyo geleneksel yavaş yöntemle dondurulduu. Elde edilen embriyoların gelişim dönemlerine göre dağılımları ise % 34'ü kompakt morula, % 66' sının ise

blastosist olduğu belirlendi. Blatosisitlerin ise erken blastosist (% 20), blastosist (% 36) ve expanded blastosist (% 10) dönemlerinde oldukları belirlendi (Çizelge 3.2). Dondurulan embriyoların 64 tanesi Grade 1 ve 36 tanesi ise Grade 2 idi.



Resim 3.1. (a ve b) Ovaryumlardaki corpus luteumlar ve süperovulasyon cevapları (Ok:Cl), (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).



Resim 3.2. (a ve b) Ovaryumlardaki corpus luteumlar ve süperovulasyon cevapları (Ok:Cl), (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinikleri, 2012).

Elde edilen embriyoların farklı kriyoprotektanlar kullanılarak dondurulup çözdürülmesinin ardından 24, 48 ve 72. saatlerde (Resim 3.3 ve 3.4) yapılan canlılık muayeneleri sonucunda; Etilen glikolle dondurulan embriyoların canlılık

oranlarında 24 ve 72. saatler arasında, gliserol ve DMSO ile dondurulan embriyoların yaşama oranlarında ise 24-72. saatler ve 48-72. saatler arasında istatistiki fark olduğu belirlendi (P<0,05). Canlılıkların gruplar arası değerlendirmesinde ise 24 ve 48. saatlerde fark çıkmazken 72. saatte etilen glikol ve DMSO arasında istatistiki fark tespit edildi (P<0,05) (Çizelge 3.3).

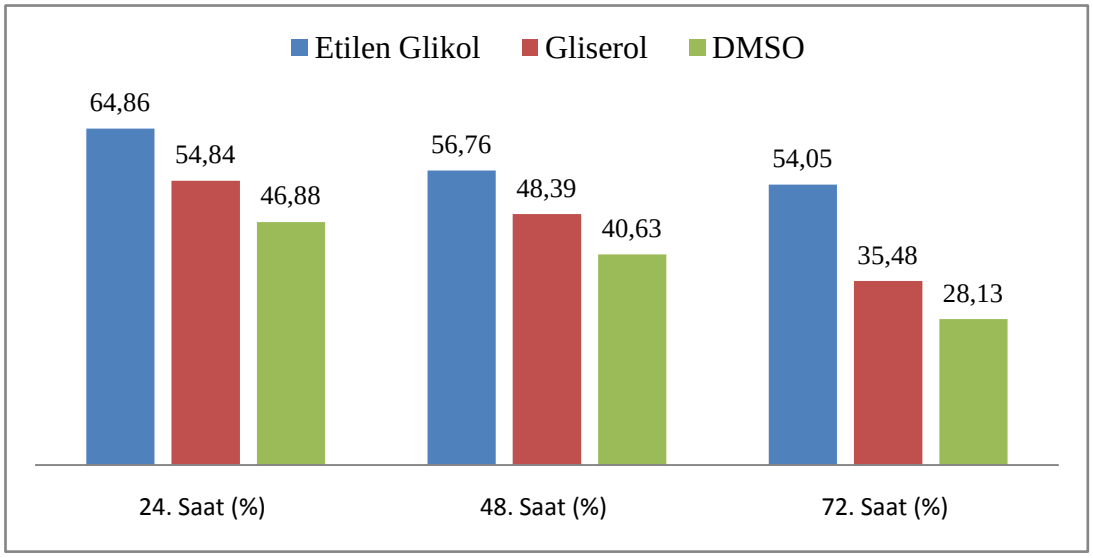
Çizelge 3.2. Yıkama gününde gelişim aşamalarına göre embriyo dağılımı.

Toplam Embriyo (%)	Kompakt Morula (%)	Erken Blastosist (%)	Blastosist (%)	Expanded Blastosist (%)
100	34 (34)	20 (20)	36 (36)	10 (10)

Çizelge 3.3. Çözdürme sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlılık oranları.

Kriyoprotektan	24. saat (%)	48. saat (%)	72. saat (%)
Etilen Glikol	64,86 ^{a}	56,76 ^{ab}	54,05 $^{b, A}$
Gliserol	54,84^{a}	48,39^{ab}	35,48$^{b, AB}$
DMSO	46,88 ^{a}	40,63 ^{ab}	28,13 $^{b, B}$

$^{a,\ b \text{ ve } A,\ B}$ Aynı satırda ve sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0,05).



Şekil 3.1. Çözdürme sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlılık oranları.

Oransal olarak değerlendirmede her üç kriyoprotektan grubunda da 72. saate ulaşan embriyo oranında düşme tespit edildi. Kriyoprotektanlar arasında ise etilen glikolle dondurulan embriyoların 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlılıklar diğer iki kriyoprotektandan daha yüksek bulundu. Gliserol kullanılarak dondurulan embriyoların canlılık oranları DMSO grubundakilere göre daha iyi olsa da 24. saatten sonra canlılık oranlarının daha hızlı düştüğü görüldü.

Dondurulup çözdürülen embriyoların gelişim aşamalarına göre değerlendirilmesinde gruplar arasında morulaların canlılık oranlarında istatistiki fark çıkmazken blastosistlerin canlılık oranlarında etilen glikol ve DMSO grupları arasında 24 ve 72. saatlerde istatistiki fark olduğu belirlendi ($P<0,05$). Grup içerisinde blastosistlerin 24, 48 ve 72. saatlerde yaşama oranlarında istatistiki fark belirlenmezken, morulaların yaşama oranlarında her üç grupta da 24-72. saatler arasında istatistiki olarak fark olduğu belirlendi ($P<0,05$) (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5).

Çizelge 3.4. 24, 48 ve 72. saatlerde Blastosistlerin canlılık oranları.

Kriyoprotektan	24. saat (%)	48. saat (%)	72. saat (%)
Etilen Glikol	76,0[a]	64,0	60,0[a]
Gliserol	54,55[ab]	45,45	36,36[ab]
DMSO	42,11[b]	36,84	21,05[b]

[a, b] Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($P<0,05$).

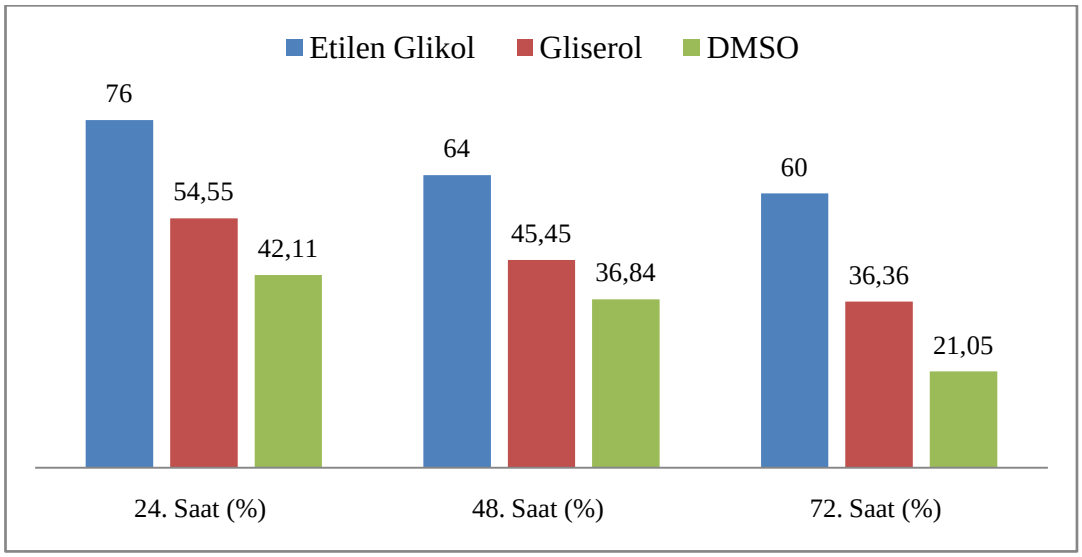
Çizelge 3.5. 24, 48 ve 72. saatlerde Morulaların canlılık oranları.

Kriyoprotektan	24. saat (%)	48. saat (%)	72. saat (%)
Etilen Glikol	45,54[a]	45,45[ab]	45,45[b]
Gliserol	55,56[a]	55,56[ab]	33,33[b]
DMSO	53,84[a]	46,15[ab]	38,46[b]

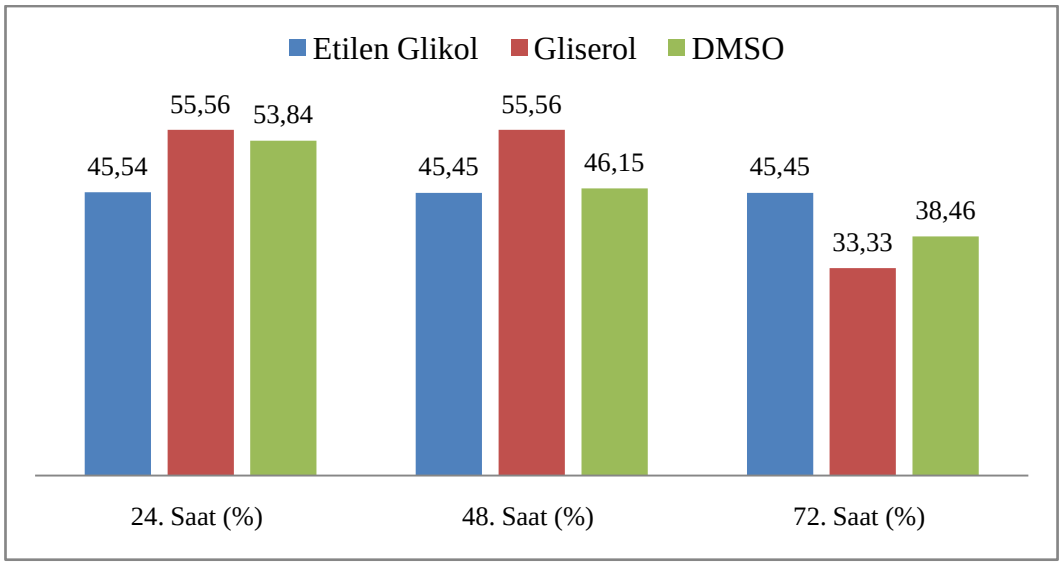
[a, b] Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($P<0,05$).

