



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**B-NGF'ÜN KOYUNLARDA OVULASYON
MEKANİZMASI VE SPERMA KALİTESİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Beste ÇİL

**DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ogun UYSAL**

**ANKARA
2021**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**B-NGF'ÜN KOYUNLARDA OVULASYON
MEKANİZMASI VE SPERMA KALİTESİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Beste ÇİL

**DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ogun UYSAL**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
18L0239017 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2021**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “ **β -NGF’ün Koyunlarda Ovulasyon Mekanizması ve Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi**” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Beste ÇİL

Tarih: 09/12/2021

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında
BESTE ÇİL tarafından hazırlanan
“B-NGF’ün Koyunlarda Ovulasyon Mekanizması ve Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi”
adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY ÇOKLUĞU ile KABUL
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09/12/2021

Prof. Dr. Savaş YILDIZ
Kafkas Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. MURAT SELÇUK
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. ONGUN UYSAL
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. ERGUN AKÇAY
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. ALEV GÜROL
BAYRAKTAROĞLU
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. FÜGEN AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Koyunlarda Reprodüksiyon	1
1.1.1. Senkronizasyon	5
1.1.2. Suni Tohumlama	9
1.1.2.1. Sperma Alımı	10
1.1.2.2. Sperma Muayenesi	10
1.1.2.3. Spermanın Kısa Süreli Saklanması	11
1.1.3. Reprodüktif Ultrasonografik Muayene	12
1.2. Sinir Büyüme Faktörü	14
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1. Hayvan Materyali	21
2.2. Çalışma Dizaynı	22
2.3. Senkronizasyon Protokolü	24
2.4. Suni Vajenin Hazırlanması	24
2.5. Spermatolojik Muayeneler	25
2.5.1. Motilite	25
2.5.2. Konsantrasyon	25
2.5.3. Anormal Spermatozoa Oranı	26
2.5.4. Canlı Spermatozoa Oranı	26
2.5.5. pH	27
2.6. Ultrasonografik Görüntüleme ve Analiz	27
2.7. Progesteron Analizi	28
2.8. β -NGF Dozunun Belirlenmesi	29
2.9. İstatistiksel Değerlendirme	30
3. BULGULAR	31
4. TARTIŞMA	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
ÖZET	60
SUMMARY	61
KAYNAKLAR	62
EKLER	80
Ek-1 Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	
ÖZGEÇMİŞ	81

ÖNSÖZ

Koyunların evcilleştirilen ilk memeli türü olduğuna inanılmakta ve çok erken tarihten itibaren insanlarla yakın etkileşimde olduğu bilinmektedir. Artan dünya nüfusu göz önünde bulunduğunda koyunlar hayvansal gıda ve yapağı/iplik bakımından önemli bir potansiyel sunmaktadır. Et verimi koyunların türe özel çeşitli nitelikleri sayesinde arttırılabilmektedir. Bunlardan en önemlisi ise reproduktif orandır. Bu nedenle 85 yılı aşkın bir süredir dünya çapındaki araştırmacılar çeşitli hormonlar kullanarak koyunlarda östrusun ve ovulasyonun kontrolünü sağlamaya çalışmaktadır. Tarım ve hayvancılıkla öne çıkan ülkelerin çoğunda koyunların sezona bağlı üremesi ve yetiştiricilerin talebinden daha az sayıda yavru üretmesi bu türü reproduktif fizyologların ilgi hedefi haline getirmiştir.

Alpaka ve lama seminal plazmasında ovulasyonu indükleyen faktörün keşfedilmesi ve bu faktörün sinir büyüme faktörü olarak adlandırılan protein olduğunun açığa çıkarılmasından sonra, çalışmalar provoke ovulatör türler üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak spontan ovulatör olan sığırlarda ve farelerde gerçekleştirilen çeşitli araştırmalar ovaryan dinamikleri üzerinde de etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Mevsime bağlı poliöstrus gösteren küçük ruminantlarda ise bu proteinin ovulasyon mekanizması üzerine etkisi henüz ortaya konulamamıştır.

Aynı zamanda erkek fertilitesi açısından insan, boğa ve ratlarda yapılan çeşitli çalışmalar bu proteinin ve spesifik yüksek affiniteli ve düşük affiniteli reseptörlerinin erkek reproduktif sistem organları ve sperm hücrelerinde tespiti bu proteinin sperm fonksiyonları üzerinde etkisi olduğunu önermektedir. Koç ve teke seminal plazmasında çeşitli biyokimyasal analizler ile bu proteinin varlığı saptanmış ancak provoke ovulatör türlerin seminal plazmasındaki orana kıyasla oldukça düşük miktarda olduğu belirtilmiştir.

Son yıllarda hayvansal üretimde “daha temiz, daha yeşil ve daha etik” bir yaklaşıma doğru yönelmektedir. Endüstriler için daha temiz yaklaşım ilaç, kimyasal ve ekzojen hormon kullanımını minimum düzeye indirmeleri, daha yeşil yaklaşım çevre üzerindeki etkilerini azaltmaları, daha etik yaklaşım ise hayvan refahını tehlikeye atabilecek uygulamalardan kaçınmaları gerektiğini vurgulamaktadır. Bu amaçla yetiştiriciliği yapılan provoke ve spontan ovulatör türlerde ovulasyonun tetiklenebilmesi için hormon kullanımının minimum düzeye indirilmesine uygun bir metoda ihtiyaç duyulmaktadır. Tez çalışmasında, memeli türlerinin seminal plazmalarında halihazırda mevcut olan proteinlerden biri olan sinir büyüme faktörünün (NGF) senkronizasyon protokolüne adaptasyonu ile ekzojen olarak dişilere uygulanması ve spermaya ilavesi ile hem dişi hem de erkek fertilitésinin artırılması, dolayısıyla suni tohumlama başarısının bu şekilde arttırılarak hayvansal üretimde özellikle de küçükbaş yetiştiriciliğinde iyileştirme sağlanabilmesi amaçlanmaktadır.

Akademik hayatımda ve tez çalışmam süresince sahip olduğu tüm bilgi, beceri ve tecrübesiyle bana yol göstererek her adımda emekleriyle yanımda olan Prof. Dr. Calogero STELLETTA’ya, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’nın tüm akademik ve idari personeline, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü’ne bağlı Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi personeline, doktora çalışma sürecimde tüm özverisiyle yanımda olarak bana destek olan Vet. Hek. Kumsal DÜZGÜN’e, Uzm. Vet. Hek. Ömer Onur PARILDAR’a, Vet. Hek. Derya ŞAHİN’e, Uzm. Vet. Hek. Recep UYAR’a, Dr. Öğr. Üyesi Kemal Tuna OLĞAÇ’a, Uzm. Vet. Hek. Mustafa Oğuzhan ŞAHİN’e, Prof. Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU’na, Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN’e, Dr. Öğr. Üyesi Ufuk KAYA’ya, Vet. Hek. İlktan BAŞTAN’a, Vet. Hek. Hacer Merve TUNA’ya, Hüsne ARSLAN’a ve akademik yaşama katılmamda büyük rol oynayarak bu dönemde de hayatımın her aşamasında olduğu gibi bana destek olan ve ışık tutan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma “B-NGF’ün Koyunlarda Ovulasyon Mekanizması ve Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi” başlıklı A.Ü. BAP tarafından 18L0239017 no’lu proje ile desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
ALH	Başın saptığı uzaklık (µm)
AUC	Eğri altında kalan alan
BCF	Çapraz geçiş frekans ritmi (Hz)
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
°C	Santigrat derece
CIDR	Kontrollü dahili ilaç salım cihazı
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribonükleik asit
FSH	Folikül stimüle edici hormon
FTS	Fizyolojik tuzlu su
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
HCG	İnsan koryonik gonadotropini
IU	Uluslararası birim
i.m.	Kas içi
kDa	Kilodalton
KL	Korpus luteum
LH	Luteinleştirici hormon
LIN	Eğrisel yolların doğrusallığı (%)
Maks V	Maksimum canlılık (%)
Maks	Maksimum
mHz	MegaHertz
Min V	Minimum canlılık (%)
Min	Minimum
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	Metil tiyazolil tetrazolyum
NaCl	Sodyum klorür

ng	Nanogram
NGF	Sinir büyüme faktörü
nm	Nanometre
NT-3	Nörotrofin-3
NT-4	Nörotrofin-4
°K	Kuzey enlemi
p75NTR	p75 nörotrofin reseptörü
PGF ₂ α	Prostaglandin F ₂ α
PMSG	Gebe kısarak serum gonadotropini
PRID	Progesteron salınımlı intravaginal gereç
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SEM	Ortalamanın standart hatası
Std	Standart
STR	Ortalama yolun doğrusallığı (%)
Trk-A	Tropomiyozin reseptör kinaz A
v	Hacim (mm ³)
VAP	Ortalama yol hızı (μ m/sn)
VCL	Eğrisel hız (μ m/sn)
VSL	Doğrusal hız (μ m/sn)
WOB	Kararsızlık (%)
$\bar{X}$ +SS	Ortalama + Standart Sapma
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ l	Mikrolitre
τ	Tau

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Luteal vaskülaritenin ultrasonografik değerlendirmesi	14
Şekil 2.1. Koçlardan suni vajen ile sperma alımı	21
Şekil 2.2. Suni tohumlama uygulaması	23
Şekil 2.3. Spermanın konsantrasyonunun belirlenmesi	26
Şekil 2.4. Foliküllerin ultrasonografi ile görüntülenmesi ve ölçümü	27
Şekil 2.5. Korpus luteumun ultrasonografi ile görüntülenmesi ve luteal vaskülaritenin değerlendirilmesi	28
Şekil 2.6. Progesteron seviyelerinin belirlenmesi	29
Şekil 2.7. Sitotoksosite testi ile β -NGF'ün farklı dozlarında sperma canlılığının belirlenmesi	29

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Koçlara ait ön muayene bulguları	31
Çizelge 3.2. Çeşitli B-NGF konsantrasyonlarının 24. saat sitotoksitesi	32
Çizelge 3.3. I. ve II. çalışma paketi için alınan spermaların çeşitli spermatolojik parametre değerleri	32
Çizelge 3.4. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) için gruplar arası 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi varlığı yönünden değerlendirme	33
Çizelge 3.5. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) için gruplar arası dişilerin ovulasyon yönünden değerlendirilmesi	34
Çizelge 3.6. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) için gruplar arası gebelik yönünden değerlendirme	34
Çizelge 3.7. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) gruplarında dişilerin 5 mm ve üzeri folikül varlığına göre ovulasyon yönünden grup içi değerlendirilmesi	35
Çizelge 3.8. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) gruplarında ovule olan dişilerin gebelik yönünden grup içi değerlendirilmesi	36
Çizelge 3.9. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) için gruplar arası 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi varlığı yönünden değerlendirme	36
Çizelge 3.10. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) için gruplar arası dişilerin ovulasyon yönünden değerlendirilmesi	37
Çizelge 3.11. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) için gruplar arası gebelik yönünden değerlendirme	37
Çizelge 3.12. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) gruplarında dişilerin 5 mm ve üzeri folikül varlığına göre ovulasyon yönünden grup içi değerlendirilmesi	38
Çizelge 3.13. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) gruplarında ovule olan dişilerin gebelik yönünden grup içi değerlendirilmesi	39
Çizelge 3.14. I. ve II. çalışma paketi için tohumlama sonrası 6. ve 10. gün ölçülen serum progesteron seviyeleri	39

Çizelge 4.1. I. ve II. Çalışma paketi gruplarında 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi varlığı yönünden değerlendirme	44
Çizelge 4.2. I. ve II. Çalışma paketi gruplarında ovule olan dişi yönünden değerlendirme	45
Çizelge 4.3. I. ve II. Çalışma paketi gruplarında ovule olan dişilerde gebelik yönünde değerlendirme	47
Çizelge 4.4. I. ve II. Çalışma paketi gruplarında gebelik yönünden değerlendirme	51
Çizelge 4.5. Çeşitli çalışmalarda gebelik tanısı amacı ile kullanılan iki farklı yönteme ait hassasiyet, özgüllük ve doğruluk oranları	56



1. GİRİŞ

1.1. Koyunlarda Reprodüksiyon

Mevsime bağılı üreme gösteren hayvan türlerinde melatonin hormonu gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) üretimini düzenlemektedir. Koyun, keçi ve geyiklerde, sonbahar ve kış aylarında, gece (karanlık) süresinin uzamasıyla beraber, beyin epifizinde melatonin üretimi artmakta ve bu sayede hipotalamustan GnRH hormonu salınımı uyarılarak östrus siklusu ile ilişkili çeşitli hormonların salınımı da başlamaktadır (Senger, 2015). Her ne kadar sezona bağılı üreme genellikle fotoperiyot ile düzenlense de ırk, beslenme, laktasyon durumu, sosyal etkileşimler, doğum mevsimini de içeren birçok faktörün etkileşimi sonucu bu etki değişebilmekte ve bu faktörler üreme sezonunun uzunluğunu ve zamanlamasında rol oynamaktadır (Forcada ve ark., 2006; Gomez-Brunet ve ark., 2012; Pope ve ark., 1989 ve Ungerfedl ve ark., 2004).

Koyunlarda puberte, iyi bakım besleme koşulları altında, 4-12 aylık yaşta ve genellikle ilk üreme sezonu ile birlikte, sonbahar aylarında görülebilmektedir. Koyunlar gebelik nedeniyle kesintiye uğramadığı sürece yaz sonundan ilkbaharın başlangıcına kadar, gün uzunluğunun kısaltmaya başlaması ile art arda 1 ila 20 östrus siklusu gösteren, mevsime bağılı poliöstrik hayvanlardır. Üreme sezonunun uzunluğu ırklara göre yüksek oranda değişim göstermektedir (Gomez-Brunet ve ark., 2012 ve Rosa ve Bryant, 2003). Özellikle orta enlem üzerinde bulunan koyun ırkları (35-40° K) kısa bir anöstrus periyodu göstermektedir (Gomez-Brunet ve ark., 2012). Örneğin Merinos ırkında üreme sezonu 200-260 gün arasında değişirken (Senger, 2015), Akkaraman ırkında ise bu süre 283-295 gün olarak bildirilmiştir (Arsoy ve Sağmanlıgil, 2018 ve Kaymakçı ve ark., 1987). Ovulatör dönem genellikle yaz sonu-sonbahar başında başlamakta, kış sonu-ilkbahar başına kadar devam etmektedir. Anovülatör dönem ise ilkbahar sonundan yazın ortasına kadar sürmekte, yaz ortasından itibaren ise geçiş dönemi ile birlikte ovulatör dönemin başlangıcı görülmektedir (Abecia ve ark., 2011). Irkın yanısıra coğrafi konum da ışık alma süresi

bakımından üreme sezonunu etkileyebilmektedir. Örneğin 2018 yılında gerçekleştirilen güncel bir çalışmada (Arsoy ve Sağmanlıgil, 2018), Ankara ilinde bulunan 2,5 yaşlı Akkaraman ırkı koyunların yıl boyu reproduktif sikluları endokronolojik olarak hormonal verilere dayanılarak araştırılmış ve östrus yılın her ayında gözlemlenmiştir. Progesteron seviyeleriyle belirlenen östrus görülme sıklığı en yüksek Kasım ayında gözlemlenirken bu seviyenin Ağustos-Mart aylarında devam ettiği, en düşük sıklığın ise Haziran ve Temmuz aylarında görüldüğü bildirilmiştir (p <0,01). Koyunların %36,4'ü ise tüm yıl boyunca düzenli östrus siklusu göstermiştir. Bu sayede Akkaraman ırkında, kuzey yarımkürede yetiştirilen diğer ırklara göre üreme sezonunun daha uzun sürdüğü ortaya konulmuştur (Arsoy ve Sağmanlıgil, 2018; Bartlewski ve ark., 1999a; Dell'Aquila ve ark., 1988 ve Gómez-Brunet ve ark., 2008).