Oransal olarak değerlendirildiğinde; Etilen glikolle dondurulan embriyolarda blastosistlerin canlılıklarının morulalara nazaran daha yüksek olduğu

belirlendi. Gliserol ve DMSO ile dondurulan embriyolarda ise morulaların blastosistlere nazaran daha yüksek canlılık gösterdikleri görüldü (Çizelge 3.4). Etilen glikolle dondurulan blastosistlerin % 60'ının 72. saate ulaştığı görülürken DMSO ile dondurulan blastosistlerin sadece % 21,05'inin 72. saate ulaşabildiği tespit edildi (Çizelge 3.5). Etilen glikolle dondurulan morulaların % 45'inin ilk 24 saate canlı ulaştıkları ve bu embriyoların tamamının 72. saate kadar canlılıklarını sürdürdükleri görüldü.



Şekil 3.2. 24, 48 ve 72. saatlerde Blastosistlerin yaşama oranları.



Şekil 3.3. 24, 48 ve 72. saatlerde Morulaların canlılık oranları.

Embriyoların kaliteleri göz önüne alındığında gruplar arasında istatistiki fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Ancak bütün gruplarda oransal olarak Grade 1 embriyoların canlılıklarının Grade 2'lerden daha iyi olduğu (Çizelge 3.6 ve Çizelge

3.7) belirlendi. Etilen glikol kullanılarak dondurulan Grade 1 embriyoların % 63,64'ünün 72. saate ulaştığı belirlendi. Bunun yanında etilen glikol grubundaki Grade 2 embriyoların 72. saate ulaşma oranının DMSO grubundaki Grade 1 embriyolardan daha yüksek olduğu tespit edildi. Grup içerisinde değerlendirme yapıldığında Grade 2 embriyoların 24, 48 ve 72. saatlerde canlılık oranlarında istatistiki açıdan fark belirlenmezken, Grade 1 embriyoların gliserol ve DMSO gruplarında 24-72. saatlerde istatistiki açıdan önemli olduğu tespit edildi.

Çizelge 3.6. 24, 48 ve 72. saatlerde Grade 1 embriyoların canlılık oranları.

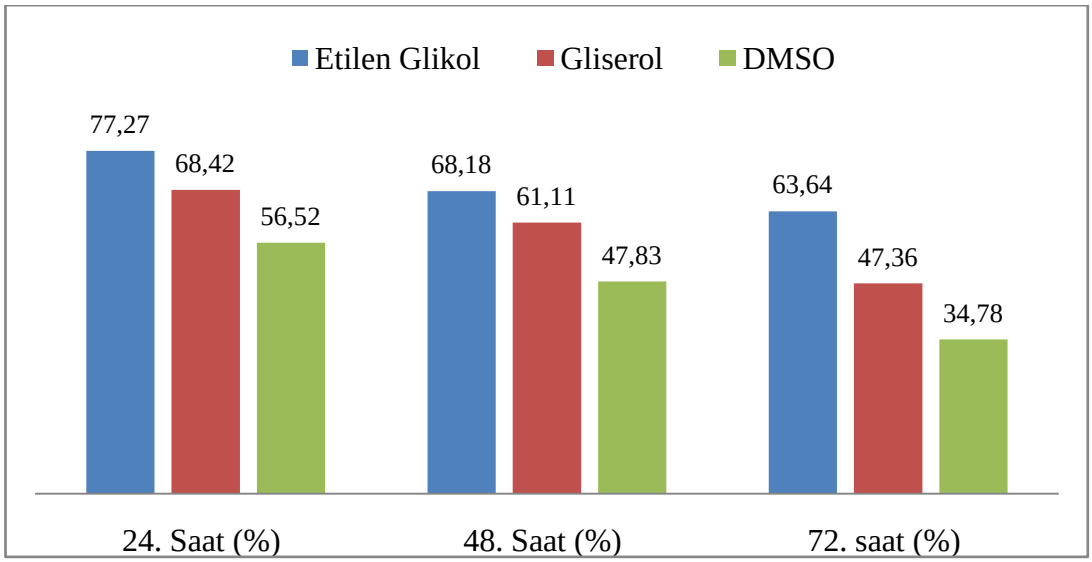
Kriyoprotektan	24. saat (%)	48. saat (%)	72. saat (%)
Etilen Glikol	77,27	68,18	63,64
Gliserol	68,42[a]	61,11[ab]	47,36 [b]
DMSO	56,52 [a]	47,83[ab]	34,78 [b]

[a, b] Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0,05).

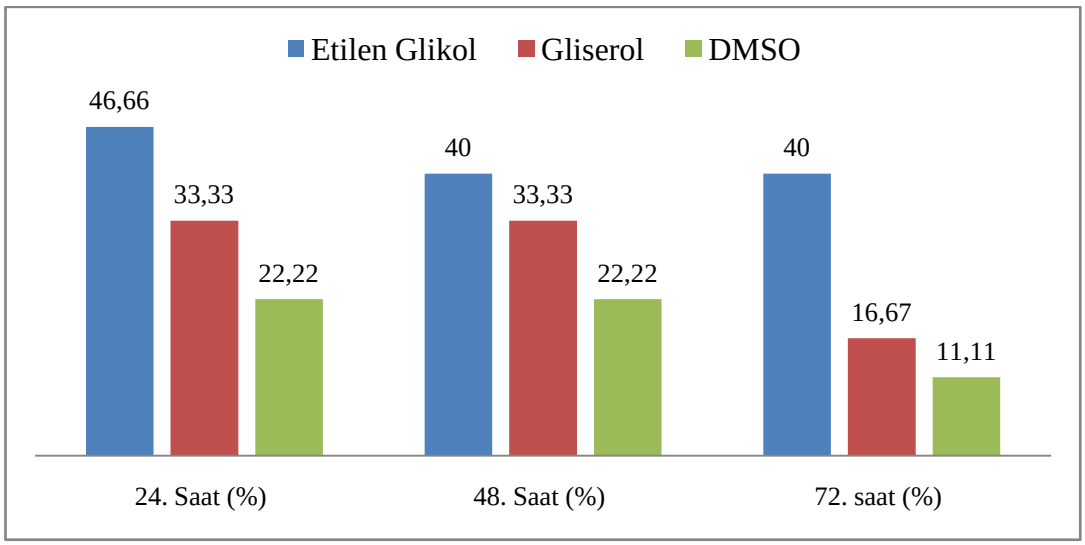
Çizelge 3.7. 24, 48 ve 72. saatlerde Grade 2 embriyoların canlılık oranları.

Kriyoprotektan	24. saat (%)	48. saat (%)	72. saat (%)
Etilen Glikol	46,66	40,0	40,0
Gliserol	33,33	33,33	16,67
DMSO	22,22	22,22	11,11

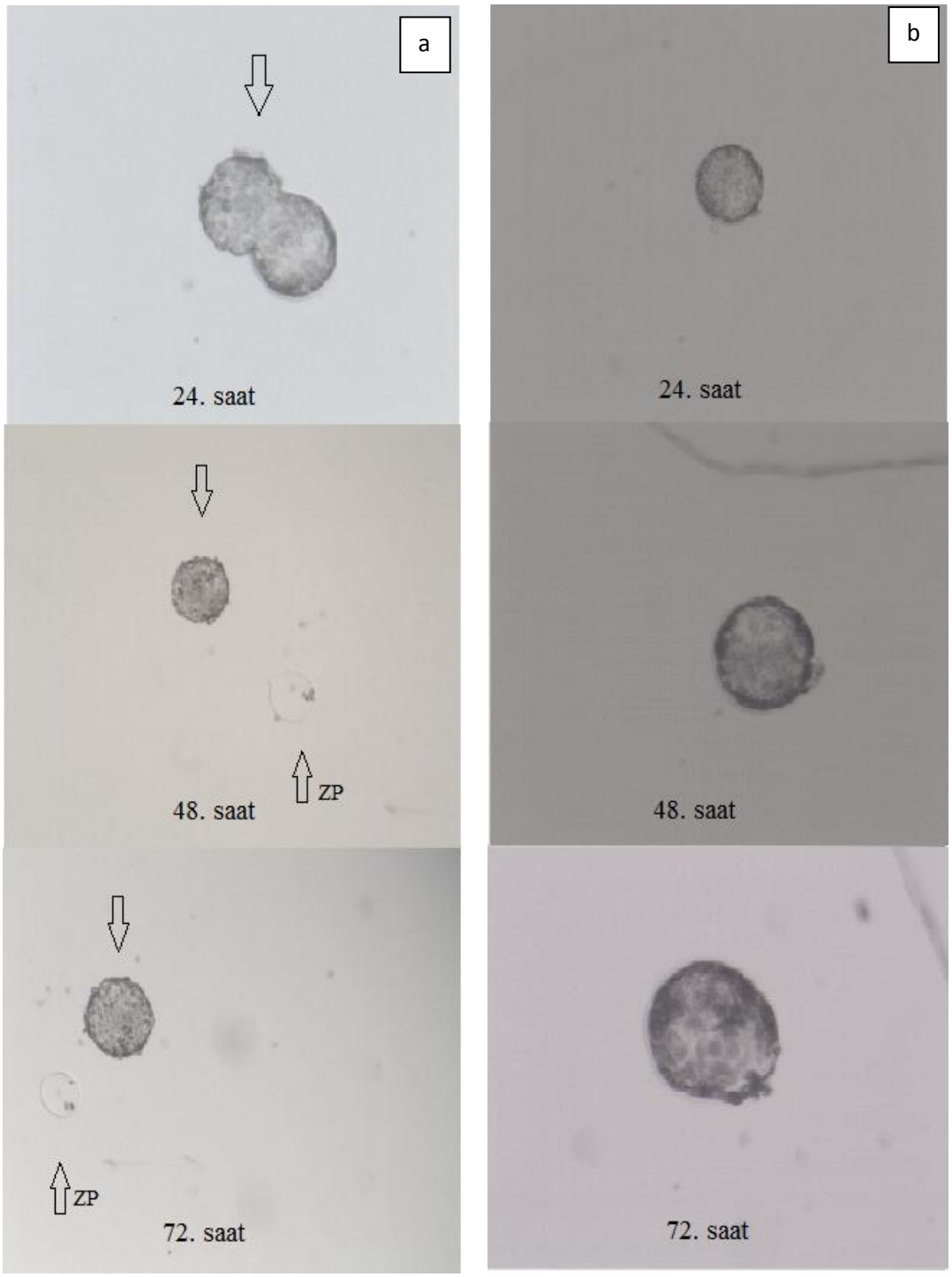
Her bir grup için aynı satırda ve sütunda istatistiki fark yoktur (p>0,05).



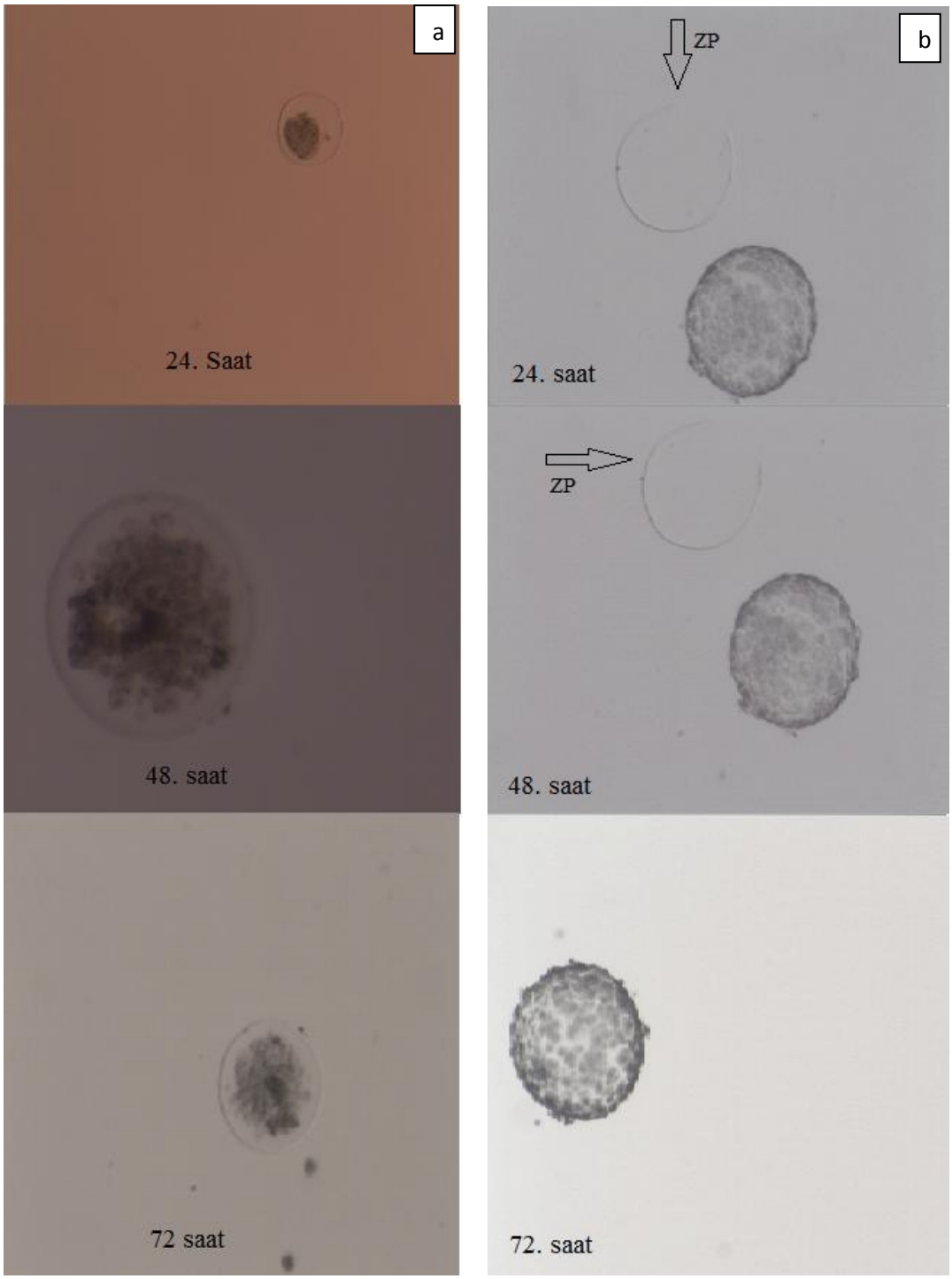
Şekil 3.4. 24, 48 ve 72. saatlerde Grade 1 embriyoların canlılık oranları.



Şekil 3.5. 24, 48 ve 72. saatlerde Grade 2 embriyoların canlılık oranları.



Resim 3.3. 24, 48 ve 72. saatlerde hatched embriyo gelişimi (ZP: Zone Pellusida). Hatching blastosistler a-1 ve b-3. Hatched blastosist a-2 ve a-3. (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı, 2014).



Resim 3.4. (a) 24, 48, ve 72. saatlerde embriyo gelişimi, (b) Hatched olan embriyonun gelişimine devam etmesi (ok: ZP: Zona pellucida). (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı IVF Laboratuvarı, 2014).

4. TARTIŞMA

Saanen keçileri üzerinde yapılan bu araştırmada birinci sezonda 15 ve ikinci sezonda ise 13 keçiye östrus senkronizasyonu uygulandı. Her iki sezonda da senkronizasyon uygulanan tüm keçiler de östrus gözlendi. Çalışma bulgularının diğer yapılan senkronizasyon çalışmalarıyla uyumluluk gösterdiği tespit edildi (Lehloenya ve ark 2008, Sarıbay ve ark 2008, Kılboz ve Karaca 2010, Lehloenya ve Greyling 2010a).

Geleneksel yöntem ile 0. gün protokolünün karşılaştırıldığı bir çalışmada, 0. gün protokolüyle % 85, geleneksel yöntemle % 50 oranında süperovulasyon cevabı elde edildiği bildirmiştir (Menchaca ve ark 2007). Greyling ve ark (2002), 12 saat arayla 3 gün uygulanan FSH sonrasında Güney Afrika yerli keçilerinde % 87,5 ve Boer keçilerinde ise % 50 süperovulasyon cevabı elde ettiklerini bildirmektedirler.

Mayorga ve ark (2011)' nın yapmış olduğu çalışmada ise geleneksel yöntem progesteronsuz yöntemle karşılaştırılmıştır. Süperovulasyon cevabını 3 ≥Cl varlığı ile belirleyen araştırmacılar her iki uygulamada da % 100 süperovulasyon cevabı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Süperovulasyon cevabı; ırk, yaş, genel kondüsyon, hormon tipi, uygulama şekli, iklim, beslenme ve çevresel koşullardan etkilenmektedir (Mapletoft ve ark 2002). Genel olarak normal ve fertil olan tüm verici hayvanların % 85'i süperovulasyon uygulamasına cevap verir (Tekeli 2001). Sunulan çalışmada birinci sezonda ve ikinci sezonda sırasıyla % 93,33 ve % 84,62 oranında süperovulasyon cevabı elde edildi. Süperovulasyonda elde edilecek cevabın bilinememesi, hayvanlar arasında farklılıklar göstermesi ve birçok faktörden etkilenmesi nedeniyle embriyo transfer çalışmalarında da başarıyı etkileyen en önemli faktörlerdendir. Literatürlerde de süperovulasyon cevapları arasında tam bir uyum belirlenememekle birlikte sunulan çalışmada süperovulasyon sonuçlarıyla diğer çalışmaların sonuçları arasında önemli bir farklılık görülmedi. Elde edilen bu sonuçta keçileri ihtiyaçlarını karşılayacak düzeyde besleme ile yeterli ve uygun dozda FSH kullanımının etkili olduğu düşünüldü.

Koyunlar üzerinde yapılan tekrarlayan süperovulasyon çalışmasında, uygulanan üç süperovulasyon sonrasında FHS kullanılan grupta sırasıyla %67; %80

ve %92, tek doz FSH+eCG kullanılanda ise %94; %92 ve %100 oranında süperovulasyon cevabı elde edildiği ve oluşan Cl sayısında ilk uygulamadan sonra önemli düzeyde düşüş olduğu bildirilmektedir. Araştırıcılar bu durumun sebebinin açık olmadığını ancak beslenme yetersizliğinin, follikül popülasyon durumunun veya gonadotropinin başlangıç zamanının etkili olabileceğini bildirmişlerdir (Forcada ve ark 2011). Chang ve ark (2006) tarafından yapılan çalışmada tekrarlayan süperovulasyon uygulamaları sonrasında süperovulasyon cevabı ve transfer edilebilir embriyo oranlarında ikinci uygulamada önemli bir düşüş meydana gelmezken üçüncü uygulamada oranların düştüğünü bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada da literatürlerle uyumlu tekrarlayan süperovulasyon cevabı elde edildi. Çalışmada süperovulasyon cevabının hangi sebepten etkilendiği yada ikinci sezondaki mevcut düşüşün neye bağlı olabileceğinin belirlenmesi mümkün olamadı. Ancak yaşanan bu düşüşün, tekrarlayan süperovulasyon uygulamasına veya hayvanların operasyon ve uterus yıkaması sonucu uterus ve ovaryumlarının olumsuz etkilenmesine bağlı olabileceği aynı zamanda tekrarlayan dozlarda FSH uygulaması sonucunda FSH antikorlarının gelişebileceği ve bu antikorların süperovulasyon cevabını düşürebileceği de düşünüldü.

Yerli keçilerle Boer keçilerinin kullanıldığı bir çalışmada embriyo elde etme oranları sırasıyla % 80 ve % 94 olarak bildirilmiştir (Greyling ve ark 2002). Mayorga ve ark (2011), geleneksel yöntemle yapılan süperovulasyon sonucunda embriyo elde etme oranlarının % 80 olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada progesteron kullanılmadan yapılan süperovulasyon protokolünde ise embriyo elde etme oranının % 67 olduğunu bildirmişlerdir.

Keçilerde FSH ve eCG ile süperovulasyon cevaplarının karşılaştırıldığı bir çalışmada FSH uygulanan hayvanlarda embriyo toplama oranı % 65,5 iken eCG uygulanan hayvanlarda ise % 81,5 olduğu bildirilmiştir (Maracek ve ark 2002).

Yapılan çalışmada embriyo elde etme oranları birinci ve ikinci sezonda % 61,36 ve % 72,27 olarak bulundu. İlk sezonda oranın ikinci sezondan daha düşük olmasının erken luteal regresyona ve süperovulasyon cevabı yüksek olan hayvanlarda embriyo toplama oranlarının düşük olmasına bağlı olabileceği düşünüldü.