Benzer şekilde orta kuzey enleminde bulunan İspanya'da ise birçok yerli ırk uzun bir üreme sezonu göstermekte (Yazdan Kışa) ve genellikle bahar aylarına denk gelen 3-4 aylık kısa bir anöstrus periyodu göstermekte ancak bu periyotta dahi koyunların yaklaşık %30'u kadarı sıklık kalabilmektedir (Valls Ortiz, 1983). Yıl boyunca haftada iki kez periferik kan örneklerinin alınarak progesteron seviyelerinin radyoimmünoanaliz yöntemiyle belirlenmesi sonucu, üreme sezonunun uzunluğu çeşitli yerel ırklarda ortaya konulmuş ve 40° Kuzey enleminde yer alan İspanyol Manchega ırkı koyunlarda Temmuz başından Mart ortasına kadar sıklık ovulasyon aktivitenin devam ettiği, uzun bir üreme sezonuna sahip olduğu, anöstrus süresinin ise 111 gün sürdüğü ve bu sürede dahi koyunların belirli bir oranının ovulasyona devam edebildiği bildirilmiştir (Gómez-Brunet ve ark., 2008; Gómez-Brunet ve López Sebastián, 1991; ve Santiago-Moreno ve ark., 2000). Yine benzer şekilde Rasa Aragonesa (41°K'de) ve Merino (39°K'de) ırklarında da mevsimselliğin düşük etkili olduğu ve anöstrusun Mart ile Mayıs/Haziran arası 3-4 ay sürdüğü ortaya konulmuştur (Folch ve Alabart, 2000; Forcada ve ark., 1992 ve Gonzalez-López, 1993).

Östrus siklusu hipotalamus ön hipofiz ve ovaryumlar arasında koordine edilmiş bir şekilde hormonal ve nöral mekanizmalarla gerçekleşen olaylar ile karakterizedir (Barrett ve ark., 2004; Bartlewski ve ark., 1999a ve Smith ve Jennes, 2001). Kısaca hipotalamustan salgılanan GnRH, ön hipofizi etkileyerek folikül stimüle edici hormon

(FSH) ve luteinleştirici hormon (LH) salınımı uyarmaktadır (Rawlings ve Cook, 1993). Büyük foliküller yüksek miktarda östrojen üretmekte bu da LH salınımının artarak pike ulaşmasını sağlamaktadır (Caraty ve Skinner, 1999 ve Leyva ve ark., 1998). LH piki folikülün nihai gelişimini ve ovule olmasını destekleyerek oositin dışarıya atılmasını sağlamaktadır (Frandsen ve ark., 2009 ve Van Cleeff ve ark., 1998). FSH özellikle erken evrede folikül seçiminde önemli bir rol üstlenirken, LH dominant folikülün nihai gelişimi ve ovulasyon için kritik öneme sahiptir (Bartlewski ve ark., 2011 ve Fatet ve ark., 2011).

Üreme sezonunda bir östrus siklusu 14-18 günler arasında değişmekle beraber ortalama 16-17 gün olarak kabul edilmektedir. Siklus proöstrus (2-3 gün), östrus (ortalama 30 saat; 24-36 saat) metaöstrus (2-3 gün) diöstrus (10-12 gün) evrelerine ayrılmakta ancak daha yaygın olarak foliküler ve luteal faz olarak kategorize edilmektedir (Fatet ve ark., 2011 ve Souza ve ark., 1997).

Foliküler faz proöstrus ile başlamaktadır ve bu evre preovulatör foliküllerin gelişimini içermektedir (Fatet ve ark., 2011 ve Karaca ve ark., 2008). Takibinde ise östrus, dışının erkeği kabul ettiği dönemde foliküller nihai gelişimini ve maturasyonunu tamamlayarak ovule olmaktadır (Fatet ve ark., 2011). Luteal faz korpus luteum (KL) gelişiminin gözlemlendiği metaöstrus evresiyle başlamaktadır (Fatet ve ark., 2011; Leyva ve ark., 1998 ve Niswender ve ark., 2000). Devamındaki diöstrus evresi boyunca KL'dan progesteron salınımı artmakta ve evrenin sonuna doğru gebelik gerçekleşmez ise regrese olmaktadır (Cole ve Cupps, 2013).

Foliküler faz luteolizis zamanında, progesteron konsantrasyonların kanda düşmesi ile başlamakta ve faz ilerledikçe 2 mm üzeri foliküller seçilmektedir (Cueto ve ark., 2006; Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005a ve Rubianes ve Menchaca, 2003). FSH salınımındaki artış foliküler gelişimde etkili olmakta bunu, boyutuna ve yüksek miktarda östradiol salgılamasına bağlı olarak bir veya daha fazla folikülün ovule olmak üzere seçimi takip etmektedir (Bister ve ark., 1999; Evans ve ark., 2002; Ginther ve ark., 1995 ve Johnson ve ark., 1996). Dominant kalabilmek için ovulatör folikül inhibin salgılayarak diğer küçük foliküllerin regrese/atrezi olmasını sağlamaktadır

(Cueto ve ark., 2006; Evans ve ark., 2000 ve Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005b). Ancak koyun ve keçilerdeki bazı çalışmalar dominant folikülün küçük folliküllerin gelişimi üzerindeki bu baskılayıcı etkinin eksik olduğunu, dominant folikül varlığında da yeni foliküllerin oluşarak boyutlarının arttığı ve sonunda ovule olduğunu bildirmişlerdir (Driancourt, 1994; Evans ve ark., 2001; Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005a; Johnson ve ark., 1996 ve Letelier ve ark., 2009).

Foliküler fazda östrojen ve androjen seviyelerinde belirli bir artış olmaktadır. Folikül hücreleri gelişmeye devam ettikleri sürede östrojen salgılamakta bu da üzerlerindeki FSH ve LH reseptörlerini arttırmaktadır. FSH ve LH birlikte foliküler büyümeyi ve salgı kapasitesini destekleyerek folikül üzerinde lokal bir pozitif etki yaratmaktadır (Bearden ve Fuquay, 1992; Frandson ve ark., 2009 ve McNeilly ve ark., 1990). Dolaşımdaki östrojen ise FSH salınımı üzerinde negatif geribildirim etkisi ile ön hipofizden FSH salınımı etkilemekte, ancak LH salınımındaki artışı desteklemektedir (Letelier ve ark., 2011 ve Menegatos ve ark., 2003). Yüksek miktarda östrojen salgılayan Graff foliküllerin varlığı LH salınım frekansını arttırmakta ve östrojen pikini takiben 12 saat içinde plazma LH seviyesinde ani bir artış görülmekte, LH pikinden yaklaşık 24 saat sonra, östrusun bitmesine yakın ve genellikle tek bir folikül olmak üzere 2 veya 3 folikül ovule olabilmektedir (Frandson ve ark., 2009 ve Hafez ve Hafez, 2000).

Luteal faz ovulasyon sonrasında başlamakta, ovulasyonu takiben LH reseptörüne sahip teka hücreleri luteinize olarak LH sinyaline yanıt olarak progesteron salgılayan küçük teka luteal hücrelere dönüşürken (Mamluk ve ark., 1998a,b), FSH reseptörüne sahip granüloza hücreleri ise luteinize olarak FSH reseptörlerini kaybetmekte ve büyük granüloza luteal hücrelere dönüşmektedirler (Rajapaksha ve ark., 1996). Johnson ve ark. (1996), KL'un östrustan 7 gün sonra gözlemlenebildiğini, Bartlewski ve ark. (1999b) ise ovulasyondan 5 gün sonra tespit edildiğini ve $11,6 \pm 1,1$ gün süresince kaldığını bildirmiştir. KL boyutu luteal fazın erken döneminden orta dönemine doğru artış göstermektedir. Buna bağlı artış gösteren progesteron ise hipotalamusa negatif geribildirim aracılığıyla ön hipofizden LH salınımını inhibe etmektedir (Leyva ve ark., 1998; Souza ve ark., 1997 ve Vilariño ve ark., 2013).

Gebelik şekillenirse, gebeliğin anne tarafından tanınması gerçekleşmekte bu da KL'unun regresyonunu engelleyerek progesteron üretimine devam etmesini sağlamaktadır. Koyunlarda gebeliğin anne tarafından tanınması, 12-13. günlerde embriyo tarafından salgılanan interferon- τ ile gerçekleşmekte, endometriyum üzerinde etki ederek östrojen reseptör- α geni transkripsiyonunu inhibe etmekte, bu ise östrojen ile indüklenen oksitosin reseptörleri ve luteolitik prostaglandin F2a salınımını engellemektedir (Spencer ve ark., 2007 ve Spencer ve ark., 2008). Gebeliğin oluşmadığı durumlarda ise uterus endometriyumundan progesteron etkisi altında luteolitik etkili prostaglandin, PGF $_{2\alpha}$ sentezi gerçekleşmekte bu da KL dejenerasyonunu sağlayarak progesteron üretiminin azalmasını ve bu sayede foliküler gelişim stimüle edilerek proöstrusun yeniden başlamasını sağlamaktadır (Bearden ve Fuquay, 1992; Frandson ve ark., 2009; Gordon, 2004 ve Norris ve Lopez, 2010). Östrusun 11-13. günlerinde progesteron kademeli olarak düşmekte yapısal olarak luteolizis ise östrus siklusunun 14. gününden sonra görülmektedir (Leyva ve ark., 1998 ve Niswender ve ark., 2000). Koyunlarda luteal progesterona duyulan ihtiyaç gebeliğin 45. gününden itibaren yerini plasental progesterona bırakmaktadır (Casida ve Warwick, 1945 ve Denamur ve Martinet, 1955).

1.1.1. Senkronizasyon

Suni tohumlama ve embriyo transferi gibi ileri üreme tekniklerinin yaygınlaşması ile beraber östrus senkronizasyona olan ihtiyaç da artmıştır. Bunun yanı sıra prepubertal veya anöstrus döneminde olan dişilerin ovaryum aktivitesinin uyarılması, östrusları senkronize edilerek koç kullanımının etkili bir şekilde organize edilebilmesi, kuzulama dönemi daha dar bir zaman çekilerek uzun bir sürece yayılan gerekli iş gücünün azaltılması, östrus belirlemedeki başarı ve gerekli iş gücü ile zamanın azaltılması, östrusu daha erken veya ileri bir tarihe çekerek kuzulama zamanını yem kaynağı ve sektör talebine göre istenilen bir periyod ile sınırlamak, kuzularda benzer yaş dağılımı, doğum zamanını daha kesin bir şekilde belirleyerek hayvanların takibi, ilgili besleme yönetimi ve gerekli müdahaleleri gerçekleştirmek amacıyla da senkronizasyon uygulanabilmektedir.

Koyunlarda üreme sezonunda veya anöstrus döneminde östrus ve ovulasyonu kontrol etme denemeleri, genellikle KL'un siklik aktivitesinin taklidine dayanmakta, özellikle iki hafta süresince üretilen progesteron miktarları ve östrus siklusu sonunda üretimin ani bir şekilde tamamen kesilmesini üzerinden gerçekleştirmektedir. Ancak koyunlarda senkronizasyon amaçlı melatonin, besleme (flushing), koç etkisi ve ışık uygulamaları da yapılmaktadır. Diöstrus evresinin taklidi amacıyla sünger, CIDR, prid, gibi farklı intravaginal progesteron uygulamaları ayrıca oral kullanıma yönelik premiks, tablet, kulak veya derialtı implant gibi çeşitli uygulama yolları da bulunmaktadır (Alaçam, 1993).

Yüksek seviyelerdeki progesteron, LH frekansını ve foliküler gelişimi hipotalamus üzerinde negatif geribildirim ile baskılamakta (Scaramuzzi ve ark., 1993) üreme sezonundaki koyunlarda uygulama süresi bitimindeki ekzojen progesteron miktarlarının gerilemesini takiben 48 saat içinde, ön hipofizinden östrus ve ovulasyon için gerekli hormonal döngüyü başlatabilecek yeterli seviyede gonadatropin artışı beklenmektedir. Progesteron kaynağının sonlandırılma zamanında dominant bir folikülün varlığı ise, bu folikülün preovulatör folikül olarak seçilerek maksimum boyuta kadar gelişmesine ve ovule olmasına yol açmaktadır (Flynn ve ark., 2000).

Progesteron kaynağının sonlandırılması ile östrusun başlaması arasında görülen aralık preovulatör folikülün orjin aldığı farklı foliküler dalgalardan kaynaklanmaktadır (Viñoles ve Rubianes, 1998). Foliküler dalgaının senkronizasyonu östrus zamanındaki değişkenliğini azaltmak için gerekli iken bu durum sıklıkla senkronizasyon protokolüne gonadatropinlerin eklenmesi ile sağlanmaktadır (Barrett ve ark., 2004; Evans ve ark., 2004 ve Rajamahendran ve Raniowski, 1993).

Progesteronlar gonodatropinlerle kombine edildiğinde östrusun daha kesin senkronizasyonunu ve dolayısıyla da ovulasyonu arttırmaktadır (Driancourt, 2001 ve Vilariño ve ark., 2010). Bu sayede sabit zamanlı suni tohumlama uygulamalarına olanak tanımaktadır. Bu amaçla FSH gibi gonadatropinlerin maliyet ve hazırlama sürecindeki sınırlamalar, koyunlarda fertilitenin artırılması için sıklıkla gebe kısarak serum gonadatropini (PMSG) tercih edilmesine neden olur (Abecia ve ark., 2012 ve

Boscov ve ark., 2002). PMSG uygulamasının hızlı bir foliküler gelişime, ovule olan folikül sayısında artışa, östrus ve ovulasyonun senkronizasyona neden olduğu (Eekass ve ark., 1989), bununla beraber foliküler atrezinin azalmasına olanak sağladığı (Hirshfeld, 1989) bildirilmiştir.

Süngerin çıkarılması ile eş zamanlı olarak uygulanacak PMSG dozunun başlıca hayvanın fiziksel kondisyonuna, vücut ağırlığına, sezona, ırka ve yaşa göre ayarlanması büyük önem arz etmekte, bu amaçla 200-400 IU arası değişen PMSG dozu uygulanmakta ve ilke olarak düşük dozların uygulanması önerilmektedir (Abecia ve ark., 2011; Cueto ve Gibbons, 2010 ve Gibbons ve Cueto, 2012). Bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar sonucu üreme sezonunda etkin bir senkronizasyon için genellikle 300-600 IU PMSG yeterli olduğu (Uçar ve ark., 2002), ve progesteron uygulamasını takiben enjekte edilen 400-500 IU PMSG dozunun ovulasyon oranı artırılabilirdiğini belirtmişlerdir (Alaçam, 1993 ve Wildeus, 2000). Gibbons ve Cueto (2012), üreme sezonunda Merinos ırkında 250-300 IU, Corriedale ve Texel ırklarında 300 IU gonodotropin dozu kullanımını önermişlerdir. Artan dozların ovaryumların aşırı stimülasyonuna neden olarak kistik değişimlerine neden olabileceğini böylelikle de fertilizasyon ve implantasyon sürecinde dezavantaj sağlayabileceği bildirilmiştir (Bonev, 2003 ve Ralchev ve ark., 2007). Dozun arttırılması bazı koyun ırklarında ise süperovulatör yanıtı neden olarak ikizlik ve üçüzlük sağlamakta bu da düşük yavru sayısına sahip ırklar için yetiştiricinin beklediği avantajı sağlamaktadır (Gordon, 2004).

Glikoprotein yapıda olan PMSG hormonu gebeliğin 40-130. günleri arası kısırakların trofoblastik hücrelerinden sentezlenip salınmaktadır (Allen ve Moor, 1972). Moleküler ağırlığı 45 kDa'dır ve benzersiz bir şekilde kısırak dışındaki hayvan türlerinde uygulandığında hem LH hem de FSH benzeri aktivite göstermektedir (Cole ve Hart, 1930; Combarnus ve ark., 1981 ve Stewart ve ark., 1976). Aygırlarda plazma yarılanma ömrü 6 gün iken koyunlarda 60 saat kadardır (Cathpole ve ark., 1935 ve McIntosh ve ark., 1975).

Bu hormonun moleküler ağırlığı, yüksek seviyedeki glikozilasyonu ve heterelog kaynağı nedeniyle immunojenik etki oluşturduğu düşünülmektedir. Tekrarlı kullanılan PMSG hormonun ovaryum fonksiyonları ve ileriki reproduktif performans üzerinde negatif etkisi olduğu bildirilmiştir (Combelles ve Albertini, 2003; Cortell ve Viudes de Castro, 2008 ve Roy ve ark., 1999). PMSG hormonu uygulama sayısına göre keçilerde oransal olarak gecikmiş östrusun artış gösterdiği bildirilmiştir (Baril ve ark., 1993). Aynı üreme sezonu içinde ikinci uygulamada ise görülen negatif etkiler daha da artmıştır (Baril ve ark., 1992). Fertilitede görülen bu düşüşün dolaşımdaki plazma anti-PMSG antikorlarının artışı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Baril ve ark., 1992; Baril ve ark., 1996 ve Swanson ve ark., 1996). Takip eden PMSG uyarımları sonrası ovaryum fonksiyonlarında görülen negatif etki koyun, inek, kedi ve rhesus maymunlarında da PMSG-bağlayan immunoglobulinlerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir (Bavister ve ark., 1986; Jauinudeen ve ark., 1966; Pigon ve ark., 1986; Swanson ve ark., 1995 ve Swanson 1996). 500 IU PMSG enjeksiyonu sonucu spesifik immunoglobulin G antikorları takip eden bir sonraki sabit zamanlı suni tohumlama uygulamasında fertilitede düşüşe neden olduğu bildirilmektedir. Bu etki östrusun gecikmesi ve geç LH piki ile korelidir (Roy ve ark., 1999).

Ayrıca günümüzde PMSG üretiminde gebe kısırakların kullanılması dolayısıyla hayvan refahı bakımından etik endişelerin ortaya çıkması ile Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde PMSG kullanımına karşı yüksek derecede aktif bir hareket başlatılmış, PMSG üretimine karşı baskı oluşturularak hayvan üretiminde kullanımının yasaklanması amaçlanmaktadır. Her ne kadar halihazırda devlet yönetimlerinin fikri kullanımının devamı konusunda olsa da üretimi gerçekleştiren firmalara karşı olan sosyal baskının, ithalatın durdurulması noktasına varabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle ovulasyonun ve östrusun senkronizasyonu ve indüksiyonu için PMSG içermeyen alternatif protokoller araştırmak gerekmektedir (Bruno-Galarraga ve ark., 2021; Gonzales-Bulnes ve ark., 2020 ve Martinez-Ros ve ark., 2019).

1.1.2. Suni Tohumlama

Koyunda suni tohumlama uygulamasının birçok avantajı bulunmaktadır. Konvansiyonel yetiştirme programlarında bir koç yılda 50-100 koyun ile çiftleşebilirken servikal suni tohumlama yöntemiyle bu sayı 2-3 haftada 1000 koyuna çıkabilmektedir. Ayrıca, suni tohumlama elit koçların üstün genetik özelliklerini canlı hayvan transportuna göre çok daha uzak mesafeler arası yayabilmenin en etkili yoludur. Bunun yanı sıra küçük işletmelerin sürüde koç yetiştirme gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca saklamadan önce sperma kalitesinin incelenmesi sayesinde subfertil koçların sürüden çıkarılabilmesini sağlamaktadır. Yaralanma nedeniyle doğal aşım yapamayan üstün genetik kapasiteli koçlardan sperma alınabilmektedir. Koçun çiftleşmede dişi tercih etmesinin de önüne geçilmektedir. Daha tutarlı kayıt tutma imkanı sağlanarak bu sayede sürüde istenilen özelliklerin seçimi ve istenmeyen özelliklerin minimize edilmesi sağlanabilmektedir. Üreme sezonu dışında koçlardan düşük kalitede sperma alınabilmekte, ancak buna alternatif olarak üreme sezonu içerisinde alınan spermayla dişiler sezon dışı senkronizasyon ile tohumlanabilmektedir. Ayrıca istenilen cinsiyette kuzu üretimi de cinsiyeti belirlenmiş sperma ile suni tohumlama uygulaması sayesinde elde edilebilmektedir (Evans ve Maxwell, 1987 ve Foote ve ark., 2002).

Koyunlarda tohumlama vaginal, servikal veya intrauterin yöntemle gerçekleştirilebilmektedir. Vaginal yöntemde sulandırılmış taze sperma kullanılarak basit ve hızlı bir şekilde tohumlama işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Ancak diğer yöntemlere göre daha yüksek dozda sperma gerektirmekte ve gebelik başarı oranı değişkenlik göstermektedir. Daha önce doğum yapmamış dişilerde spekulumun ilerlemesine engel olan vajinanın vestibular kısmındaki darlık nedeniyle de bu yöntem tercih edilebilmektedir. Taze sulandırılmış veya soğutularak kısa süre saklanan sperma ile servikal tohumlama ise en sık kullanılan yöntemdir. Kullanılan ekipman basittir ve yeterli sayıda personel varlığında büyük sürüler kısa zamanda tohumlanabilmektedir. Doğru bir şekilde uygulandığında başarısı sürüdeki doğal aşımına ulaşabilmektedir. Senkronize edilen dişilerde bu yöntemle tohumlama, sünger çıkarıldıktan sonra 48-58 saatler arasında genellikle 55. saatte tek bir tohumlama ile gerçekleştirilmektedir. Bu

tohumlama yönteminin dondurulmuş sperma kullanılarak uygulanmasında ise başarı oranı düşüktür, bu nedenle dondurulmuş sperma kullanılması gereken durumlarda laparoskopik intrauterin tohumlama tercih edilmesi gerekmektedir. Bu yöntemle tohumlama süngerlerin çıkarılmasını takiben 60-66. saat sonra gerçekleştirilmelidir (Evans ve Maxwell, 1987).

1.1.2.1. Sperma Alımı

Teke ve koçlardan 3 farklı yöntemle sperma alınabilmektedir. Bunlar suni vajen, elektroejakülatör ve transrektal digital masajdır (Evans ve Maxwell, 1987 ve Tekin ve ark., 2020). Bir diğerine göre çeşitli avantajları ve dezavantajları bulunan bu yöntemlerden en çok tercih edileni suni vajen yöntemidir. Ancak sperma alımı için koçların suni vajene dikkatli bir şekilde alıştırılması gerekmektedir. Bunun için östrusu indüklenmiş dişiler kullanılabilir. Alıştırma süreci 1-3 hafta sürmektedir. Koçlar doğal aşım yöntemi ile günde 10-15 kere aşım yapabilmekte ancak bu sıklıkta sperma miktarı ve konsantrasyon kademeli olarak düşmektedir. Suni vajen yönteminde sperma alımı 5 gün boyunca, günde 1 veya en az bir saatlik ara ile 2 kez sıklıkla gerçekleştirilebilmekte devamında ise koçların 2 gün dinlendirilmesi gerekmektedir. Bu program ile sezon boyunca bir adet koçtan haftalık 50 doz sperma (400-500 milyon spermatozoa/doz) alınabilmektedir (Gordon, 2004).

1.1.2.2. Sperma Muayenesi

Koç sperması miktar ve kalite bakımından değişiklik gösterebilmektedir. Sperma kalitesi temelde spermatozoa motilitesi ve morfolojisini içermektedir. Bu özelliklerin yanısıra renk ve koku da sperma alınır alınmaz değerlendirilmelidir. Koç spermasının miktarı 0,6 ml ile 2 ml arasında değişmekle birlikte ortalama 1 ml sperma vermektedir. Koyu krem rengindedir ve pH'sı ortalama 6,7'dir. Ortalama $2-3 \times 10^9$ spermatozoa/ml konsantrasyonundadır ve motil spermatozoa oranı %80-90 kadardır. Anormal yapıdaki spermatozoa oranı ise %5-15 arasında normal kabul edilmektedir. Pratik olarak

konsantrasyonu 1×10^9 spermatozoa/ml'den az, motilitesi %60'dan daha düşük ve anormal spermatozoa oranı %30'dan fazla olan koç sperması tohumlamada kullanılmamaktadır (Ak, 2008). Örnekler birleştirilmeden (pooling) önce bireysel olarak her bir ejakülat değerlendirilmelidir (Evans ve Maxwell, 1987).

1.1.2.3. Spermanın Kısa Süreli Saklanması

Sperma alındıktan sonra 3 güne kadar kabul edilebilir bir tohumlama başarısı ile saklanabilmektedir. Spermanın canlılığı kullanılan sulandırıcı ve saklama süresine göre değişmekle birlikte 5°C veya 15°C'de motilite değeri en az kayıpla korunabilmektedir (Mata-Campuzano ve ark., 2014 ve O'Hara ve ark., 2010). Bu amaçla hazırlanan sulandırıcıların temel içeriklerinden ultradistile su solvent görevi görürken, Tris ve sitrik asit pH tamponu için, fruktoz enerji kaynağı, yumurta sarısı ise soğuk şokuna karşı koruma amacıyla kullanılmakta, penisilin ve streptomisin antibiyotikleri de kontaminasyonun önüne geçme amacıyla sulandırıcıya ilave edilmektedir.

Seminal plazma ve içeriği, spermatozoanın transportu, enerji ihtiyacı, kapasitasyon ve fertilizasyonda önemli roller üstlenmektedir (Jueyna ve Stelletta, 2012; Poiani ve ark., 2006 ve Robertson, 2005). Eklenti bezlerinin önemi, çeşitli türlerde bu bezlerin çıkarılması ile araştırılmıştır. Farelerde veziküler ve prostat bezlerinin çıkarılması spermatozoanın progresif motilitesi üzerinde olumsuz bir etki yaratmış ve bunun sonucunda gebelik oranını düşürmüştür (Pang ve ark., 1979 ve Peitz ve ark., 1968). Lamalarda ise bulboüretal bezin çıkarılması spermatozoanın ovidukta bağlanma yeteneğine hasar vermiştir ve bu bezden salgılanan proteinlerin oviduktal-sperm rezervuarı oluşumunda gerekli olduğu bildirilmiştir (Apichela ve ark., 2013). Ruminantlardaki seminal plazma protein içeriği, doğal koşullar altında spermanın dışı genital kanalda hayatta kalması için gerekli direnci sağlamada yeterli gelmektedir. Ancak suni tohumlama uygulaması için spermanın sulandırılarak dozlanması gerekmekte bu da protein konsantrasyonunu oldukça düşürmektedir. Spermanın işlem gördüğü sulandırma ve saklama gibi durumlarda, özellikle yüksek sulandırma oranları

gerektiğinde seminal plazma ilavesi spermatozoa fonksiyonu ve canlı kalabilmesinde etkili olmuştur (Cabellero ve ark., 2009; Garner ve ark., 2001 ve Maxwell ve ark., 1996). Araştırmalar sonucu spermatozoanın canlı kalabilmesi ve tohumlama sonrası fertilitayı sağlayabilmesi için belirli bir süre seminal plazmaya maruz kalmasının ve hatta seminal plazmanın belirli bir oranda varlığının gerekliliğini ortaya koymuştur (Abad ve ark., 2007; Fernandez-Gago ve ark., 2017; Garcia ve ark., 2009; Kaeoket ve ark., 2011; Okazaki ve ark., 2012; Okazaki ve ark., 2008; Recuero ve ark., 2019 ve Rodriguez-Martines ve ark., 2021).

1.1.3. Reprodüktif Ultrasonografik Muayene

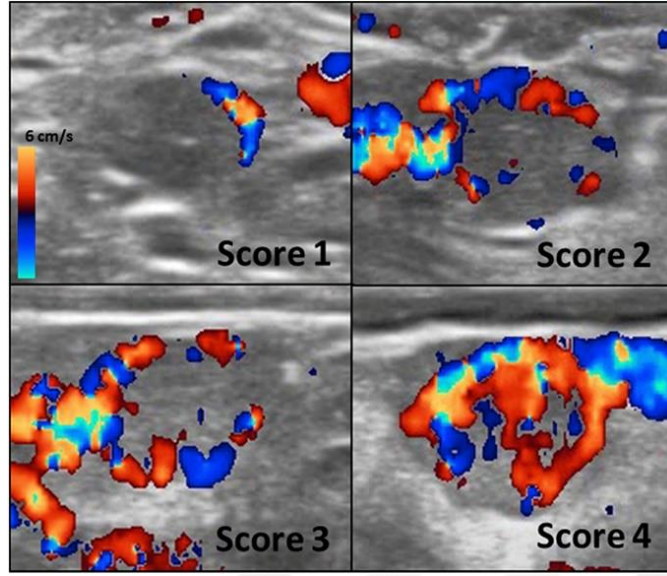
Dişilerde reprodüktif ultrasonografi gebeliğin yanısıra foliküler gelişim, atrezi ve ovulasyonu belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır. Transrektal prob lar ovaryum üzerindeki yapıların görüntülenmesi ve erken gebelik tespiti için olanak sağlarken transkutenöz prob lar ventral abdomenden gebeliğin ileriki dönemlerinde yavruya ait boyutların ölçümü ve cinsiyet tayini gibi durumlarda kullanılmaktadır. Bununla birlikte ultrasonografik muayene, patolojik durumlar ve anomalilerin belirlenmesinde biyopsi gibi invaziv tekniklerin yerini almıştır (Carolina Viñoles-Gil ve ark., 2010).

Linear veya konveks tip prob lar ile 7,5 mHz frekans ile 5-7 cm arası derinlik sağlanarak ovaryum üzerindeki yapıların muayenesi ve erken gebelik tespiti yapılabilirken, bu problemlere sektör prob da dahil olmak üzere 5 mHz frekans ile 10-17 cm derinlikte KL ve erken-orta dönem gebelik, 3,5 mHz frekans ve 17-20 cm derinlik ile de geç dönem gebelik tespiti yapılabilmektedir. Rektumun reprodüktif kanal ile olan yakın konumu ovaryum üzerindeki yapıların transrektal yol ile muayenesine olanak sağlamaktadır. Bu amaçla hayvan ayakta veya sırtüstü pozisyonda tutulmalıdır.