Lehloenya ve Greyling (2009)'in yaptıkları çalışmada, süperovulasyon uygulanan hayvanların % 38,1'inde erken luteal regresyon görüldüğünü bildirmektedir. Diğer bir çalışmada ise; hCG, GnRH ve kontrol grubundan oluşan deney düzeneğinde, uygulanan süperovulasyonlar sonrasında günlük progesteron ölçümleri yapılmıştır. hCG uygulanan grupta progesteron seviyeleri normal seyrederken, GnRH grubunda % 37,5 kontrol grubunda ise % 57,2 erken luteal regresyon oranı görüldüğü bildirilmektedir (Saharrea ve ark 1998).

Sunulan araştırmada birinci sezonda % 26,67 ikici sezonda ise % 15,38 oranında erken luteal regresyon görüldü. Literatür verileri ile karşılaştırıldığında erken luteal regresyon oranlarının normal aralıklarda şekillendiği belirlendi.

Progesteron kullanılmadan yapılan süperovulasyon protokolünün klasik yöntemle (kontrol) karşılaştırıldığı çalışmada transfer edilebilir embriyo oranlarının sırasıyla % 97 ve % 96 olduğu belirlenmiştir (Mayorga ve ark 2011). Qaun ve ark (2010) tarafından yapılan süperovulasyon sonucunda ise transfer edilebilir embriyo oranı % 85.43 olarak bildirilmiştir.

Lehloenya ve Greyling (2010b) 0. gün protokolü (Grup 1), CIDR/PGF2α/FSH (Grup 2) ve CIDR/FSH (Grup3) kullanılarak yaptıkları çalışmada Grup1'de fertilizasyonun hiç oluşmadığını, Grup 2 ve 3 arasında transfer edilebilir embriyo oranlarında istatistiki bir fark olmadığını bildirmiştir.

Yapılan bu çalışmada embriyo kaliteleri ve gelişim dönemleri belirlendikten sonra transfer edilebilir embriyo oranları birinci sezonda % 79,66 ve ikinci sezonda % 84,13 olarak belirlendi. Değerlendirilen literatür bilgiler ışığında transfer edilebilir nitelikteki (Grade 1 ve Grade 2) embriyo oranlarımızın çalışmalarla örtüştüğü tespit edildi. Embriyo sayısı ve kalitesini etkileyen önemli faktörler süperovulasyon cevabı ve ovulasyon sayısıdır. Ovulasyon sayısının 10-12 den fazla olması fertilizasyon oranını ve embriyo kalitesini olumsuz etkilemektedir.

Grizelj ve ark (2006), keçiler üzerinde yaptıkları ön çalışmada 7. günde elde edilen 24 embriyonun % 54,16'sının kompakt morula, % 12,50'sinin erken blastosist, % 8,33'ünün blatosist, % 20,83'ünün expanded blastosist ve % 4,17'sinin hatched blastosist olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda embriyolar aşımdan 96 saat sonra morula, 7-8 gün sonra ise blastosist aşamasındadır (Gordon 1997). Embriyo toplama işlemi genellikle 7. günde yapılır ve bu günde embriyolar kompakt morula ile expanded blastosist aşamaları arasında bulunabilir (Gordon 1997, Stringfellow 2010, Wright 2010). Yapılan çalışma sonrasında elde edilen embriyoların % 34'ü kompakt morula, % 66'sı ise blastosist aşamasındaydı. Blastosistler ise % 20 oranında erken blastosist, % 36 oranında blastosist ve % 10 oranında expanded blastosist şeklinde dağılım gösterdi. Ovulasyonların zamana yayılması ve embriyoların gelişim dönemlerinde farklılıkların görülebilmesi nedeniyle çalışmamızda elde edilen verilerin literatürlerle uyumlu olduğu görüldü.

Etilen glikol kullanılarak yavaş metotla dondurulan sığır embriyolarının 0, 24 ve 48. saatlerde canlılık oranları % 79,5; % 50,0 ve % 50,0 olarak bildirilmiştir (Dochi ve ark 2000). Etilen glikol ve propilen glikolün embriyoların canlılığı üzerine etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; in vitro üretilen sığır embriyolarının kültür sonrası canlılık oranları propilen glikolde % 79,3 etilen glikolde ise % 75 olarak bildirilmiştir. Hatched oranları ise propilen glikolde % 62 iken etilen glikolde %47 olarak bildirilmiştir (Takagi ve ark 1993).

Koyun embriyoları üzerinde yapılan bir araştırmada 24. saatteki canlılık oranları DMSO+% 5 FCS'de % 82 iken, DMSO+% 20 FCS'de % 57 olarak bildirilmiştir (Shelton ve Szell 1988). Martinez ve ark (1996)'nın koyun embriyolarında etilen glikol ve gliserolün etkilerini karşılaştırdıkları çalışmada ise 72. saat inkübasyon sonrasında canlılık oranlarını sırasıyla % 70; % 74 iken hatched oranları ise % 48 ve % 51 olarak bildirmişlerdir.

Koyun embriyolarında etilen glikolün tek (a-1) ve 2 (a-2) aşamalı ilave edilmesi ve yine tek (b-1) ve 2 (b-2) aşamalı olarak uzaklaştırılmasının karşılaştırıldığı çalışmada 24. saat canlılık oranları ve hatched embriyo oranları sırasıyla; a-1/ b-1'de % 76,9 ve %53,8; a-1/b-2'de %92,3 ve 53,8; a-2/b-1'de % 53,8 ve % 38,5; a-2/b-2'de ise % 76,9 ve %46,2 olarak bildirilmiştir (McGinnis ve ark 1989). Matsukawa ve ark (2001) tarafından in vivo olarak üretilen ve etilen glikol kullanılarak dondulan embriyoların 72. saatteki canlılık oranları % 100 hatched oranları ise % 87 olarak bildirilmiştir.

İn vitro üretilen sığır embriyolarının etilen glikol ve gliserol kullanılarak dondurulduğu çalışmada; embriyolar kriyoprotektanla 10 ve 40 dakika maruz bırakılarak 24 ve 72. saatlerde canlılık ve gelişim oranlarına bakılmıştır. Embriyoların kriyoprotaktanla 10 dakika maruz kaldığı grupta etilen glikol ve gliserol'ün 24. saatteki canlılık oranları % 95,3; 96,4 ve 72. saate ulaşma oranları ise % 95; % 93,6 olarak bulunmuştur. Kriyoprotektanlara 40 dakika maruz bırakılan embriyolarda ise 24. saat % 90,7; %91,0 ve 72 saat ise % 93,3; % 85,4 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada erken blastosist, blastosist ve expanded blastosistlerin 24. saat canlılık oranları % 62,5; % 86,2; % 88,8 ve 72. saat oranları ise % 50,0; % 68,1; % 84,0 olarak tespit edilmiştir (Hasler ve ark 1997). Frank ve ark (1985) sığır embriyoları üzerinde yaptıkları çalışmada DMSO ve gliserolle yavaş metot kullanılarak dondurmanın canlılık üzerine etkilerini karşılaştırmış ve 24. saatte canlılık oranlarını DMSO'da % 10,5 ve Gliserolde % 11,2 olarak bildirmişlerdir.

Yavaş dondurma yönteminde gliserol ve etilen glikolün değerlendirildiği çalışmada 24. saatteki canlılık oranları sırasıyla % 23,3 ve % 62,5 olarak bildirilmiştir (Cocero ve ark 1988). Smith ve ark (1994)'nın in vivo üretilen koyun embriyolarını gliserolle dondurdukları çalışmada; kriyoprotektan 1, 3 ve 5 aşamalı olarak uzaklaştırılmış ve canlılık oranları sırasıyla 24. saatte % 68; % 62; % 27, 36. satte % 46; % 48; %15 ve 48. saateki % 36; % 38; % 12 olarak bulunmuştur.

İn vivo ve in vitro olarak üretilen sığır embriyoları etilen glikol kullanılarak dondurulup çözdürülmüş ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İn vivo üretilen embriyolarda; reexpansiyon oranının %86 ve hatching oranının ise %81 olduğu, tespit edilmiştir. İn vitro üretilenlerde ise bu oranlar % 40 ve % 20 olarak bildirilmiştir (Willamil ve ark 2012). Etilen glikolle yavaş metotla dondurulan keçi embriyolarının çözdürülerek transferinde gebelik oranları sırasıyla % 50,0 iken embriyo yaşama oranları ise % 25 bildirilmiştir (Lehloenya ve Greyling 2010b).

Sunulan çalışmada elde edilen embriyoların farklı kriyoprotektanlar kullanılarak dondurulup çözdürülmesinin ardından 24, 48 ve 72. saatlerde yapılan canlılık muayeneleri sonucunda; etilen glikolle dondurulan embriyoların canlılık oranlarında 24 ve 72. saatler arasında istatistiki açıdan fark tespit edilirken, gliserol ve DMSO ile dondurulan embriyoların yaşama oranlarında 24-72. saatler ve 48-72.

saatler arasında istatistiki fark olduğu belirlendi (P>0,05). Canlılıkların gruplar arası değerlendirmesinde ise 24 ve 48. saatlerde fark çıkmazken 72. saatte etilen glikol ve DMSO arasında istatistiki fark tespit edildi (P>0,05) (Çizelge 3.3). Etilen glikol grubunda canlılık oranları sırasıyla % 64,86; % 56,76; % 54,05 gliserol grubunda % 54,84; % 48,39; % 35,48 ve DMSO grubunda ise % 46,88; % 40,63; % 28,13 olarak tespit edildi. Yapılan literatür çalışmaları sonrasında keçiler üzerinde yapılmış yeterli sayıda çalışma buluanamadığından ruminant embriyoları üzerinden değerlendirme yapıldı ve çalışmalarla uyumlu olarak embriyo canlılık oranlarının embriyonun inkübasyonda kaldığı süre arttıkça buna paralel olarak olumsuz etklendiği görüldü. Diğer birçok literatürde de belirtildiği gibi embriyo canlılık oranları diğer kriyoprotektanlara nazaran etilen glikolde daha yüksek olduğu görüldü. Elde edilen bu sonucun etilen glikolün hücre içine daha iyi nüfuz etmesi ve molekül ağırlığının daha düşük olmasına bağlı olduğu düşünüldü. Etilen glikolle dondurulan embriyoların 72. saatteki canlılık oranları diğer iki kriyoprotektanın 48. saatteki canlılık oranlarından daha yüksek bulundu. DMSO ile dondurulan embriyoların canlılıklarının diğer iki kriyoprtektana göre çok daha düşük olmasının ise molekül ağırlığının diğer kriyoprotektanlardan yüksek olması nedeniyle daha az koruyucu etkinliğe sahip olmasına bağlı olabileceği düşünüldü.