Siklik koyunlarda preovulatör folikül günlük yaklaşık 1 mm büyüme hızı oranıyla 6-7 mm çapına ulaşabilmektedir (Bartlewski ve ark., 1999). Korus luteum ise ultrasonografi ile en erken ovulasyondan 3 gün sonra tespit edilebilmektedir. KL oluşumu, devamlılığı ve progesteron üretimi için anjiyogenez ve yeterli kan akımının

sağlanması kritik öneme sahiptir (Yan ve ark., 1998). Orta-luteal dönemde KL boyutu ile progesteron salınım miktarı arasında yüksek korelasyon bulunmaktadır (Gonzalez de Bulnes ve ark., 2000). Ayrıca KL vaskülarizasyonu ve hormon üretimi arasında da yakın bir ilişki bulunmaktadır (Kobayashi ve ark., 2001 ve Stormshak ve ark., 1963).

Bunun yanı sıra yakın zamanda yapılan çeşitli çalışmalarda koyunlarda gebeliğin hemodinamik özellikleri ortaya konulmuştur (Arashiro ve ark., 2018; Bragança ve ark., 2016; Elmetwally ve ark., 2016 ve Turna Yılmaz ve ark., 2017). Örneğin lamalarda luteal vaskülarizasyon ile gebelik 12. günden itibaren tespit edilebilirken (Gallelli ve ark., 2020), benzer şekilde mandalarda (Samir ve Kandiel, 2019), ineklerde (Dubuc ve ark., 2020; Scully ve ark., 2015; Siqueira ve ark., 2013 ve Utt ve ark., 2009) ve keçilerde (Cosentino ve ark., 2018) gebelik durumu 17-21. günden itibaren yüksek tutarlılıkla tespit edilebilmektedir. Koyunlarda ise B-mode ultrasonografi ile gebelik tespiti en erken 25. günden itibaren mümkün olurken; luteal vaskülaritenin semikantitatif veya sübjektif değerlendirilmesiyle 17. günden itibaren belirlenebilmektedir (Arashiro ve ark., 2018; Cosentino ve ark., 2019; Dal ve ark., 2019 ve Santos ve ark., 2020). Ayrıca luteal vaskülarizasyonun sübjektif olarak değerlendirilmesinin, ölçülen renkli piksel sayısı hesaplamasına kıyasla saha koşullarında daha uygun olması ve progesteron seviyeleri ve luteal fonksiyon bakımından benzer korelasyon göstermesi nedeniyle tercih edilebileceği vurgulanmıştır (Balara ve ark., 2017). İneklerde tohumlama sonrası ilk 3 hafta boyunca luteal vaskülarite, progesteron seviyesi ve luteal çap ölçümlerinin gerçekleştirdiği bir çalışmada ise luteal vaskülaritenin, gebe ve boş hayvanlar arasındaki luteal fonksiyon değişimini belirlemede, luteal çap ve progesteron ölçümüne kıyasla daha duyarlı bir parametre olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Hassan ve ark., 2019).



Şekil 1.1. Luteal vaskülaritenin ultrasonografik değerlendirmesi (Arashiro ve ark., 2018).

1.2. Sinir Büyüme Faktörü

Yaklaşık 26 kDa moleküler ağırlığa sahip bir protein olan sinir büyüme faktörü (NGF) 13 kDa ağırlığındaki eş dimerlerden oluşmaktadır. NGF, nörotrofin-3 (NT-3), nörotrofin-4 (NT-4) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF)'ü de içeren nörotrofin ailesinde yer almaktadır ve bu ailenin ilk tanımlanan üyesidir (Kolbeck ve ark., 1994). Başlangıçta proNGF olarak adlandırılan, 130 kDa moleküler ağırlığa sahip bir kompleks formunda eksprese edilmektedir. Alfa-NGF (α -NGF), beta-NGF (β -NGF) ve gamma-NGF (γ -NGF) (2:1:2 oranında) polipeptitlerinden oluşmaktadır. NGF terimi ise genellikle 26 kDa moleküler ağırlığa sahip ve biyolojik olarak aktif formu olan beta alt ünitesini (β -NGF) tanımlamak için kullanılmaktadır (Kazak ve Yarım, 2014).

Genel olarak NGF beyin dokusunda eksprese edilmekte, ancak periferel dokularda da yaygın olarak bulunmaktadır. Merkezi sinir sisteminde NGF'ün büyük bir çoğunluğu korteks, hipokampus ve hipofiz bezinde üretilmektedir. Ancak bazal gangliyon, talamus, spinal kord ve retina gibi diğer dokularda da önemli ölçüde üretilmektedir (Aloe ve ark., 2012 ve McAllister, 2001).

Temel görevi periferik ve merkezi sinir sistemi hücrelerinin işlevini düzenlemektir. Sinir sistemi haricinde de çeşitli biyolojik etkilere sahip olan bu protein, lenfosit, nötrofil, monositlerin ve kök hücrelerin hayatta kalmasında, farklılaşmasında ve çoğalmasında etki göstermektedir. Bununla birlikte erkek ve dişi reproduktif dokularında ve nöral olmayan çeşitli hücrelerde de varlığı saptanmıştır (Kazak ve Yarım, 2014). Tüm bu biyolojik aktivitelerini yüksek affiniteli spesifik reseptörü tropomiyozin reseptör kinaz A (Trk-A) ve düşük affiniteli non-spesifik reseptörü olan p75 nörotrofin reseptörü (p75NTR) aracılığı ile gerçekleştirmektedir (Chao ve Hempstead, 1995).

İlk izolasyon kaynağı fare sarkoması, submandibular tükürük bezi ve kobra zehridir (Angeletti ve Bradshaw, 1971). Devamında yapılan saflaştırma çalışmalarında ise boğa seminal plazmasının da önemli bir NGF kaynağı olduğu ortaya konulmuştur (Harper ve ark., 1982). Ayrıca yapısının türler arasında yüksek derece korunduğu Ratto ve ark., 2012), hem insan rekombinant NGF'ün hem de alpaka seminal plazmasından saflaştırılan NGF'ün yapı ve etkilerinin karşılaştırılarak (Kershaw-Young ve ark., 2012; Pinet-Charvet ve ark., 2020 ve Stuart ve ark., 2015) her ikisinin de ovulasyonu GnRH sekresyonunu artırarak indüklediği bildirilmiştir (Pinet-Charvet ve ark., 2020). Dişi ve erkek reproduktif dokularında bu proteinin saptanması sonucunda çalışmalar, bu proteinin üreme sistemi ile ilişkili çeşitli işlevleri olabileceği kanısına yol açmış ve bazı provoke ovulasyon gösteren türlerde ovulasyonu tetiklemekte olduğu ve luteotrofik etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Adams ve ark., 2016 ve Ratto ve ark., 2012). Ayrıca hem provoke ovulatör hem de spontan ovulatör türlerin seminal plazmasında bu faktörün varlığı saptanmıştır (Adams ve ark., 2016; Harper ve Thoenen, 1980; Hofmann ve Unsicker, 1982 ve Ratto ve ark., 2011). Gerçekleştirilen bir çalışmada sıvı kromatografik kütle spektrometrisi analizi ile alpaka ve lama seminal plazmasında dominant protein olarak yüksek miktarlarda saptanırken, boğa, koç ve aygır spermasında ise daha düşük miktarları yer aldığı bildirilmiştir (Druart ve ark., 2013).

Dişilerdeki çeşitli reproduktif etkilerini sistemik ve lokal yollar aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Hayvan türüne göre değişmekle birlikte, NGF'ün alpaka ve

lamalar gibi çeşitli provoke ovulator türlerde hipofiziyal bazofilik hücrelerden LH salınımı ve süresini arttırdığı, ovulasyonu tetiklediği ve luteotrofik etki göstererek oluşan korpus luteum çapını arttırdığı ve salgılanan progesteron miktarını 2 katına çıkardığı gözlemlenmiştir (Adams ve ark., 2005). Bazı spontan ovulator türlerde ise görülen luteotrofik etkinin yanısıra, uygulama dönemi bağlı olarak prepubertal düvelerde FSH konsantrasyonlarını arttırarak yeni bir foliküler dalga oluşumunu hızlandırdığı, pubertaya erişen düvelerde ise kayda değer oranda daha senkronize ovulasyonlar elde edildiği ortaya konulmuştur (Tanco ve ark., 2012 ve Tribulo ve ark., 2015).

Alpaka ve lamalarda seminal plazma uygulamasını takiben gerçekleşen LH piki doğal çiftleşme ile benzer şekilde; 30 dakika içinde başlamakta, maksimum seviyesine 2 saatte ulaşmaktadır. Ancak LH pik süresi GnRH uygulamasına kıyasla uzamakta ve 8 saat boyunca bazal seviyelere düşmemektedir. Ultrasonografik görüntüleme ile takibi yapılan dişilerde ovulasyonlar doğal çiftleşme ($30,0 \pm 0,5$ saat), GnRH ($29,3 \pm 0,6$ saat) veya LH ($29,3 \pm 0,7$ saat) uygulaması ile benzer bir şekilde, seminal plazmanın uygulamasından $29,3 \pm 0,7$ saat sonra gerçekleşmiştir (Adams ve ark., 2005 ve Ratto ve ark., 2006).

Seminal plazmadaki NGF'ün ovulator etkisinin dolaşımında dalgalı LH salınımına neden olarak gerçekleştirdiği açık bir şekilde ortaya konulmuştur. Lamalara GnRH antogonisti (cetrorelix) uygulandığında NGF'ün etkisiz kalması (LH salınımı ve ovulasyonun engellenmesi), bu proteinin hipotalamustaki GnRH nöronları üzerinde direkt veya indirekt etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Silva ve ark., 2011). Yapılan çeşitli *in vitro* çalışmalar ile NGF'ün hipofiz bezinden salgılanan gonadotropinler üzerinde direkt etkisi olduğu belgelenmiştir. İnek ve lamaların ön hipofiz lobu primer hücre kültürleri NGF içeren medyumlarla 2 saat süresince inkübe edilerek LH seviyeleri ölçüldüğünde, lamalarda LH konsantrasyonu doza bağımlı artış gösterirken ineklerde ise bu etki doza göre herhangi bir değişim göstermemiştir (Bogle ve ark., 2012). Sıçanlarda ise ön hipofiz hücrelerinde LH salgılayan gonadotrop hücrelerin %75'inde NGF tespit edilmiş ve bu hücrelerin %44'ü Trk-A reseptörü ekspresyonu göstermiştir (Patterson ve Childs, 1994).

Spontan ovulatör bir tür olan sığırlarda, boğa ve devegillerin seminal plazma uygulaması, plazma LH seviyesinde bir artışa neden olmaksızın luteotrofik bir etki göstermiştir (Tanco ve ark., 2012 ve Tribulo ve ark., 2015). Carrasco ve ark. (2016) tarafından NGF'ün luteotrofik etkisi, hipotalamus veya hipofizdeki Trk-A reseptörleri ile etkileşimi sonucu gonadotropin salınımı yerine, sığırlarda direkt olarak ovaryumda, dominant folikül üzerindeki granüloza ve teka hücrelerinin sahip olduğu Trk-A reseptörlerinin artan ekspresyonu ve bu reseptörler ile NGF'ün etkileşimi aracılığı ile sağlandığı belirtilmiştir. Özellikle erken luteal dönemde veya luteolizis sonrası dolaşımdaki progesteron minimum düzeyde iken, dominant ve diğer foliküller üzerindeki Trk-A ekspresyonu karşılaştırıldığında, NGF'ün folikül seçimi ve luteogenezin erken aşamalarında rolü olduğu kanısıyla uyum göstermektedir. Ayrıca NGF'ün ineklerde *in vitro* orta-luteal dönemdeki KL hücre kültüründen progesteron salınımını stimüle ettiği bildirilmiştir (Miyamoto ve ark., 1992). Farklı türlerde görülen bu luteotrofik etkinin LH salınımı genliği ile merkezi mekanizma, ovaryum foliküllerindeki spesifik reseptör ekspresyonundaki geçici değişimler ile ise lokal mekanizma aracılığıyla gerçekleşmesi, bu proteinin birden fazla etki mekanizmasının olduğunu düşündürmektedir. *In vitro* bir yaklaşım ile hem insan rekombinant NGF'ün hem de alpaka seminal plazmasından saflaştırılan NGF'ün, GnRH nöronlarının elektriksel aktivitesi üzerindeki stimüle edici etkisini, bu nöronlara mikroçevre oluşturan glial hücrelerdeki reseptörü p75 aracılığı ile gerçekleştirdiği, bunu da kalsiyum iyon piklerinin sıklık ve/veya süresini arttırarak, LH salınımına yol açan GnRH sekresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Pinet-Charvet ve ark., 2020). Süperstimüle eden farelerde ise GNRH ve PMSG kadar etkili bir şekilde ovulasyonu stimüle ettiği bildirilmiştir (Bogle ve ark., 2011).

Lama seminal plazmasından saflaştırılan NGF'ün, prepubertal düvelere uygulanmasının ovulasyonu tetiklemediği belirtilmektedir. Fakat uygulama sonrası dolaşımdaki mevcut FSH konsantrasyonunu artırarak yeni foliküler dalga oluşumunu hızlandırmıştır. Bu sonuçlar NGF'ün, dominant folikül üzerine baskılayıcı bir etki göstererek foliküler dalga dinamiklerinin kontrolünde görev aldığını düşündürmektedir (Tanco ve ark., 2012). Saflaştırılan NGF pubertaya erişmiş düvelerde de ovulasyonu indüklenememiş, fakat LH uygulamasını takiben 12 saat

sonra i.m enjeksiyonu yapılan boğa seminal plazması ile daha senkronize ovulasyonlar (LH uygulamasından sonra 30-34 saat arası) ayrıca ovulasyondan 4 saat sonra uygulanan boğa seminal plazma enjeksiyonları luteotrofik (artan plazma progesteron seviyesi) etki sağlamıştır. Bunun yanısıra lama seminal plazmasından saflaştırılan NGF, düvelerde faza bağlı bir şekilde luteotrofik etki göstermekte ve dominant folikül gelişimini etkilemektedir. 6. günde uygulanan NGF, kontrole göre daha küçük dominant folikül çapına sahip olmakla beraber 6. ve 9. günlerde yapılan uygulamalar sonrası dolaşımdaki FSH konsantrasyonları 24 saat içinde artmıştır (Tanco ve ark., 2012 ve Tribulo ve ark., 2015). Koyunlarda ise alpaka seminal plazması enjeksiyonunu takiben 4 saat içerisinde LH konsantrasyonları artışı, bu proteinin spontan ovulatör türlerde de reproduktif hormonal regülasyonda etkili olduğunu göstermiştir (Druart ve ark., 2015).

Bunun yanısıra erkeklerde çeşitli reproduktif sistem organları ve sperm hücrelerinde yüksek (*Trk-A*) ve düşük affiniteli (*p75*) NGF reseptörleri varlığı, bu proteinin, sperm fonksiyonunda da etkili olduğu görüşünü ortaya koymaktadır (Jin ve ark., 2006; Li ve ark., 2005; Li ve ark., 2010a ve Ren ve ark., 2005).

Maymunlarda, epididimis, seminal vezikül ve testislerde, çeşitli aşamalarda sperm hücreleri ile Sertoli ve Leydig hücrelerinde, NGF ve reseptörleri *Trk-A* ile *p75* pozitif boyanmıştır (Jin ve ark., 2006). Sıçan ve fare testisinde ise primer spermatositlerden olgun spermatidlere kadarki aşamalarda NGF immunoreaksiyonları pozitif olarak belirlenmiştir (Ayer-LeLievre ve ark., 1988). Boğalarda NGF mRNA en yüksek veziküler bezde, ampullada orta seviyede ve bulboüretal bez ile prostatta en düşük seviyede bulunurken, immuhistokimya ile ampulla ve veziküler bezde en yoğun boyamalar gözlemlenmiştir (Adams ve ark., 2016; Hofmann ve Unsicker 1982 ve Stewart ve ark., 2018).

İmmunofloresans tekniği ile boğa spermasında NGF immuno reaktivitesi spermatozoanın kuyruk ve baş bölgesinde, reseptörü *Trk-A* ise kuyruk, nükleus ve akrozomal kapta saptanabilmiştir (Li ve ark., 2010a). Gebe bırakabilme oranı sürü ortalamasından yüksek olan boğaların sperm hücrelerinde NGF mRNA daha yüksek

miktarda saptanmıştır. İmmuno-sito-kimyasal yöntem ile NGF spermanın baş, orta ve kuyruk kısmında saptanmış, özellikle de akrozom ve kuyruk bölgesinde yüksek miktarda eksprese edildiği, fertilite skoru yüksek olan boğaların ve viabilite ve motilitesini sürdürebilme, zamanında akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon gösterebilme ve dolayısıyla fertilizasyon oranını yükseltebilme yeteneğine sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular sperma fertilitesi ile NGF arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (Kasimanickam ve ark., 2012).

NGF ve Trk-A ejaküle olmuş insan spermasında da eksprese edilmekte, NGF özellikle spermatozoanın boyun ve orta kısmında, Trk-A reseptörü ise baş, boyun ve orta kısımda immunoreaktivasyon göstermektedir. Hem seminal plazmadaki NGF miktarı hem de spermatozoadaki Trk-A mRNA, oligoastenozoospermik erkeklerde daha düşük miktarda saptanmıştır (Li ve ark., 2010b). Astenozoospermik özellikte spermaya sahip olan insanlar ile karşılaştırıldığında ise normozoospermik spermada NGF içeriği önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde bulunmuştur (Saeednia ve ark., 2016).

Çin kobrasından elde edilen NGF'ün erkek sıçanlara enjeksiyonu ile sperm motilitesi, gebelik oranları ve fetüs sayısını arttırdığı bildirilmiştir (Xu ve ark., 1999). Golden hamsterlarda ise spermanın NGF ile inkübasyonu sonucunda çeşitli kinetik parametreleri (VSL, VCL, ALH) ve akrozom reaksiyonunu stimüle ettiği ve bu etkinin doz ve süreye bağlı bir şekilde arttığı ortaya konulmuştur (Jin ve ark., 2010).

Boğalarda spermanın NGF ile inkübasyonu sperma canlılığında artışa neden olmuş ancak mitokondriyal aktivite, hücre içi kalsiyum seviyeleri veya akrozom reaksiyonu üzerinde ise herhangi bir etki görülmemiştir (Li ve ark., 2010a). NGF ve nörotrofinler esas olarak proliferasyonu desteklemekte, hedef hücrelerin maturasyonu ve hayatta kalmasını sağlamaktadır. Ancak çeşitli çalışmalarda, NGF kültür koşulları veya hücre tipinin yapısına göre trofik etkiden ziyade, sitotoksik bir etki göstererek apoptozisi tetiklediği ortaya konulmuştur (Ahn ve ark., 2005; Muragaki ve ark., 1997 ve Nakagawara ve ark., 1993).

In vitro insan sperması ile farklı süre ve dozlarda NGF inkübe edilmesi doza bağlı olarak motilite ve kinetik hız parametrelerinden VSL (Doğrusal hız $\mu\text{m/s}$), VAP (Ortalama yol hızı, $\mu\text{m/s}$), VCL (Eğrisel hız $\mu\text{m/s}$), LIN (Eğrisel yolların doğrusallığı, %) ve BCF (Çapraz geçiş frekans ritmi, Hz) değerlerinde artışa neden olarak A kalite spermatozoa yüzdesini arttırmıştır, ancak STR (Ortalama yolun doğrusallığı %), ALH (Başın saptığı uzaklık, μm) ve WOB (Kararsızlık) değerleri için herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Lin ve ark., 2015 ve Shi ve ark., 2012).

Spermanın dondurulması amacıyla sulandırıcıya eklenen 0,5 ng/ml NGF ile kriyoprezervasyonu gerçekleştirilen astenozoospermik örneklerin çözüm sonu motilite ve viabilite değerleri artmış, DNA fragmentasyonunu daha düşük düzeyde bulunmuştur. Bu bulgular normozoospermik sperma kullanıldığında daha etkin bir şekilde gözlemlenmiştir (Saeednia ve ark., 2015 ve Saeednia ve ark., 2016).

Dünya çapında tarım ve hayvancılık giderek “daha temiz ve daha yeşil” bir yaklaşıma doğru yönelmektedir. Gerek provoke ovulatör türlerde gerek ise spontan ovulatör türlerde ovulasyonun tetiklenebilmesi için, kontrollü hayvan üretim programlarında hormonların kullanımını azaltabilecek uygun bir metoda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, memeli türlerinin seminal plazmalarında halihazırda mevcut olan proteinlerden biri olan sinir büyüme faktörünün (NGF) senkronizasyon protokolüne adaptasyonu ile ekzojen olarak dişilere uygulanması ve spermaya ilavesi ile hem dişi hem de erkek fertilitésinin dolayısıyla suni tohumlama başarısının artırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Araştırma kapsamında Ankara ilindeki Köksal Hayvancılık İşletmesi'nde barındırılan 75 baş (2-3 yaşlı/primipar) Akkaraman koyunu ve Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü'nde barındırılan 3 baş Akkaraman ırkı koç kullanılmıştır. Araştırma Ocak-Şubat ayları içerisinde, Akkaraman ırkı için bildiren üreme sezonunu dahilinde gerçekleştirilmiştir (Arsoy ve Sağmanlıgil, 2018). Hayvanların bakım ve beslemesi bağlı bulunduğu ilgili işletmeler tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla koyunlar günlük ortalama 1 kg kuru ot ve 300-350 gr arpa ile beslenirken su, mineral madde ve tuz içeren taşlar ad libitum olarak verilmiştir. Koçlar ise 1 kg kesif yem (%42 arpa, %51 mısır, %3 buğday kepeği, %3,6 ayçiçeği tohumu ve soya fasulyesi küspesi %0,025'er vitamin ve mineral ile %0,15 kireç taşı ve %0,2 tuz) ve 900 gr kuru ot ile ad libitum su ile beslenmiştir. Sağlıklı hayvanlar arasından, vücut kondisyon skoru 2,5-3,0 arası olan 75 adet dişi seçilmiştir. Bununla beraber 5 adet koçun genel ve reproduktif ultrasonografik muayeneleri yapılarak 3 birey seçilmiş, suni vajene alıştırılması amacıyla sperma alımı denemeleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1).

Şekil 2.1. Koçlardan suni vajen ile sperma alımı

2.2. Çalışma Dizaynı

İlk çalışma paketi (Senkronizasyon grupları-SN) için reproduktif açıdan sağlıklı olarak belirlenen 30 baş dişide β -NGF enjeksiyonlarının dişilerde ovulasyon ve gebelik sonuçları üzerindeki etkileri değerlendirilmesi amacıyla dişiler 3 alt gruba ayrılmıştır. Çalışmanın alt grupları; Yüksek Doz (250 μ g i.m. β -NGF) (n = 10), Düşük Doz (100 μ g i.m. β -NGF) (n = 10) ve Kontrol (1 ml %0,09 NaCl i.m.) (n = 10) olarak belirlenmiştir. Suni tohumlama öncesinde dişilerin alt gruplara göre senkronizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 30 koyunun senkronizasyonu intravaginal süngerler (60 mg medroksiprogesteron asetat), ile yapılmış ve süngerler 12. günde çıkartılmıştır. Takibinde 13.gün 20 adet dişiye β -NGF enjeksiyonu 250 μ g (n = 10) veya 100 μ g (n = 10) dozunda i.m. olarak uygulanmıştır. Kontrol grubundaki (n = 10) dişilere ise β -NGF enjeksiyonu yerine i.m. olarak 1 ml %0,09'luk NaCl enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyonları takiben 4-6 saat sonra (Druart ve ark., 2015) dişilerin ultrasonografik muayeneleri yapılarak ovaryum üzerindeki foliküller belirlenmiş ve ölçümleri yapılmıştır. Sabit zamanlı suni tohumlamalar süngerlerin çıkarılmasından itibaren 53-55. saatler aralığında servikal metot ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla androlojik ve spermatolojik muayeneleri yapılan 3 adet koçtan alınan spermaların pool yöntemi ile birleştirilerek payette 250 milyon motil spermatozoa olacak şekilde (500 milyon motil sperm/ml) sulandırılıp +4°C'de 2 saat saklanan spermanın muayenesi gerçekleştirilerek +4°C'de transportu ile 3 saat içerisinde tohumlamalarda kullanılmıştır. Tohumlama ışık kaynağı ve spekulum yardımıyla gerçekleştirilmiş, serviksin girişinin belirlenmesinin ardından katater serviks boyunca ilerletilmeye çalışılmış, ilerlemediği durumda ise sperma serviksin girişinden içeri bırakılmıştır (Şekil 2.2). Tohumlama sonrası 6. ve 10. günlerde dişilerden kan alınarak serum progesteron düzeyleri Elisa test kiti ile belirlenmiş ayrıca tohumlamadan sonra 17. günde KL'a ait vaskülarizasyonlar Renkli Doppler ultrasonografi ile görüntülenerek subjektif olarak değerlendirilmiş ve gebelik tespiti yapılmıştır (Arashiro ve ark., 2018; Cosentino ve ark., 2019; Dal ve ark., 2019 ve Santos ve ark., 2020).

Şekil 2.2. Suni tohumlama uygulaması

İkinci çalışma paketi (Sperma grupları) için, 45 koyunun rutin senkronizasyon protokolü intravaginal süngerler (60 mg medroksiprogesteron asetat) ile gerçekleştirilmiş ve süngerler 12. günde çıkarılırken dişilere vücut kondisyon skorları göz önünde bulundurularak 350-400 IU aralığında kas içi PMSG (gebe kısarak serum gonodotropin) enjeksiyonu yapılmıştır (Abecia ve ark., 2011). 13. gün dişilerin ultrasonografik muayeneleri yapılarak ovaryum üzerindeki foliküller belirlenmiş ve ölçümleri yapılmıştır. Normospermi özelliğine sahip 3 adet koçtan alınan spermalar pool yöntemi ile birleştirilerek payette 250 milyon motil spermatozoa olacak şekilde (500 milyon motil sperm/ml) dozlanmış, devamında üçe bölünerek, kontrol grubu (n = 15) için sadece sulandırıcı içeren medyum kullanılmış, diğer iki grup olan yüksek doz ve düşük doz grupları (n = 15, n = 15) için ön çalışma ile belirlenen 10 ng/ml ve 100 ng/ml dozunda β -NGF, 500×10^6 sperm/ml dozunda sulandırılmış spermaya ilave edilmiştir. Hazırlanan payetlerin 2 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklama süresi sonrası muayeneleri gerçekleştirilmiş ve 3 saat içerisinde kullanmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'de transportu gerçekleştirilerek, 45 koyunun sabit zamanlı suni tohumlaması, süngerlerin çıkarılmasından itibaren 53-55. saatleri aralığında, servikal metot ile gerçekleştirilmiştir.

Tohumlama sonrası 6. ve 10. günlerde dişilerden kan alınarak serum progesteron düzeyleri Elisa test kiti ile belirlenmiş ayrıca tohumlamadan sonra 17. günde KL'a ait vaskülarizasyonlar renkli Doppler ultrasonografi ile görüntülenerek sübjektif olarak değerlendirilerek gebelik tespiti yapılmıştır (Arashiro ve ark., 2018; Cosentino ve ark., 2019; Dal ve ark., 2019 ve Santos ve ark., 2020).

2.3. Senkronizasyon Protokolü

Senkronizasyon amacıyla 75 adet dişiye medroksiprogesteron asetat içeren intravaginal süngerler (Hipra, Türkiye) takılarak 12. günde çıkartılmıştır. İlk çalışma paketinde sünger çıkarılmasını takiben 13. gün 20 adet dişiye β -NGF (rekombinant, insan, Cat No: 11050-HNAC Sino Biological, Çin Halk Cumhuriyeti) enjeksiyonu (Kershaw-Young ve ark., 2012; Pinet-Charvet ve ark., 2020 ve Stuart ve ark., 2015), 250 μ g (n = 10) veya 100 μ g (n = 10) dozunda i.m. olarak uygulanmıştır (Tanco ve ark., 2011 ve Tribulo ve ark., 2015). Kontrol grubundaki (n = 10) dişilere ise β -NGF enjeksiyonu yerine i.m. olarak 1 ml %0,09'luk NaCl enjeksiyonu yapılmıştır. İkinci çalışma paketinde ise 45 adet dişiye süngerlerin çıkarılmasını takiben vücut kondisyon skorları göz önünde bulundurularak 350-400 IU aralığında kas içi PMSG (gebe kısrağ serum gonadotropin, Hipra, Türkiye) enjeksiyonu yapılmıştır (Abecia ve ark., 2011). Tohumlamalar süngerlerin çıkarılmasından itibaren 53-55. saatler aralığında gerçekleştirilmiştir (Naim ve ark., 2009).

2.4. Suni Vajenin Hazırlanması

Koç suni vajeni 70°'lik alkolden geçirilerek kurutulduktan sonra ucuna sperma toplama kadehi yerleştirilerek içerisine sperma alma sırasında sıcaklığı 42-45°C olacak şekilde sıcak su eklenmiştir. Bir miktar vazelin kayganlığı sağlamak amacıyla kullanılırken basıncı içine doldurulan sıcak su ve hava üflenerek sağlanmıştır (Demirci, 2002).

2.5. Spermatolojik Muayeneler

Araştırma kapsamında fertil 3 adet koçtan kızgın koyun varlığında suni vajen ile dereceli toplama kadehine alınarak ejakülat miktarı ml olarak kaydedilmiştir, ayrıca spermatolojik parametrelerden motilite, konsantrasyon, anormal ve ölü spermatozoa oranı ile pH yönünden muayene edilmiştir. Bu amaçla Tris bazlı sulandırıcı (2,666 g Tris, 0,44 g fruktoz, 1,398 g sitrik asit, yumurta sarısı %12 (v/v): pH 6,8) seçilmiştir (Allai ve ark., 2015). Tohumlama günlerinde 3 adet fertil koçtan 2'şer kez alınan spermaların muayenesi bireysel olarak ve tüm spermaların pooling işleminden sonra 2 saatlik soğukta saklama süresi sonrasında muayene edilmiştir.