Etilen glikol ve gliserol kullanılarak yavaş metotla dondurulan embriyoların çözdürme sonrası gelişmelerinin değerlendirildiği çalışmada etilen glikolle dondurulup çözdürülen morulaların gelişimi % 23 iken blastosistlerin gelişiminin % 45 olduğu, gliserol kullanılan embriyolarda ise morulaların % 0, blastosistlerin ise % 35 oranında yaşadığı bildirilmiştir (Gal ve ark 1993). Martinez ve Matkoviç (1998) çalışmalarında etilen glikol ve gliserolle yavaş metotla dondurulan koyun embriyolarının 72. saat inkübasyon sonrasında embriyoların gelişim oranlarını morula aşamasında sırasıyla % 80; %60, blastosist aşamasında ise % 71,4; % 80 olarak, hatched olma oranlarını ise morulalarda % 52; % 40, blastosistlerde ise % 53,5; % 56 olarak bildirmişlerdir.

Koyun embriyoları gliserolle yavaş dondurma sonrasında 96. saate kadar inkübasyona bırakılmış ve expanded blastosiste ulaşma oranları morulalarda % 31 iken blastosistlerde % 67 olarak tespit edilmiştir (de Paz ve ark 1994). Keçi embriyolarının etilen glikol kullanılarak yavaş metotla ve vitrifikasyonla dondurulmasının ardından transferi sonucunda blastosistlerin yaşama oranları % 42

ve % 70 iken hatched blastosistlerin ki ise % 19 ve % 13 olarak tespit edilmiştir (Al Yacoub ve ark 2010). Başka bir çalışmada ise etilen glikol kullanılan yavaş dondurulan keçi embriyolarının gliserolle vitrifikasyonla dondurulan embriyolarla karşılaştırıldığında transfer sonrasında embriyo canlılıkları morulalarda sırasıyla % 43; % 66,6 ve blastisistlerde ise % 50; % 77,4 olarak bildirilmiştir (Martemucci ve D'Alessandro 2013).

İn vivo olarak üretilen farklı gelişim dönemlerindeki koyun embriyolarının etilen glikol kullanılarak dondurulup çözdürülmesi sonrasında canlılık oranları 2-4 hücrelilerde % 17,1, 5-8 hücrelilerde % 31,4, 9-12 hücrelilerde % 21,1, erken morulalarda % 40,5, geç morulalarda % 46,3 ve blastosistlerda % 87,3 olarak bildirilmiştir (Garcia-Garcia ve ark 2006). Etilen glikol kullanılarak dondurulan erken dönem koyun embriyolarının 48 saat inkübasyonu sonucunda canlılık oranları 2-4 hücrelilerde % 56, 5-8 hücrelilerde % 71 ve 9-12 hücrelilerde ise % 71,7 olarak tespit edilmiştir (Garcia-Garcia ve ark 2005).

Gliserol kullanılarak dondurulup çözdürülüp 12 saat kültüre edilen sığır embriyoları gelişim aşamaları değerlendirildiğinde erken blastosist, blastosist ve expanded blastosist canlılık oranları sırasıyla % 52,1; % 48,8 ve % 71,2 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada embriyo kalitelerinin yaşama oranlarına etkisi değerlendirildiğinde grade 1, grade 2 ve grade 3'ün canlılık oranlarının sırasıyla %78,8; % 60,9; % 12,5 olduğu bildirilmiştir (Han ve ark 2000). Gliserol kullanılarak dondurulan sığır embriyolarında canlılık oranları grade 1 embriyoların % 80, grade 2'lerin % 50 ve grade 3'lerin ise % 25 olduğu tespit edilmiştir (Van Wagtendonk- De Leeuw ve ark 1995).

Dondurulup çözdürülen embriyoların gelişim aşamalarına göre değerlendirilmesinde gruplar arasında morulaların canlılık oranlarında istatistiki fark çıkmazken blastosistlerin canlılık oranlarında etilen glikol ve DMSO arasında 24 ve 72. saatlerde istatistiki fark olduğu belirlendi ($P<0,05$). Grup içerisinde blastosistlerin 24, 48 ve 72. saatlerde yaşama oranlarında istatistiki fark belirlenmezken, morulaların yaşama oranlarında her üç grupta da 24-72. saatler arasında istatistiki olarak fark olduğu belirlendi ($P<0,05$) (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5). Embriyonun gelişim dönemi ve dolayısıyla yaşı ilerledikçe yaşama oranı artmaktadır. Blastosistlerin canlılık oranlarında her üç gruptada saatler arasında

önemli bir değişim yaşanmamış olması ve morulaların 72. saate ulaşma oranının her üç gruptada düşmesi diğer literatürlerle uyumlu olduğunu göstermektedir. Gruplar arası değerlendirmede ise etilen glikolle dondurulan embriyoların 24 ve 72. saatler DMSO ile dondurulan embriyolardan daha yüksek canlılık göstermelerinin etilen glikolün hücrenin tüm membranlarını koruması ve DMSO'dan daha düşük molekül ağırlığına sahip olması nedeniyle olduğu düşünülmüştür.

Embriyoların kaliteleri göz önüne alındığında gruplar arasında istatistiki fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Ancak bütün gruplarda oransal olarak Grade I embriyoların canlılıklarının Grade 2'lerden daha iyi olduğu (Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7) diğer çalışmalarla benzer sonuçlar elde edildiği görüldü. Etilen glikol kullanılarak dondurulan Grade 1 embriyoların % 63,64'ünün 72. saate ulaştığı belirlendi. Bunun yanında etilen glikol grubundaki Grade 2 embriyoların 72. saate ulaşma oranının DMSO grubundaki Grade 1 embriyolardan daha yüksek olduğu tespit edildi. Grup içerisinde değerlendirme yapıldığında Grade 2 embriyoların 24, 48 ve 72. saatlerde canlılık oranlarında istatistiki açıdan fark belirlenmezken, Grade 1 embriyoların gliserol ve DMSO gruplarında 24-72. saatlerde istatistiki açıdan önemli olduğu tespit edildi. Embriyo kalitesi dondurma başarısını ve çözdürme sonrası canlılığı etkileyen önemli bir faktördür. Dejenerasyon oranlarının ölü ve dejenere hücre oranlarıyla paralel olması nedeniyle embriyolardaki canlı hücre miktarının az olması çözdürme sonrasında yaşama oranlarını düşürmektedir. Etilen glikolün embriyo kalitesine üzerine etkisi önemsiz olarak bulunurken; gliserol ve DMSO'nun Grade 1 embriyoların canlılıklarında 72. saatlerde önemli düşüşün yaşandığı ve etilen glikolden daha az koruyucu etkinliğe sahip olduğu düşünüldü.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sunulan çalışmada Türkiye'de ve dünyada yüksek süt verimi nedeniyle yetiştirilen ve her geçen gün yetiştiricilerin ilgisini daha çok çeken Saanen keçilerinin popülasyonunu hızla artırılabilmesi ve daha ileriki dönemlerde kullanılmak üzere embriyolarının saklanabilmesi için kullanılan yavaş embriyo dondurma yönteminin ve farklı bazı kriyoprotektanların embriyo canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Yapılan uygulamalar sonucunda yavaş dondurma yöntemi ile her üç kriyoprotektanında embriyo canlılığı üzerinde farklı oranlarda koruyucu etkisinin olduğu göürldü. Ancak etilen glikol kullanılan embriyolarda inkübasyon zamanları, embriyo gelişme dönemi ve embriyonun kalitesi yönünden diğer kriyoprotektanlara nazaran 72. saatteki canlılık oranları dikkate alındığında hem istatistiki hemde oransal olarak daha iyi sonuçlar alındığı belirlendi.

Sonuç olarak embriyoların canlılıklarını etkileyen birçok faktör olması göz önüne alındığında in vivo olarak üretilen kaliteli Saanen keçisi embriyolarının yavaş yöntemle dondurulması sırasında kriyoprotektan olarak en iyi sonucun etilen glikolle alındığı ve 72. saate ulaşma da etilen glikolün özellikle DMSO olmak üzere her iki kriyoprotaktandan daha başarılı olduğu görüldü. Elde edilen bilgiler ışığında etilen glikolün keçi embriyolarının yavaş yöntemle dondurulmasında başarıyla kullanılabileceği kanaati oluştu.

6. ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İn Vivo Olarak Elde Edilen Saanen Keçisi Embriyolarının Farklı Kriyoprotektanlar Kullanılarak Yavaş Yöntemle Dondurulması

Sakine Ülküm ÇİZMECİ

Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2014

Bu çalışmada yavaş embriyo dondurma yöntemi ve bazı kriyoprotektanların dondurulup çözdürülmüş Saanen keçisi embriyolarının canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Projenin hayvan materyalini 15 adet Saanen ırkı dişi keçi ve 3 adet teke oluşturdu. Hayvanlardan yeterli embriyo toplanabilmesi için iki sezon uygulama yapıldı. Keçilere 12 gün süreyle 20 mg Fluorogeston asetat emdirilmiş intravaginal sünger (Chronogest CR, İntervet, Holland) yerleştirildi. Sünger uygulandıktan sonraki 9. gün itibariyle 3 gün 12 saat arayla azalan dozlarda FSH (2,5; 1,5; 1 cc) enjekte edildi. Sünger 12. gün çıkarıldı ve 24 saat sonra doğal aşım yaptırıldı. İlk aşımdan sonraki 7. gün laparoskopik uterus yıkaması yapılarak embriyolar elde edildi. Toplanan embriyolar değerlendirilerek kaliteli olanlar etilen glikol, gliserol ve DMSO kullanılarak yavaş dondurma yöntemiyle dondurulduu. Bu amaçla. Her kriyoprotektan grubu için ortalama 30 embriyo dondurulduu. Embriyolar sıvı azot içerisinde çödürülüp değerlendirilene kadar muhafaza edildi. Embriyolar 37 º C'de su banyosunda çözdürüldü.