2.5.1. Motilite

Hareket eden spermatozoonların, tüm spermatozoaya oranı olarak ifade edilen motilite; bireysel ve pooling işleminden sonra 2 saatlik soğukta saklama işlemini takiben ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta 10 × büyütmede subjektif olarak değerlendirilmiştir.

2.5.2. Konsantrasyon

Sperm konsantrasyonu fotometrik yöntem (Accucell, IMV, Fransa) ile belirlenmiştir (Şekil 2.3). 40 µl nativ spermadan alınan numune 3960 µl NaCl solüsyonu ile 1/100 oranında sulandırılarak fotometreye yerleştirilmiş ve sonuçlar 10⁶ spermatozoa/ml olarak kaydedilmiştir.



Şekil 2.3. Spermanın konsantrasyonunun belirlenmesi

2.5.3. Anormal Spermatozoa Oranı

Anormal spermatozoa oranının belirlenmesinde sperma morfoloji kiti (Sperm Blue®, Microptics®, İspanya) kullanılmıştır. 1/200 oranında sulandırılan spermadan bir damla alınarak lamın üzerine froti hazırlanmıştır. Kurutulan preparatlar yatay olarak boyama tepsisine yerleştirilerek sperm blue ile 15 dakika boyamaya tabi tutulmuştur. Süre sonunda lamel kapatılarak her bir preparattan 100 spermatozoa sayılmış, anormal yapılı spermatozoa oranları belirlenmiştir.

2.5.4. Canlı Spermatozoa Oranı

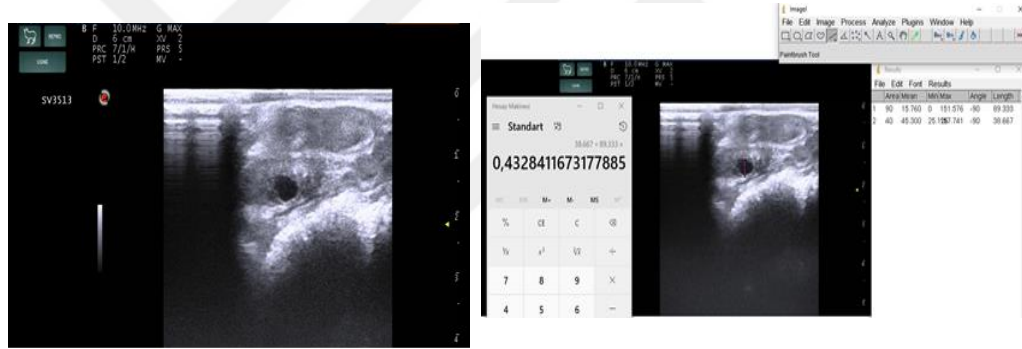
Eozin-nigrozin boyama yöntemi kullanılarak önceden ısıtılmış lam üzerinde 1 damla sperma ile %3'lük sodyum sitrat solusyonu içinde %2'lik olarak hazırlanmış eozin boyası karışımından 2 damla boya karıştırılmış froti ile yayılarak ışık mikroskopunda $400 \times$ büyütmede en az 5 adet sahada 100 spermatozoa değerlendirilmiş ve ölü olanların oranı % olarak ifade edilmiştir (Tekin, 1994).

2.5.5. pH

Spermanın pH'sı, pH indikatör kağıdı kullanarak saptanmıştır.

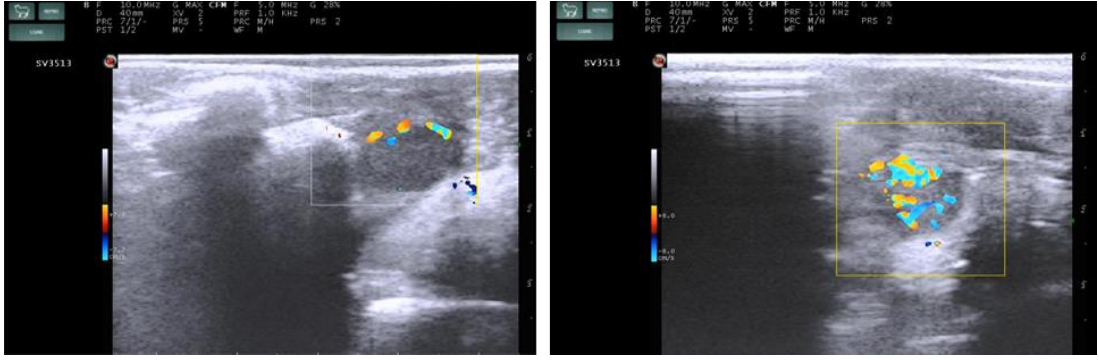
2.6. Ultrasonografik Görüntüleme ve Analiz

Ultrasonografik görüntülemeler 10 mHz prob ile (Esoate Mylab Vet One, İtalya) dişiler sırt üstü yatırılarak transrektal yol ile gerçekleştirilmiştir. Rektumdaki dışkının temizlenmesinin ardından B-Mode ultrasonografi sünger çıkarılmasını takiben 1 gün sonra ovaryum ve üzerindeki yapıları tanımlamak için kullanmıştır. Folikül çapları ImageJ programı ile ölçülmüş ve 5 mm üzeri ve altı olarak sınıflandırılmıştır (Bartlewski ve ark., 2011) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Foliküllerin ultrasonografi ile görüntülenmesi ve ölçümü

Korpus luteumun vaskülarizasyonu için power color Doppler modunda standart ayarlar kullanılarak eşzamanlı değerlendirmeler gerçekleştirilmiş ayrıca kaydedilen görüntüler ile bu değerlendirilmeler teyit edilmiştir (Şekil 2.5). Tohumlamadan 17 gün sonra ölçülen KL vaskülarizasyonu subjektif olarak %25 altı ve üstü olarak sınıflandırılmış, %25 üzerindeki gebe olarak kabul edilmiştir (Arashiro ve ark., 2018; Cosentino ve ark., 2019; Dal ve ark., 2019 ve Santos ve ark., 2020).



Şekil 2.5. Korpus luteumun ultrasonografi ile görüntülenmesi ve luteal vaskülaritenin değerlendirilmesi

2.7. Progesteron Analizi

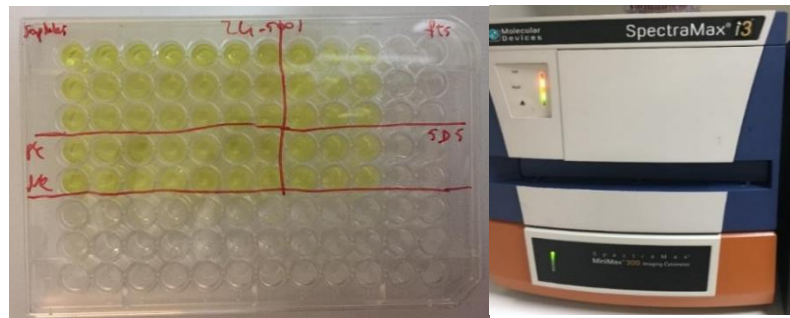
Progesteron analizleri için dişilerden tohumlama sonrası 6. ve 10. günlerde vena jugularisten alınan kan örneklerinin santrifüj sonrası serumları çıkarılmış, serumlar analizler gerçekleştirilene kadar -80°C 'de saklanmıştır. Analizler için koyun progesteron Elisa Kiti (Cat. No: EA0004Sh, BT Laboratuvarları, Çin Halk Cumhuriyeti) kullanılmıştır. Testin hassasiyeti $0,097\text{ ng/ml}$, deney içi ve deneyler arası varyasyon katsayısı sırasıyla %10 ve %12'nin altındadır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda, önceden monoklonal antikor ile kaplanan plate kuyucuklarına Progesteron standartları ve örnekler eklenmiştir. Devamında ise biotin-konjuge antijenler eklenerek inkübasyona bırakılmış, yıkama sonrasında Avidin-Hpr eklenerek yıkanmıştır. Devamında ise TMB Substratı ile renk oluşumu gözlenerek asidik durdurma solüsyonu ile reaksiyon durdurulmuş ve okumalar 450 nm dalga boyunda mikropłaka okuyucu ile gerçekleştirilmiştir (I3X SpectraMax, Amerika Birleşik Devletleri) (Şekil 2.6). Optik dansiteler standart eğrisi oluşturmak için kullanılmış ve bu eğri örneklerdeki progesteron miktarını belirlemede kullanılmıştır.



Şekil 2.6. Progesteron seviyelerinin belirlenmesi

2.8. β -NGF Dozunun Belirlenmesi

Spermaya katılacak β -NGF konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Buna göre sperm için non-toksik düzey, sperma kalite parametrelerinden canlılığın değerlendirildiği metil tiyazolil tetrazolyum (MTT) analizi ile belirlenmiştir (Şekil 2.7). MTT testi için; 100 μ l 96 well plate'e aktarılmış, Andromed sperma sulandırıcısı kullanılarak 1×10^7 sperm/ml konsantrasyonunda hazırlanan spermalar üzerine hazırlanan seri dilüsyonlarda (en az 7 konsantrasyonda ve her konsantrasyon üç tekrar olacak şekilde) β -NGF (rekombinant, insan, Cat No: 11050-HNAC Sino Biological, Çin Halk Cumhuriyeti) 20 μ l ilave edilmiştir. Numunelerin uygulanmasını takiben 24 saat sonra 15 μ l MTT çalışma solüsyonu eklenmiştir. İki saatlik inkübasyondan sonra mikroskopik inceleme yapılmıştır. Plateler, horizontal karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra (100 rpm, 10 dakika), optik dansiteleri mikroplaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda okunmuştur (I3X SpectraMax, Amerika Birleşik Devletleri) (Mosmann, 1983).



Şekil 2.7. Sitotoksisite testi ile B β -NGF'ün farklı dozlarında sperma canlılığın belirlenmesi

Numune uygulanan hücrelerdeki sitotoksosite % olarak ifade edilmiş ve uygulanmayan, %100 canlı kabul edilen pozitif kontrol grubu (Maksimal Canlılık, Max V) ile %0 canlı kabul edilen, Triton-X uygulanan negatif kontrol grubuna (Minimal Canlılık, Min V) göre verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır (Ulukaya ve ark., 2008). Sitotoksosite (%) = $[1 - (\text{test} - \text{Min V}) / (\text{Max V} - \text{Min V})] \times 100$.

Seçilen veriler arasındaki yüzde sitotoksosite değerlendirmesi ve ilgili ortalamanın standart hatası MS Excel (MS Office 2007) kullanılarak hesaplanmıştır. Konsantrasyon ve yüzde sitotoksosite değerleri ile regresyon eğrisi analizi Graph Pad® Prism 4.0 programı kullanılarak yapılmış ve en yüksek belirtme katsayısı (r^2) değerlendirmeye alınarak IC₅₀ hesaplanmasında kullanılacak olan eğrinin formülü belirlenmiştir.

2.9. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analize geçmeden önce, veriler parametrik test varsayımları için normallik yönünden Shapiro-Wilk, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelenmiştir. Tüm değişkenler için tanımlayıcı istatistikler hesaplanmıştır. Nicel değişkenler “Aritmetik ortalama ± Standart hata” ve nitel değişkenler “Yüzde-Frekans” şeklinde gösterilmiştir. Progesteron hormonunun 6. ve 10. günlerdeki seviyelerinin Senkronizasyon ve Sperma gruplarında farklılığının değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Sperma ve Senkronizasyon grupları ile 5 mm ve üzeri folikül varlığı, ovulasyon ve gebelik ilişkisi ki-kare testi ile incelenmiştir. Sperma ve Senkronizasyon gruplarının alt gruplarında 5 mm ve üzeri folikül varlığının ovulasyon ve ovulasyonun gebelik ilişkisi yine ki-kare testi ile kontrol edilmiştir. Tüm istatistiksel hesaplamalar minimum %5 hata payı ile incelenmiştir. SPSS 14.01 (Lisans No: 9869264) paket programından yararlanılmıştır. İlgili istatistiksel analizler için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı’ndan destek alınmıştır.

3. BULGULAR

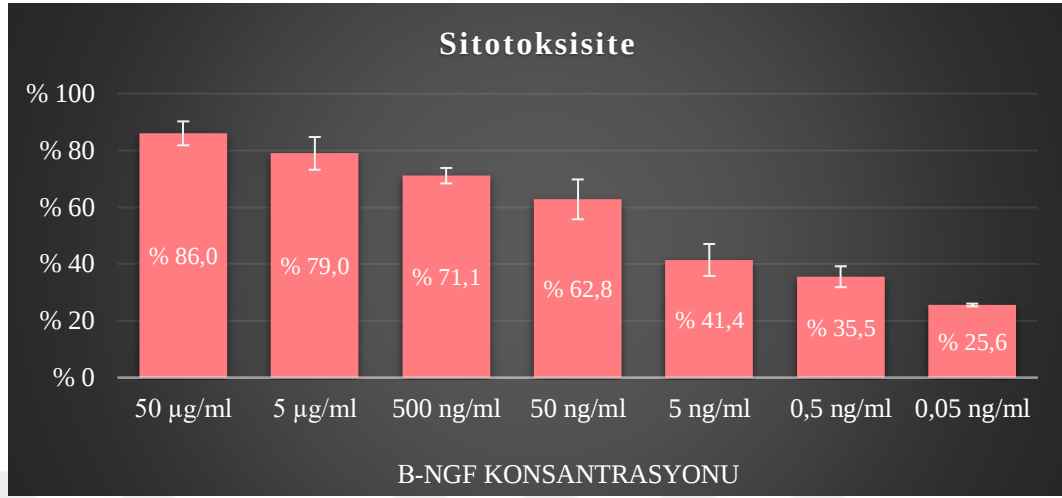
Koçların seçimine ait testiküler ölçümler ve spermatolojik muayene bulguları Çizelge 3.1’te verilmiştir. Yapılan muayeneler sonucu D koçunda bilateral testiküler şişlik gözlenmiş, E koçundan ise agresif mizacı nedeniyle suni vajen ile sperma alınamamıştır.

Çizelge 3.1. Koçlara ait ön muayene bulguları

Koç		A	B	C	D	E
Testiküler uzunluk (cm)	Sağ	16,5	16,4	15,4	23,0	15,9
	Sol	17,3	15,8	14,9	23,2	15,6
Testiküler derinlik (cm)	Sağ	6,8	7,5	6,5	8,1	7,2
	Sol	6,4	7,3	7,3	7,8	7,0
Testiküler genişlik (cm)	Sağ	8,0	8,4	6,8	7,0	8,3
	Sol	8,4	8,1	6,4	7,5	8,4
Skrotal çevre (cm)		30,0	33,5	29,5	34,1	33,0
Sperma miktarı (ml)		1,0	1,2	1,0		
Motil (%)		90	85	85		
Konsantrasyon (10^6 /ml)		2261	2045	2156		
pH		6,5-7	6,5-7	6,5-7		

Yapılan ön çalışma sonucu, β -NGF’ün 1×10^7 sperm/ml yoğunluğundaki sperma için IC_{50} konsantrasyonu 30 ng/ml olarak belirlenmiştir ($R^2 = 0,902$). Bundan yola çıkılarak spermaya ilave edilecek yüksek doz 5×10^8 sperm/ml konsantrasyon için 100 ng/ml, düşük doz ise 10 ng/ml olarak belirlenmiştir. Spermanın çeşitli konsantrasyonlarda B-NGF ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu gerçekleştirilen MTT analizi sonucu ilgili sitotoksosite değerleri Çizelge 3.2’de bildirilmiştir.

Çizelge 3.2. Çeşitli B-NGF konsantrasyonlarının 24. saat sitotoksitesi (Ortalama ± Standart Hata)



Her iki çalışma grubunun tohumlama gününde 3 adet koçtan 2’şer tekrarla alınan spermaların ortalama spermatolojik parametreleri Çizelge 3.3’de verilmiştir. Gerçekleştirilen pooling işlemi sonrası tohumlama dozu payette 250×10^6 motil sperm olacak şekilde ayarlanmıştır. Koçlardan elde edilen sperma miktarı, konsantrasyon, motilite ile anormal ve ölü spermatozoa oranı beklenen fizyolojik sınırlar içerisinde belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. I. ve II. çalışma paketi için alınan spermaların çeşitli spermatolojik parametre değerleri

Çalışma Paketi	Koç	Konsantrasyon (10^6 /ml)	Miktar (ml)	Motil (%)	Anormal (%)	Ölü (%)	pH
I. Senkronizasyon Grubu	A	2335,0	1,0	85	6	4	6,5-7
	B	2797,0	1,2	85	8	5	6,5-7
	C	2752,5	1,0	85	9	4	6,5-7
	Pool	2641,5	6,2	70	5	5	
II. Sperma Grubu	A	2757,5	1,0	90	6	8	6,5-7
	B	1619,0	1,3	85	4	8	6,5-7
	C	2996,5	1,1	85	7	8	6,5-7
	Kontrol	500,0	10,7	70	12	19	
	Düşük Doz	500,0	10,7	70	13	17	
	Yüksek Doz	500,0	10,7	70	12	11	

β -NGF'ün dişilere 100 μ g (Düşük Doz) ve 250 μ g (Yüksek Doz) i.m. yolla uygulanmasını içeren senkronizasyon gruplarında, β -NGF yerine %0,09 NaCl enjeksiyonu Kontrol olarak belirlenmiştir. Süngerin çıkarılmasından 24 saat sonra yapılan enjeksiyonları takiben 4-6 saat içerisinde ultrasonografi ile ovaryum üzerindeki yapılar belirlenerek folikül çapları ölçümü gerçekleştirilmiş, 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi yüzdesinin gruplar açısından değerdendirilmesi Çizelge 3.4'de sunulmuştur. Buna göre Kontrol grubunda 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişiler %60 oranında kalırken, Düşük Doz grubunda %70, Yüksek doz grubunda ise bu oran %80'e ulaşmıştır (p > 0,05). Tohumlamadan bir gün önce gerçekleştirilen ölçümlerde en büyük folikül çapı ortalaması ($\bar{X}$ +SS), Kontrol ve Düşük Doz ve Yüksek Doz grubunda sırasıyla 5,7 $\pm$ 0,17; 5,7 $\pm$ 0,11 ve 5,6 $\pm$ 0,08 mm olarak bulunmuştur. Ortalama folikül çapı ise Düşük Doz grubunda 5,0 $\pm$ 0,11 mm, Yüksek Doz grubunda 4,8 $\pm$ 0,10 mm ve Kontrol grubunda ise 4,4 $\pm$ 0,15 mm olarak ölçülmüştür.

Çizelge 3.4. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) için gruplar arası 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi varlığı yönünden değerdendirme.

I. Çalışma paketi (Senkronizasyon Grupları)	5 mm altı Foliküle sahip dişi (%)	5 mm ve üzeri Foliküle sahip dişi (%)	P
Kontrol (n=10)	40,0	60,0	> 0,05
Düşük Doz (n=10)	30,0	70,0	
Yüksek Doz (n=10)	20,0	80,0	

İlgili gruplar ovulasyon bakımından değerdendirildiğinde ise Düşük Doz ve Yüksek Doz gruplarında %80 oranıyla en yüksek sayıda dişide ovulasyon gözlemlenmiş, Kontrol grubunda ise bu oran %40 olarak belirlenmiştir (p > 0,05) (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) için gruplar arası dişilerin ovulasyon yönünden değerlendirilmesi.

I. Çalışma paketi (Senkronizasyon Grupları)	Ovulasyon Yok (%)	Ovulasyon Var (%)	p
Kontrol (n=10)	60,0	40,0	> 0,05
Düşük Doz (n=10)	20,0	80,0	
Yüksek Doz (n=10)	20,0	80,0	

Gebelik oranları değerlendirildiğinde ise en yüksek gebelik oranı %20 oranıyla Kontrol grubunda elde edilirken bunu %10 oranıyla Düşük Doz grubu takip etmiş, Yüksek Doz grubunda ise gebelik elde edilememiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) için gruplar arası gebelik yönünden değerlendirme.

I. Çalışma paketi (Senkronizasyon Grupları)	Gebelik (%)		p
	Boş	Gebe	
Kontrol (n=10)	80,0	20,0	> 0,05
Düşük Doz (n=10)	90,0	10,0	
Yüksek Doz (n=10)	100,0	0,0	

Grup içi 5 mm ve üzeri folikül varlığına göre gruplanan dişilerin ovulasyonu değerlendirildiğinde Kontrol grubunda 5 mm ve üzeri folikül ölçülen dişilerin %50'sinde ovulasyon gerçekleşmiştir ($p > 0,05$). Düşük Doz grubunda 5 mm ve üzeri folikül ölçülen dişilerin %85,7'sinde ovulasyon gerçekleşirken, ($p > 0,05$). Yüksek Doz grubunda bu oran %75 olarak belirlenmiş ve 5 mm altı folikül ölçülen tüm dişilerde ovulasyon gerçekleşmiştir ($p > 0,05$). Buna göre 5 mm ve üzeri folikül ölçülen dişiler arasında en yüksek ovulasyon oranı Düşük doz grubunda belirlenirken, bunu sırasıyla Yüksek Doz ve Kontrol grupları takip etmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) gruplarında dişilerin 5 mm ve üzeri folikül varlığına göre ovulasyon yönünden grup içi değerlendirilmesi.

I. Çalışma paketi (Senkronizasyon Grupları)			Ovulasyon (%)		p
			Yok	Var	
Kontrol (n=10)	5 mm ve üzeri Folikül Varlığı	Yok (n=4)	75,0	25,0	> 0,05
		Var (n=6)	50,0	50,0	
Düşük Doz (n=10)	5 mm ve üzeri Folikül Varlığı	Yok (n=3)	33,3	66,7	> 0,05
		Var (n=7)	14,3	85,7	
Yüksek Doz (n=10)	5 mm ve üzeri Folikül Varlığı	Yok (n=2)	0,0	100,0	> 0,05
		Var (n=8)	25,0	75,0	

Grup içi ovulasyon bakımından gebelik oranları değerlendirildiğinde ise Kontrol grubunda ovule olan dişilerin %50'sinde gebelik gözlemlenirken ($p > 0,05$) Düşük Doz grubunda ovule olan dişilerin %12,5'inde gebelik gözlemlenmiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. I. Çalışma paketi (Senkronizasyon grupları) gruplarında ovule olan dişilerin gebelik yönünden grup içi değerlendirilmesi.

I. Çalışma paketi (Senkronizasyon Grupları)		Gebelik (%)		p
		Boş	Gebe	
Kontrol (n=10)	Ovule olan dişi (n=4)	50,0	50,0	> 0,05
Düşük Doz (n=10)	Ovule olan dişi (n=8)	87,5	12,5	> 0,05
Yüksek Doz (n=10)	Ovule olan dişi (n=8)	100,0	0,0	-

II. Çalışma paketinde β -NGF'ün spermaya düşük ve yüksek dozlarda eklenerek tohumlamaların gerçekleştirilmesi sonucu elde edilen veriler, β -NGF içermeyen spermanın kullanıldığı Kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Buna göre 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişiler gruplar arası %73,3-86,7 aralığında belirlenmiştir (Çizelge 3.9). En büyük folikül çapı ortalaması $6,0 \pm 0,14$ mm bulunurken, ortalama folikül çapı $5,1 \pm 0,13$ mm olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.9. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) için gruplar arası 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi varlığı yönünden değerlendirme.

II. Çalışma paketi (Sperma Grupları)	5 mm altı Foliküle sahip dişi (%)	5 mm ve üzeri Foliküle sahip dişi (%)	p
Kontrol (n=15)	20,0	80,0	> 0,05
Düşük Doz (n=15)	26,7	73,3	
Yüksek Doz (n=15)	13,3	86,7	

İlgili gruplar ovulasyon bakımından değerlendirildiğinde Düşük Doz grubundaki dişilerin tamamında ovulasyon gözlemlenmiş, bunu %93,3 oranıyla Yüksek Doz grubu ve %86,7 oranıyla Kontrol grubu takip etmiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) için gruplar arası dişilerin ovulasyon yönünden değerlendirilmesi.

II. Çalışma paketi (Sperma Grupları)	Ovulasyon Yok (%)	Ovulasyon Var (%)	p
Kontrol (n=15)	13,3	86,7	> 0,05
Düşük Doz (n=15)	0,0	100,0	
Yüksek Doz (n=15)	6,7	93,3	

Sperma gruplarının gebelik oranları değerlendirildiğinde ise en yüksek gebelik oranı %73,3 oranıyla Düşük Doz grubunda elde edilirken bunu %66,7 oranıyla Yüksek doz grubu takip etmiş, Kontrol grubu ise %53,3 ile gebelik açısından en düşük başarıyı sağlamıştır ($p > 0,05$) (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) için gruplar arası gebelik yönünden değerlendirme.

II. Çalışma paketi (Sperma Grupları)	Gebelik (%)		p
	Boş	Gebe	
Kontrol (n=15)	46,7	53,3	> 0,05
Düşük Doz (n=15)	26,7	73,3	
Yüksek Doz (n=15)	33,3	66,7	

Grup içi 5 mm ve üzeri folikül varlığı bakımından ovule olan dişiler değerlendirildiğinde Kontrol grubunda 5 mm ve üzeri folikül ölçülen dişilerin %83,3'ünde ovulasyon gerçekleşirken 5 mm altında folikül ölçülen tüm dişilerde ovulasyon gerçekleşmiştir ($p > 0,05$). Düşük Doz grubunda dişilerin tamamında ovulasyon gerçekleşmiştir. Yüksek Doz grubunda 5 mm ve üzeri folikül ölçülen dişilerin %92,9'unda ovulasyon gerçekleşirken 5 mm altında folikül ölçülen tüm dişilerde ovulasyon gözlemlenmiştir ($p > 0,05$). Buna göre 5 mm ve üzeri folikül ölçülen dişiler arasında en yüksek ovulasyon oranı Düşük Doz grubunda görülürken bunu sırasıyla Yüksek Doz ve Kontrol grupları takip etmiştir (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) gruplarında dişilerin 5 mm ve üzeri folikül varlığına göre ovulasyon yönünden grup içi değerlendirilmesi.

II. Çalışma paketi (Sperma Grupları)			Ovulasyon (%)		p
			Yok	Var	
Kontrol (n=15)	5 mm ve üzeri Folikül Varlığı	Yok (n=3)	0,0	100,0	> 0,05
		Var (n=12)	16,7	83,3	
Düşük Doz (n=15)	5 mm ve üzeri Folikül Varlığı	Yok (n=4)	0,0	100,0	-
		Var (n=11)	0,0	100,0	
Yüksek Doz (n=15)	5 mm ve üzeri Folikül Varlığı	Yok (n=2)	0,0	100,0	> 0,05
		Var (n=13)	7,7	92,3	

Grup içi ovulasyon bakımından gebelik oranları değerlendirildiğinde Kontrol grubunda ovule olan dişilerin %61,5'inde gebelik gözlemlenirken ($p > 0,05$), Düşük doz grubunda ovule olan dişilerin %73,3'ünde ($p > 0,05$), Yüksek doz grubunda ise ovule olan dişilerin %71,4'ünde gebelik belirlenmiştir ($p > 0,05$). Buna göre ovule olan dişiler arasında en yüksek gebelik oranı Düşük Doz grubunda görülürken bunu sırasıyla Yüksek Doz ve Kontrol grupları takip etmiştir (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. II. Çalışma paketi (Sperma grupları) gruplarında ovule olan dişilerin gebelik yönünden grup içi değerlendirilmesi.

II. Çalışma paketi (Sperma Grupları)		Gebelik (%)		p
		Boş	Gebe	
Kontrol (n=15)	Ovule olan dişi (n=13)	38,5	61,5	> 0,05
Düşük Doz (n=15)	Ovule olan dişi (n=15)	26,7	73,3	-
Yüksek Doz (n=15)	Ovule olan dişi (n=14)	28,6	71,4	> 0,05

Çalışma paketlerinde, dişilerde tohumlama sonrası 6. ve 10. günde ölçülen serum progesteron seviyeleri bakımından ilgili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14. I. ve II. Çalışma paketi için tohumlama sonrası 6. ve 10. gün ölçülen serum progesteron seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart Hata)

Gruplar		Tohumlamadan sonra 6. gün Progesteron seviyeleri (ng/ml)	p	Tohumlamadan sonra 10. gün Progesteron seviyeleri (ng/ml)	p
Senkronizasyon Grupları	Kontrol (n=10)	1,34 $\pm$ 0,23	> 0,05	1,87 $\pm$ 0,43	> 0,05
	Düşük Doz (n=10)	2,01 $\pm$ 0,25		2,43 $\pm$ 0,32	
	Yüksek Doz (n=10)	1,90 $\pm$ 0,26		2,63 $\pm$ 0,36	
Sperma Grupları	Kontrol (n=15)	1,72 $\pm$ 0,21	> 0,05	3,06 $\pm$ 0,32	> 0,05
	Düşük Doz (n=15)	2,02 $\pm$ 0,15		3,44 $\pm$ 0,17	
	Yüksek Doz (n=15)	1,98 $\pm$ 0,29		3,14 $\pm$ 0,41	

I. ve II. çalışma paketlerinde 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi varlığı, ovulasyon, gebelik, 5 mm ve üzeri folikül varlığı bakımından ovulasyon ile ovule olan dişilerin gebelik oranları bakımından gruplar arası ve grup içi değerlendirmelerinde ve tohumlamadan sonra 6. ve 10. gүн progesteron seviyelerinin gruplar arası değerlendirmelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



4. TARTIŞMA

Biyoteknolojinin ilerlemesi ile proteomik çalışmalar yaygınlaşmış ve bunun sonucunda reproduksiyon alanındaki araştırmalar seminal plazma proteinlerinin tanımlanması ve bu proteinlerin işlevleri hakkında yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada evcil hayvanlarda seminal plazma proteinlerinden biri olan β sinir büyüme faktörünün koyunlara ekzojen olarak uygulanması ve koçların spermasına ilave edilerek gerçekleştirilen suni tohumlama uygulaması ile reproduktif etkileri 2 çalışma paketinde incelenmiştir.