Çözdürme sonrasında embriyolar 38,5 ºC'de % 5 CO_2'de inkübasyona bırakıldı. Embriyo gelişimleri 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirilidi. Elde edilen verilerin istatistiki analizi % t testi kullanılarak yapıldı. Birinci ve ikinci sezonda bütün hayvanlarda östrus görüldü. Süperovulasyon cevapları (4≥ Cl) sırasıyla %

93,3 ve % 84,6, embriyo toplama oranı ise % 61,4, % 72,3 olarak belirlendi. Hayvanların % 26,7 ve % 15,4'inde erken luteal regresyon oranı tespit edildi. Transfer edilebilir embriyo oranı birinci sezonda % 58, ikinci sezonda ise % 61,6 olarak belirlendi. Çözdürme sonrasında canlılık oranlarında, bütün gruplarda saatlerin önemli derecede etkili olduğu ve 72. saate ulaşmada isatistiki farkın oluştuğu görüldü ($p<0,05$). Gruplar arasında etilen glikolle dondurulan blastosislerin DMSO ile dondurulanlardan daha iyi olduğu ($p<0,05$) ancak grup içerisinde değerlendirildiğinde morulaların canlılıklarında 24-72. saatler arasında önemli farklılıkların ($p<0,05$) olduğu görüldü. Saanen keçisi embriyolarının yavaş yöntemle dondurulması sırasında kriyoprotektan olarak en iyi sonucun etilen glikolle alındığı ve 72. saate ulaşma da etilen glikolün özellikle DMSO olmak üzere her iki kriyoprotaktandan daha başarılı olduğu görüldü. Elde edilen bilgiler ışığında etilen glikolün keçi embriyolarının yavaş yöntemle dondurulmasında başarıyla kullanılabileceği kanaati oluştu.

Anahtar Sözcükler: DMSO; Etilen Glikol; Gliserol; Keçi; Yavaş Dondurma.

7. SUMMARY

Freezing of In Vivo Derived Saanen Goat Embryos with Use of Different Cryoprotectants during Slow Freezing

In this study, aim was to determine effects of slow embryo freezing method and some cryoprotectants on the viability of the Saanen goats embryos

Animal material of this project was 15 Saanen goats and 3 bucks. In order to collect enough embryos, animals were used in two consecutive breeding seasons. Fifteen goats were synchronized with intravaginal sponges containing 20 mg of Fluorogeston acetate (Chronogest CR, İntervet, Holland) for 12 days. Decreasing doses of FSH (2,5; 1,5; 1 cc) were injected at 12 hour intervals on the last 3 days of sponge treatment. Twentfour hours after sponge removal, goats were allowed to mate. Laparoscopic uterine washing was performed and embryos were collected on the seventh day after the first mating. Collected embryos were assessed and embryos with good quality were frozen with a slow freezing method using different cryoprotectants. For this purpose ethylene glycol, glycerol and DMSO were used. An average of 30 embryos were frozen with each cryoprotectant. Embryos were stored in liquid nitrogen and then were thawed in 37 ° C water bath.

After thawing, the embryos were incubated at 38.5 º C and 5% CO_2. Viability controls at 24, 48 and 72 hours were performed. Statistical analysis of data was performed using the % t test. Estrus was observed in all animals both in the first and the second season. Superovulation response (4≥ Cl) was found to be 93.3% and 84.6% for two seasons, respectively. Recovery rate is 61.8% and 72.3%. Early luteal regression was detected in 26.7% and 15.4% of animals respectively in two seasons. The rate of transferable embryos was 58% and 61.6%, respectively. In the viability rates after thawing, hours was significantly effective and in achieving to 72 hours there was statistical difference in all groups ($p < 0.05$). Betweeen groups, survival rates of blastacytes with frozen ethylene glycol was better than that with frozen DMSO ($p < 0.05$). However, within the groups the viability of the morulas significant differences were observed between 24-72 hours ($p < 0.05$). During slow freezing method, the best results were obtained by ethylene glycol. In the achieving to 72 hours, ethylene glycol was found to be more successful than other cryoprotectants. Consequently, ethylene glycol can be used successfully during slow freezing method for goat embryos.

Key Words: DMSO; Ethylene glycol; goat; glycerol; slow freezing.

8. KAYNAKLAR

1. Abeica JA, Forcada F, Gonzales-Bulnes. Hormonal control of reproduction in small ruminants. Anim Reprod Sci. 2012; 130: 173-179.
2. Ağaoğlu AR, KarakaşK, Kaymaz M. In vivo embryo production in some netive goats breeds in Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2014; 38: 1-7.
3. Akyol N, Kızıl SH, Tuncer PB. İneklerde süperovülasyon ve embriyo transferi çalışmaları. Lalahan Hay Arast Enst Derg. 2004; 44 (1): 1 – 5.
4. Akyol N. Sığır embriyo transferinde hormon kullanımı. Lalahan Hay Arast Enst Derg. 2001; 41 (1): 95-104.
5. Al Yacoub AN, Gauly M, Holtz W. Open pulled straw vitrification of goat embryos at various stages of development. Theriogenology. 2010; 73: 1018-1023.
6. Alaçam E. Reprodüktif hormonların klinikte uygulanmaları. In: Alaçam E, editör. Evcil Hayvanlarda reprodüksiyon, suni tohumlama, doğum ve infertilite. Birinci baskı, Konya, Dizgievi, 1994; 37-49.
7. Alaçam E. Hormonların klinik kullanımı. In: Alaçam E, editör. Doğum ve ınfertilite. Üçüncü baskı, Ankara, Medisan Yayınevi, 2001a; 41-54.
8. Alaçam E. Üremenin kontrolü. In: Alaçam E, editör. Doğum ve infertilite. Üçüncü baskı, Ankara, Medisan, 2001b;71-80.
9. Alferez MJM, Barrionueva M, Lopez Aliaga I, Sampelaya MR, Lisbona F Robles JC ve Campos MS. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. J Dairy Res. 2001; 68: 451-461.
10. Amarantidis I, Karagiannidis A, Saratsis P. Brikas P. Efficiency of methods used for estrous synchronization in indigenous Greek goats. Anim Reprod Sci. 2004; 52: 247-252.
11. Amiridis GS, Cseh S. Assisted reproductive technologies in the management of small ruminants. Anim Reprod Sci. 2012; 130: 152-161.
12. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. Theriogeneology. 2014; 81: 96-102.
13. Armstrong DT, Pfitzner AP, Warnes GM, Ralph MM, Seamark RF. Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. J Reprod Fert. 1983; 67: 395-401.
14. Ayres SL, Gavin W, Memili E, Behboodi E. Superovulation in goats during the second follicular wave, with or without exegenous progesterone. J Small Rumin Res. 2011;
15. Baldassarre H, Karatzas CN. Advanced Assisted Reproduction Technologies (ART) in Goats. Anim Reprod Sci. 2004; 82-83: 255-266.
16. Baştan A, Küplülü Ş. Akkaraman ırkı koyunlarda melatonin ve progestagen uygulamalarının reprodüktif performans üzerine etkileri. Ankara Üniv Vet Fak Der. 1995; 42: 263-270.
17. Bowen R.A. Embryo transfer in domestic animals. In: Pineda MH, editör. Veterinary endocrinology and reproduction. Beşinci baskı, USA, Blackwell Publishing Company, 2003,547-571.
18. Bozkurt Y. Alabalık spermasının kriyobiyolojik muhafazasının mekanizması. Derleme Dergisi. 2011; 4(1): 19-24.
19. Canooğlu E, Sarıbay MK. Üreme kanalının morfolojisi ve üreme fizyolojisi. In: Semacan A, Kaymaz M. Fındık M, Rişvanlı A, Köker A, editors. Çiftlik hayvalarında doğum ve jinekoloji, Birinci baskı, Malatya, Medipress, 2012, 521-544.
20. Casao A, Cebrian I, Asumpçao ME, Perez-Pe R, Abecia JA, Forcada F, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. Seosonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. Reprod Biol Endocrinol. 2010; 8: 59-67.
21. Ceyhan A, Karadağ O. Marmara hayvancılık araştırma enstitüsünde yetiştirilen saanen keçilerin bazı tanımlayıcı özellikleri. Tarım Bilimleri Dergisi. 2009; 15(2): 196-203.
22. Chang Z, Fan X, Lou M, Wu Z, Tan J. Factors affecting superovulation and embryo transfer in boer goats. J Anim Sci. 2006;16(3): 341-346.
23. Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo YA, Guerin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim Reprod Sci. 1992; 30: 157-184.
24. Christie W. Embryo transfer in large domestic animals. In: Noakes ED, Parkinson TJ, England Gary CW, ve Arthur GH, editors. Arthur's veterinary reproduction and obstetrics, Sekizinci baskı, China, Harcourt publishers limited, 2001, 819-835.
25. Cocero MJ, Procureur E, De La Fuente J, Chupin D. Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. Theriogenology. 1988; 29 (1): 238.

26. Cognie Y. State of the Art in Sheep-Goat Embryo Transfer. Theriogenology 1999; 51: 105-116.
27. Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. Theriogenology. 2003; 59: 171-188.
28. Coşkun H, Öndül E. Keçi sütü ve insan beslenmesindeki önemi. Gıda. 2004; 29(6): 411-418.
29. Çolpan İ. Koyun besleme. In: Ergün A, Tuncer ŞD, Çolpan İ, Yalçın S, Yıldız G, Küçükersan MK, Küçükersan S, Şehu A, Editors. Hayvan besleme ve beslenme hastalıkları, üçüncü baskı, Ankara, Pozitif baskı, 2006, 313-347.
30. Çevik M, Yurdaydın N. Evcil hayvanlarda fotoperiyodizm ve dölverimine etkisi. Lalahan Hay Arast Enst Derg. 1998; 38 (1): 69-78.
31. Çınar M, Serbester U, Ceyhan A. Melatonin biyosentezi ve süt keçisi yetiştiriciliğinde eksojen kullanımının üreme performansı ile süt kalitesi üzerine etkisi. TÜBAV Bilim Dergisi. 2011; 4(2): 92-96.
32. Çoyan K. Reprodüktif fizyoloji. In Çoyan K, editör. Evcil hayvanlarda dölerme ve suni tohumlama, Birinci baskı, Konya, Selçuk Üniversitesi Vetriner Fakültesi yayın ünitesi. 2002, 58-66.
33. de Paz P, Sanchez AJ, Fernandez JG, Carbajo M, Dominguez JC, Chamorro CA, Anel L. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. Theriogenology. 1994; 42: 327-338.
34. de Sousa FC, Melo CHS, Filho AT, Avelar SRG, Moura A, Martins JAM, Freitas VJ, Teixeira DIA. Ovarian Follicular Response to different hormonal stimulation treatments in caninde goats. Anim Reprod Sci. 2011; 125(1-4): 88-93.
35. Delgadillo JA. Control of sexual activity in goats using photoperiod and male effect. 2004; [cited 02.04.2014]. http//www.eaap.org.previousannual meetings
36. Delgadillo JA. Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PAR, Martin GB. The 'male effect' in sheep and goats-revisiting the dogmas. Behav Brain Res. 2009; 200: 304-314.
37. Dinnyes A, Nedambale TL. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. Reprod Fertil Devil. 2009; 21: 45-46.
38. Dochi O, Imai K, Goto Y, Shimohira I. Effect of one step dilution procedures on the viability of bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. J Rakuno Gakuen Univ. 2000; 25(1): 53-58.
39. Doğan I, Nur Z, Günay U, Soylu MK, Sönmez C. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in saanen does during the transition period. S Afr J Anim Sci. 2004; 34(1): 18-22.
40. du Preez ER, Donkin EF, Boyazoğlu PA, Rautenbach GH, Barry DM, Schoeman SH. Out-of season breeding of milk goats- the effect of light treatment melatonin and breed. S Afr Vet Ver. 2001; 72(4): 228–231
41. Fatet A, Pellicer-Rubio MT, Leboeuf B. Reproductive cycle of goats. Anim Reprod Sci. 2011; 124: 211-219.
42. Fierro S, Gil J, Vinoles C, Olivera-Muzante. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. Theriogenology. 2013; 79(3): 399-408
43. Forcada F, Amer-Meziane MA, Abeica JA, Maurel MC, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco, Asenjo B, Vazquez MI, Casao A. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. Theriogeneology. 2011; 75: 769-776.
44. Frank GC, Coley SL, Betterbed B, Page RD. The effects of cryoprotective agents, dilution rates, freezing rates, and freezing units on the survival of bovine embryos. Theriogenology. 1985; 23 (1): 194.
45. Gal FL, Baril G, Vallet JC, Leboeuf B. In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. Theriogenology. 1993; 40: 771-777.
46. Garcia-Garcia RM, Gonzales-Bulnes A, Dominquez V, Veiga-Lopez A, Cocero MJ. Culture of early stage ovine embryos to blastocyst enhances survival rate after cryopreservation. Theriogenology. 2005; 63: 2233-2242.
47. Garcia-Garcia RM, Gonzales-Bulnes A, Dominquez V, Veiga-Lopez A, Cocero MJ. Survival of frozen thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. Cryobiology. 2006; 52: 108-113.
48. Gordon I. Reproduction in sheep and goats. Birinci baskı, USA, CABI publishing, 1997, 374-439
49. Gordon I. Laboratory production of catle embryos. İkinci baskı, UK, CABI publishing, 2003, 42-78.
50. Gordon I. Reproductive technologies in farm animal. Birinci baskı, UK, CABI publishing, 2004, 82-107.

51. Greyling JPC. Reproduction triats in the boer goat doe. J Small Rumin Res. 2000; 36: 171-177.
52. Greyling JPC, ven der Nest M, Schwalbach LMJ, Muller T. Superovulation and embryo transfer in South African Boer and Indigenous feral goats. Small Rumin Res. 2002; 43: 54-51.
53. Grizelj J, Vince S, Tomaskoviç A, Baril G, Makek Z, Getz I, Duricic D, Pranoviç N, Samardzija M. Superovulatıon response and embryo recovery of donor does Boer race ın embryo transfer procedures. 14 Congreso Internacional de la Federacion Mediterranea de Sanidad y Produccion de Rumiantes, 271281, 2006.
54. Güler M. Gebelik fizyolojisi. In: Alaçam E, editör. Doğum ve infertilite, Ankara, Medisan, 2001, 99-108.
55. Güngör Ö, Özyurtlu N, Pancarcı ŞM, Kaya M, Zonturlu AK, Oral H, Çetin Y, Polat B. Estrous synchronization with used CIDR-G devices in ewes during non-breeding season. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2009; 15(5): 779-783.
56. Han YM, Kim SJ, Park JS, Park IY, Kang YK, Lee CS, Koo DB, Lee TH, Yu DY, Kim YH, Lee KJ, Lee KK. Blastocyts viability and generation of transgenic cattle following freezing of in vitro produced, DNA-injected embryos. Anim Reprod Sci. 2000; 63: 53-63.
57. Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Stokes JE. Survival of IVF derived bovine embryosfrozen in glycerol or ethylene glycol. Theriogenology. 1997; 48: 563-579.
58. Holtz W. Recent developments in assisted reproduction in goats. J Small Rumin Res. 2005; 60: 95-110.
59. Hu J, Boa J, Ma X, Li W, Lei A, Yang C, Goa Z, Wang H. FSH is Superior to eCG for Promoting Ovarian Response in Chinese Bamei Gilts. Anim Reprod Sci. 2010; 122: 313-316.
60. International Embryo Transfer Society (IETS). http://www.iets.org/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true. [cited 03.04.2011]
61. Ishwar AK, Memon MA. Embryo transfer in sheep and goats: a review. J Small Rumin Res. 1996; 19: 35-43.
62. İnal Ş. Biyometri. Üçüncü baskı, Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, 2005; 37-38.
63. Jackson DJ, Fletcher CM, Keisler DH, Whitley NC. Effect of melengestrol acetate (MGA) treatment or temporary kid removal on reproductive efficiency in meat goats. Small Rumin Res. 2006; 66 (1-3): 253-257.
64. Kalkan C, Horoz H. Pubertas ve Seksüel Sikluslar. In: Alaçam E, editör. Doğum ve Infertilite. Üçünücü baskı, Ankara, Medisan, 2001, 23-40.
65. Kanagawa H, Shimohira I ve Saitoh N. Manual of Bovine Embryo Transfer. İkinci baskı, JICA-JAPAN, National Livestock Breeding Center MAFF, 1995, 78-87.
66. Kaymakçı M, Engindeniz S. Türkiye'de keçi yetiştiriciliği: sorunlar ve çözümler. Ulusal keçicilik kongresi bildiriler kitabı: 1-26, 2010, Çanakkale.
67. Kaymaz M. Yardımcı üreme taknikleri. In. Semacan A, Kaymaz M. Fındık M, Rişvanlı A, Köker A, editors. Çiftlik hayvalarında doğum ve jinekoloji, Birinci baskı, Malatya, Medipress, 2012, 695-811.
68. Kesenkaş H, Dinkçi N, Kınık Ö, Gönç S, Ender G. Saanen Keçisi Sütünün Genel Özellikleri. Akademik Gıda. 2010; 8(2): 45-48.
69. Kılboz Eİ, Karaca F. Üreme mevsimi dışında genç keçilerde flugeston asetat vaginal sünger ve norgestomet kulak implantı uygulamalarıyla östruslerin uyarılması. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi. 2010; 21(1): 1-6.
70. Lehloenya KC, Greyling JPC, Grobler S. Effect of seoson on the superovulatory response in Boer goat does. J Small Rumin Res. 2008; 78: 74-79.
71. Lehloenya KC, Greyling JPC. Effect of road of superovulatory gonadotrophin administration on the embryo recovery rate of Boer goat does. J Small Rumin Res. 2009; 87: 39-44.
72. Lehloenya KC, Greyling JPC. The ovarian response and embryo recovery rate in Boer goat does followin different superovulation protocols, during the breeding season. J Small Rumin Res. 2010a; 88: 38-43.
73. Lehloenya KC, Greyling JPC. Embryo transfer using cryopreserved boer goats blastocyts. S Afr J Anim Sci. 2010b; 5: 446-450.
74. Litopolou-Tzanetaki E. Goat milk cheeses; In: editors, Y. H. Hui YH, ,E. Özgül Evranuz EÖ. Handbook of animal-based fermented food and beverage, İkinci baskı, Boca Raton, CRC Press Taylor and Francis Group, 2012, 285-304.
75. Liu L. Development of novel cryopreservation method for mammalian oocytes. Szent Istvan university. 2009. www.szie.hu/file/tti/archivum/Jun_Liu_ert.pdf [cited 10.05.2011]

76. Macun HC, Kaymaz M. Sığır oositlerinin in vitro maturasyonuna follikül uyarıcı hormon ve insan menopozal gonadotropininin etkisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2006; 53: 25-29.
77. Mapletoft RJ, Kristina BS, Gregg PA. Recent advances in the superovulation in cattle. Reprod Nutr Dev. 2002; 42: 601–611.
78. Mapletoft RJ, Stookey Jm, Bo GA. General sanitary procedures and welfare considerations associated with in vivo production of embryos. In: Stringfellow DA and Givens MD, editors. Manual of the ınternational embryo transfer society (International Embryo Transfer Society), Dördüncü baskı, United States of America IETS publishing, 2010, 50-56.
79. Maracek I, Krajnicakova M, Kostecky M, Greserova G, Valocky I. Tertiary follicular growth wave Dynamics after oestrus synchronization and superovulation in ewes and goats. Acta Vet Brno. 2002; 71: 481-486.
80. Martemucci G, D'Alessandro AG. Efficiancy of FSH/LH treatments for in vivo production of embryos and their cryopreservation by different methods in goats. Small Rumin Res. 2013; 114: 264-271.
81. Martin GB, Milton JTB, Davidson RH, Banchero Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D. Natural methods fof increasing reproductive efficiency in small ruminants. Anim Reprod Sci. 2004; 82-83: 231-246.
82. Martinez AG, Matkovic M, Pessi HD, Baldassare H. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. Theriogenology. 1996; 45 (1): 161.
83. Martinez AG, Matkoviç M. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vtirification. Theriogenology. 1998; 49: 1039-1049.
84. Matsukawa T, Oto, H, Suzuki T. Comparison of viability of frozen and vitrified in vito, in vitro bovine embryo using one step straw method. Dummerstrof. 2001; 44: 172.
85. Mayorga I, Maraa L, Sannaa D, Stellettab C, Morganteb M, Casua S, Dattena M. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. Theriogenology. 2011; 75: 1661–1668.
86. McGinnis LK, Duplantis SC, Waller SL, Youngs CR. The use of ethylene glycol for cryopreservation of sheep embryos. Theriogenology. 1989; 31 (1): 226.
87. McOnie BW. Embryo transfers continue top genetic lines. Dairy Goat Journals. 2004; 82-1. http://www.dairygoatjournal.com/82-1/brian_mconie/ [cited 15.10.1012].
88. Menchaca A, Vilarino M, Crispo M, Pinczak A, Rubianes E. Day 0 Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves Ovarian response and embryo yield in goats. Theriogenology. 2007; 68: 1111-1117.
89. Mori, J. Textbook on Advances Farm Animal Embryo Transfer Hormone Research. JICA, Japan. 1999.
90. Noakes ED. Fertility and obstetrics. In: Suttor JB, Swift ST, editors, İkinci baskı, USA, Blackwell science, 1997, 100-117.
91. Noakes ED. Normal oestrus cycles. In: Noakes ED, Parkinson TJ, England GCW, FArthur GH, editors. Arthur's veterinary reproduction and obstetrics, Sekizinci baskı, China, Harcourt publishers limited, 2001, 3-52.
92. Palasz AT, Mapletoft RJ. Crtopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. Biotech Adv. 1996; 14 (2): 127-149.
93. Paramio M.T. In vivo and In vitro embryo production in goats. Small Rumin Res. 2010; 89(2-3): 144-148.
94. Perera GDRK, Pushpakumara PGA, de Silva LNA, Perera BMAO, Alexander B. Establishment of Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET) Technology for Goats in Sri Lanka. FAO/IAEA International Symposium on Sustainable Improvement of Animal Production and Health, Vienna, Austria, 2009, 154-156.
95. Petroman I, Pacala N, Petroman C, Bencsik I, Orboi MD, Dronca D, Baneş A. Utilization of gestagen hormones and pituarity FSH extracts in inducing the superovulation et embryo donor cowsJ. Food Agri Environ. 2009; 7 (2): 193-195.
96. Prentice JR, Anzar M. Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. Veterinary Medicine International. 2011; 1-11. http://dx.doi.org/10.4061/2011/146405 [Cited 13.03.2014].
97. Rahman ANMA, Abdullah RB, Khadijah WEW. A Review of Reproductive Biotechnologies and Their Application in Goat. Biotechnology. 2008; 7(2): 371-384.
98. Reynolds M. Saanens The Great White goats. Dairy goat journals. 2009; 87(1). http://www.dairygoatjournal.com/87-1/saanens_the_great_white_goats/ [cited 03.04.2014]

99. Robertson I, Nelson RE. Certification and identification of embryos. In: Stringfellow DA and Givens MD, editors. Manual of the ınternational embryo transfer society (International Embryo Transfer Society), Dördüncü baskı, United States of America IETS publishing, 2010, 87-105.
100. Rosnina Y, Jainudeen MR, Nihayah M. Superovulation and egg recovery in goat in the tropics. Vet Rec. 1992; 130: 97-99.
101. Sarıbay MK, Doğruer G, Ergün Y, Karaca F, Ateş CT. Üreme sezonu dışında laktasyondaki kıl keçilerinde flourogestone acetat içeren vaginal süngerlerle östruslerin uyarılması; GnRH ve hCG uygulamalarının döl verimi üzerine etkisi. Vet Bil Derg. 2008; 24 (1): 21-27.
102. Sağırkaya H, Bağış H. Memeli Embriyolarının Kriyoprezarvasyonu. Uludağ Üniv J Fac Vet Med 2003; 22(1-2-3): 127-135.
103. Sağırkaya H, Nak Y, Nak D, Nur Z, Üstüner B, Tuna B, Şimşek G, Ertürk M. Kıvırcık Irkı Koyunlarda Sezon İçi ve Dışı Dönemde Süperovulasyon Uygulamaları. V. Ulusal reprodüksiyon ve suni tohumlama kongresi kitabı, 2009, Elazığ.
104. Sağırkaya H. Sığırlarda embriyo transfer uygulaması ve Türkiye açısından önemi. Uludağ Üniv J Fac Vet Med. 2009; 28(2): 11-19.
105. Saharrea A, Valencia J, Balcazar A, Mecia O, Cerbon JL, Caballero V, Zarco L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: Effect of hCG or GnRH admınıstration during the earlu luteal phase. Theriogenology. 1998; 50: 1039-1052.
106. Seidel GE. Training manual for embryo transfer in cattle. Food and agriculture organization of the united nations (FAO), Rome, 1991;78-79. [Cited 11.03.2014]. http://www.fao.org/docrep/004/t0117e/t0117e00.htm
107. Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition, Birinci baskı, Moskova, Current conception Inc, 1997, 101-115.
108. Shelton JN, Szell A. Survivor of sheep demi-embros in vivo and iv vitro. Theriogeneology.1988; 30 (5): 855-863.
109. Smith Cl, Peter AT, Appell KM. Effects of stepwise cryodilution prior to freezing and stepwise post-thaw rehydration on viability of ovine embryos. Theriogenology. 1994; 41: 1267-1271.
110. Smith GD, Silva CA, Silva E. Developmental consequnces of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. Reproductive BioMedicine Online. 2004; 9(2): 171-178. www.rbmonline.com/Article/1240. [cited 05.05.2004].
111. Son DS, Choe CY, Choi SH, Cho SR, Kim HJ, Han MH, Ryu IS, Suh GS, Kim UH, Kim IH. Effect of estradiol benzoate or GnRH treatment prior to superstimulation in CIDR-treated, Korean native cows (Bos taurus). Anim Reprod Sci. 2007;100: 14–21.
112. Stringfellow DA. Recommendations for the sanitary handling of in vivo-derived embryos. In: Stringfellow DA and Givens MD, editors. Manual of the ınternational embryo transfer society (International Embryo Transfer Society), Dördüncü baskı, United States of America IETS publishing, 2010, 65-68.
113. Şimşek ÜG ve Bayraktar M. Kıl keçisi ve Saanen X Kıl keçisi (F1) melezlerine ait büyüme ve yaşama gücü özelliklerinin araştırılması. Fırat Ü Sağ Bil Derg. 2006; 20: 229-238.
114. Takagi M, Otoi T, Suzuki T. Survival rate of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to post-thaw exposure time in two cryoprotektants. Cryobiology. 1993; 30: 466-469.
115. Taşdemir U, Ağaoğlu AR, Kaymaz M, Karakaş K. Ovarian response and embryo yield of Angora and Kilis goats given the day 0 protocol for superovulation in the non-breeding season. Trop Anim Health Prod. 2011; 43: 1035-1038.
116. Taşdemir U, Satılmış M, Karaşahin T, Kızıl SH, Kaymaz M, Imai K. The effect of single epidural plus intramusculer injection of FSH on superovulatory response in Anatolian Black cow. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2012; 59: 211-216.
117. Teke B, Akdağ F, Arsla S. Halk elinde yetiştirilen saanen keçilerinde bazı dölverimi, büyüme ve davranış özellikleri. İstanbul Üniv Vet Fak Derg. 2011; 37 (1), 1-8.
118. Tekeli T. Embriyo Nakli. In: Alaçam E, editör. Doğum ve İnfertilite, Üçüncü baskı, Ankara, Medisan, 2001, 81-97.
119. Troxel TR, Kesler DJ, Noble RC, Carlin SE. Ovulation and reproductive hormones following streoid pretrealment, calf removal and GnRH in postpartum suckled beef cows. J Anim Sci. 1980; 51: 652-659.
120. Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK). 2013. http://tuikapp.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul. [cited 02.04.2014].

121. Uçar M, Özyurtlu N. Üremenin denetlenmesi. In. Semacan A, Kaymaz M. Fındık M, Rişvanlı A, Köker A, editors. Çiftlik hayvalarında doğum ve jinekoloji, Birinci baskı, Malatya, Medipress, 2012, 549-561.
122. Uslu BA, Gülyüz F. Erken anöstrus döneminde renkli tiftik keçilerinde intravaginal sünger, CIDR-G ve kulak implantı uygulamalarını takiben GnRH enjeksiyonunun fertilite üzerine etkisi. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2009; 15 (3): 385-390.
123. Uysal O. Sığır Embriyolarının Vitrifikasyonu. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi. 2007; 78(4): 45-50.
124. Van Wagtendonk-De Leeuw AM, Den Daas JHG, Kruıp TH, Rall WF. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing rapid cryopreservation methods for bovine embryos. Cryobiology. 1995; 32: 157-167.
125. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. Theriogenology. 2006; 65: 236–244
126. Vivanco HW. Recent Developments in Reproductive Techniques of Sheep and Goats. FAO Corporate Document Repository. 2008. http//www.fao.org/docrep/009/ah221e/AH221E03.htm. [cited 02.04.2011.]
127. Whitley NC, Jackson DJ. An update on estrus synchronization in goats: a minor species. J Anim Sci. 2004; 82: 270-276.
128. Wildeus S. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. J Anim Sci. 2000; 77: 1-14.
129. Willamil PR, Lozano D, Oviedo JM, Ongaratto FL, Bo GA. Developmental rates of in vivo and in vitro produced bovine embryos cryopreserved in ethylene glycol based solutions by slow freezing or solid surface vitrification. Anim Prerod. 2012; 9(2): 86-92.
130. Wright JM. Appendix D. Photographic illustrations of embryo develpomental stage and quality codes. In: Stringfellow DA and Givens MD, editors. Manual of the ınternational embryo transfer society (International Embryo Transfer Society), Dördüncü baskı, United States of America IETS publishing, 2010, 141-144.
131. Wuliji T, Litherland A, Goetsch AL, Sahlu T, Puchala R, Dawson LJ, Gipson T. Evaluation of melatonin and bromocryptine administration in Spanish goats I. effects on the out of season breeding performance in spring, kidding rate and fleece weight of does. J Small Rumin Res. 2003; 49: 31-40.
132. Yellon SM, Foster DL, Longo LD, Suttie JM. Ontogeny of the pineal melatonin rythm and impilcations for reproductive development in domestic ruminants. Anim Reprod Sci. 1992; 30: 91-112.
133. Yılmaz B. Hormonlar ve üreme fizyolojisi, Birinci baskı, Ankara, Feryal matbaacılık, 1999, 59- 61.
134. Yılmaz M, Bardakçıoğlu HE, Taşkın T. Koç etkisinin kullanımı ve koyun yetiştiriciliği açısından önemi. Hayvansal Üretim. 2009; 50(2): 52-59.
135. Youngs CR. Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep and goats. J Vis Exp. 2011; 54: 1-4.

10. ÖZGEÇMİŞ

Sakine Ülküm ÇİZMECİ 09.03.1982 yılında Konya'da dünyada geldi. İlköğretimini Gazi Mustafa Kemal İlkokulunda, orta öğretimini Kayseri 50. Yıl Dedeman Ortaokulunda, lise eğitimini ise Konya Lisesinde tamamladı. Üniversite eğitimini 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde tamamladı. 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı ve aynı yıl doktora eğitimine başladı. 2013 yılında Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'ne Veteriner Hekim olarak atandı ve halen buradaki görevini sürdürmektedir. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı'nda da ikinci doktora eğitimine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.