İlk çalışma paketindeki tohumlamalardan önce 3 adet koçtan suni vajen yöntemiyle 2'şer tekrar ile alınan spermaların muayenesi gerçekleştirilmiş ve alınan 6 ejakülat a ait ortalama ($\pm$ standart sapma) değerler $1 \pm 0,2$ ml sperma miktarı, $2\,628 \pm 241,3 \times 10^6$ spermatozoa/ml konsantrasyon, %85 motilite, $\%8 \pm 1,4$ anormal spermatozoa ve $\%4 \pm 2,0$ ölü spermatozoa olmak üzere beklenen fizyolojik sınırlar içerisinde belirlenmiştir.

İkinci çalışma paketinde ise $1 \pm 0,1$ ml sperma miktarı, $2458 \pm 678,2 \times 10^6$ spermatozoa/ml konsantrasyon, %87 motilite, $\%5 \pm 1,5$ anormal spermatozoa ve $\%8 \pm 1,3$ ölü spermatozoa olmak üzere ilk çalışma paketi ile benzer spermatolojik değerler elde edilmiştir.

Koçlardan alınan sperma miktarı 0,9-1,9 ml aralığında (Aral, 1994; İnanç, 2016; Özkoca, 1984; Tekin ve ark., 1991; Uysal ve ark., 2003; Yavaş, 2008 ve Yeni ve ark., 2010), spermatozoa motilitesi %72,17-95,6 (Aisen ve ark., 2002; Aral, 1994; İnanç, 2016; Karagiannidis ve ark., 2000; Taşdemir ve ark., 2003; Tekin ve ark., 2006; Uysal ve ark., 2003; Yavaş, 2008 ve Yıldız, 2004), yoğunluğu ml için $1,7-3,6 \times 10^9$ (Günay ve ark., 2003; İnanç, 2016; İnce ve Karaca, 2009; Kaya ve ark., 1999; Tekin ve ark., 2006; Türk ve Demirci, 2005; Yılmaz, 2004), anormal spermatozoa oranı %2,68-19,62 (Aral, 1994; Günay ve ark., 2003; İnanç, 2016; İnce ve Karaca, 2009; Tekin ve ark., 2006; Türk ve Demirci, 2005; Uysal ve ark., 2003 ve Yavaş, 2008) ve ölü spermatozoa

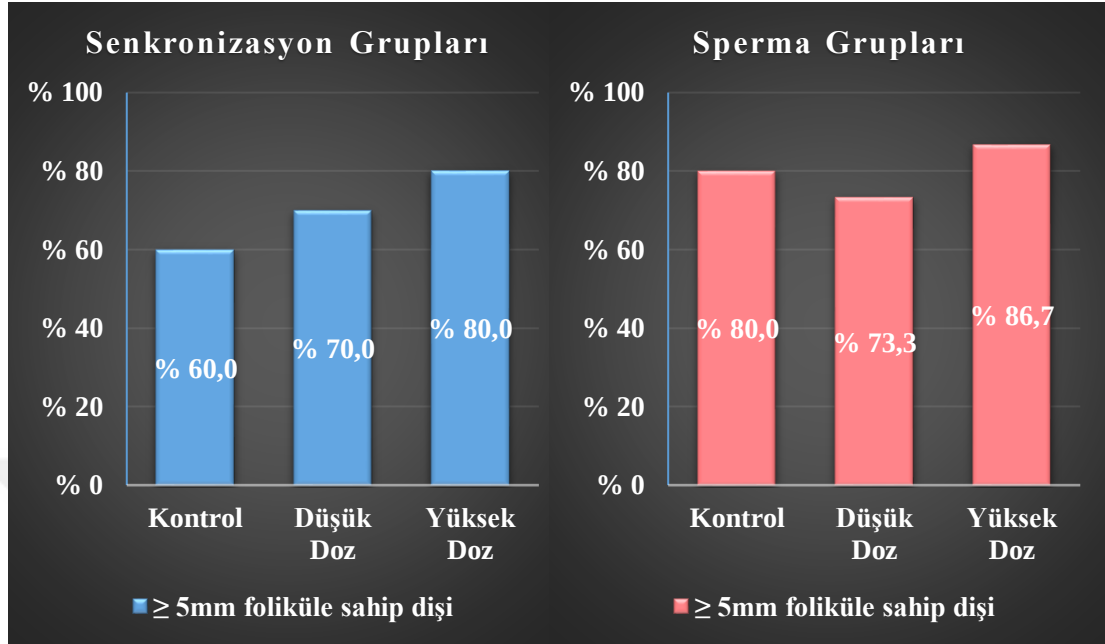
oranı %9,0-22,1 (İnanç, 2016; Tekin ve ark., 2006; Uysal ve ark., 2003 ve Yavaş, 2008) olarak bildirilmekte ve ırk, sezon, yaş, sperma alma yöntemi, beslenme ve bakım koşulları tarafından etkilenebilmektedir.

Spermaya eklenen iki farklı NGF dozu ile Kontrol grubunda 2 saatlik soğukta saklama sonrasında motil sperm %70, anormal ve ölü spermatozoa oranları sırasıyla %12-13 ve %11-19 aralığında belirlenmiştir. Yakın zamanda çeşitli hayvan türlerinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucu seminal plazma proteinleri ile erkek fertilitesi arasında ilişki olduğu ortaya çıkarılmıştır (Henault ve ark., 1995; Killian ve ark., 1993; Moura ve ark., 2006 ve Viana ve ark., 2008). Boğa spermasında NGF'ün spermatozoanın baş ve kuyruk bölgesinde lokalize olduğu, reseptörü Trk-A'nın ise akrozom, nükleus ve kuyruk bölgesinde bulunması, bu proteinin spermatozoa fonksiyonu üzerinde çeşitli etkilerinin olduğu hipotezini kuvvetlendirmektedir (Li ve ark., 2010a). Boğalarda spermatozoadaki NGF mRNA seviyesi (Kasimanickam ve ark., 2012) ve seminal plazmadaki NGF konsantrasyonu (Stewart ve ark., 2018) boğaya ait gebelik oranı ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanısıra spermatozoa NGF ekspresyonu sperma kalitesi yüksek olan boğalarda daha yüksek seviyede bulunmuş ve spermatozoanın mitokondriyal membran potansiyeli ile NGF ekspresyonu pozitif ilişki göstermiştir (Parthipan ve ark., 2017). Normozoospermik ve astenozoospermik insan spermasında ise 0,5 ng/ml NGF'ün kriyoprezervasyon medyumuna eklenmesinin spermatozoa viabilitesi ve motilitesini arttırdığı bildirilmiştir (Saeednia ve ark., 2015 ve Saeednia ve ark., 2016). Çözdürülmüş boğa spermasının 20, 80 ve 120 ng/ml NGF dozları ile iki saatlik inkübasyonu sonucu canlı spermatozoa oranı kontrole göre daha yüksek bulunmuştur (Li ve ark., 2010a). Ayrıca boğalarda NGF ekspresyonu, çözüm sonu LIN, VAP, STR ve VSL gibi spermatozoa kinetik parametreleriyle ilişkilendirilmiştir (Parthipan ve ark., 2017). Boğa sperması ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada, NGF 3 farklı dozda (0,5 ng/ml düşük doz; 5 ng/ml orta doz; 50 ng/ml yüksek doz) sperma sulandırıcısına eklenmiş ve kriyoprezervasyonu takiben çözüm sonu spermatolojik analizlerde canlı spermatozoa oranı, akrozom bütünlüğü ve DNA fragmentasyon indeksinde gruplar arası herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Progresif motilite, Yüksek ve Düşük doz grubunda, Kontrol ve Orta doz grubuna göre daha düşük bulunmuş, kinetik parametrelerden

VAP, VCL en düşük Yüksek doz grubunda gözlenirken, en yüksek Orta doz grubunda bulunmuş ($p < 0,04$), LIN değeri ise Yüksek doz grubunda en yüksek tespit edilirken, Düşük doz grubunda en düşük düzeyde kalmıştır ($p \leq 0,05$) (Stewart, 2019). Tavşanlarda ise sperma sulandırıcısına eklenen 100 ng /ml dozunda NGF'ün 30 dk inkübasyonu sonucu motilite, VCL ve viabilitiyi arttırdığı, nekrotik sperm yüzdesini de düşürdüğü bildirilmiştir. Reseptörlerinden TrkA'nın özellikle baş bölgesinde, p75NTR'nin ise orta kısım ve kuyrukta bulunduğunu, ilgili reseptörlerin bloke edilmesi sonuncu da sperm hızı, kapasitasyon ve apoptozun p75NTR reseptörü, motilite, canlı spermatozoa, nekroz ve akrozom reaksiyonunun ise TrkA reseptörü aracılığıyla düzenlendiği bildirilmiştir (Castellini ve ark., 2019). Spermanın kalitesinin belirlenmesinde temel hedef fertilizasyon, gebelik başarısının tahminine yöneliktir. Bu amaç için her ne kadar gün geçtikçe *in vitro* metotlar ve çeşitli testler geliştirilse de bu konuda en güvenilir ve nihai sonuç *in vivo* fonksiyonu ile fertilizasyon başarısının elde edilmesidir. İlgili çalışmada ise spermaya 10 ng/ml ve 100 ng/ml dozunda NGF ilavesinin sırasıyla % 73,3 ve %66,7 oranında tohumlama başarısı sağladığı, NGF kullanılmayan Kontrol grubundaki sperma ile gerçekleştirilen tohumlamalar sonucu ise gebeliğin %53,3 oranında kaldığı gözlemlenmiştir ($p > 0,05$).

β -NGF'ün dişilere 100 μ g (Düşük Doz) ve 250 μ g (Yüksek Doz) i.m. yolla uygulanmasını içeren senkronizasyon gruplarında β -NGF yerine %0,09 NaCl enjeksiyonu Kontrol olarak belirlenmiştir. İlgili gruplar arasında 5 mm ve üzeri folikül varlığı, ovulasyon veya gebelik açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p > 0,05$). Klinik açıdan değerlendirildiğinde ise 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi yüzdesi Kontrol grubunda en düşük seviyede kalmıştır. NGF gruplarında ise dozla birlikte artış gözlenerek PMSG uygulanan sperma gruplarına benzer yüzdelere ulaşmıştır (Çizelge 4.1). Ovulasyon bakımından NGF uygulanan dişilerin yüzdesi Kontrol grubundan daha yüksek olarak ve yine PMSG uygulanan Sperma gruplarına benzer oranda elde edilmiştir. Gebelik oranlarında ise beklenenin aksine Yüksek doz NGF grubunda gebelik elde edilememiş, Düşük doz ve Kontrol gruplarında bu oran sırasıyla %10 ve %20 olarak belirlenmiştir.

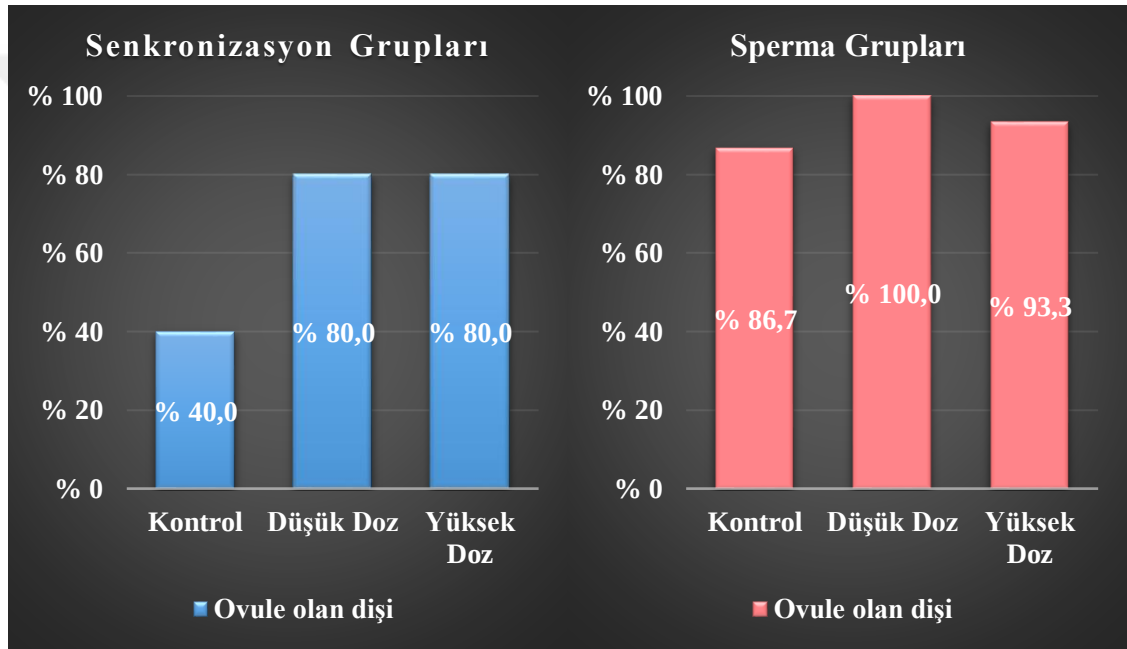
Çizelge 4.1. I. ve II. Çalışma paketi gruplarında 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi varlığı yönünden değerlendirme



İnek, koyun, keçi ve rat gibi çeşitli memelilerin ovaryum hücrelerinde NGF ekspresyonu belirlenmesi ve NGF sekresyonunun, gonotropin bağımlı artışı bu proteinin, oosit maturasyonunun düzenlenmesinde etkili olduğu görüşünü desteklemektedir (Jana ve ark., 2011 ve Mattioli ve ark., 1999). *In vitro* koşullarda 100 ng/ml NGF'ün kumulus genişlemesine neden olduğu ve koyunlarda gonotropik etkiyle, ovulasyona yakın bir zamanda gerçekleşen kumulus oosit ayrılmasına benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Barboni ve ark., 2002). Ayrıca sığır teka hücrelerinde NGF, HCG eklenen kontrole göre, folikülün yırtılarak ovule olmasına yardımcı olan prostaglandin E₂ sentezini, androstenediyon ile progesteron salınımı ve ayrıca teka proliferasyonunu arttırmıştır (Dissen ve ark., 2000 ve Tsafirri ve ark., 1972). Çeşitli çalışmalarda sünger çıkarılmasını takiben uygulanan PMSG'nin östrus ile ovulasyon arasındaki süreyi kısalttığını (Ali, 2007 ve Barrett ve ark., 2004), ayrıca uygulanmayan koyunlara göre daha yüksek oranda ovulasyon sağladığı bildirilmiştir (Boscov ve ark., 2002; Johnson ve ark., 1996 ve Luther ve ark., 2007). Tez çalışmasında ise 5 mm ve üzeri folikül varlığı ve ovulasyon oranı bakımından en düşük sonuçların Kontrol grubunda bulunması, NGF'ün doza bağlı bir şekilde PMSG benzeri etkinlik sağladığı görüşünü desteklemektedir (Çizelge 4.2). Ancak sabit zamanlı suni

tohumlama uygulaması sonrası karşılaştırılan gebelik oranlarında Yüksek Doz grubunda gebelik elde edilememesinin, NGF'ün ovulasyon dinamiklerini etkileyerek ovulasyon zamanında değişime neden olabileceğini düşündürmektedir. Senkronizasyonu takiben gerçekleşen ovaryan ve endokrin olayların zamanlaması değişmekte ve östrus senkronizasyon metodu başta olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir (Ali ve ark., 2009 ve Evans ve ark., 2004).

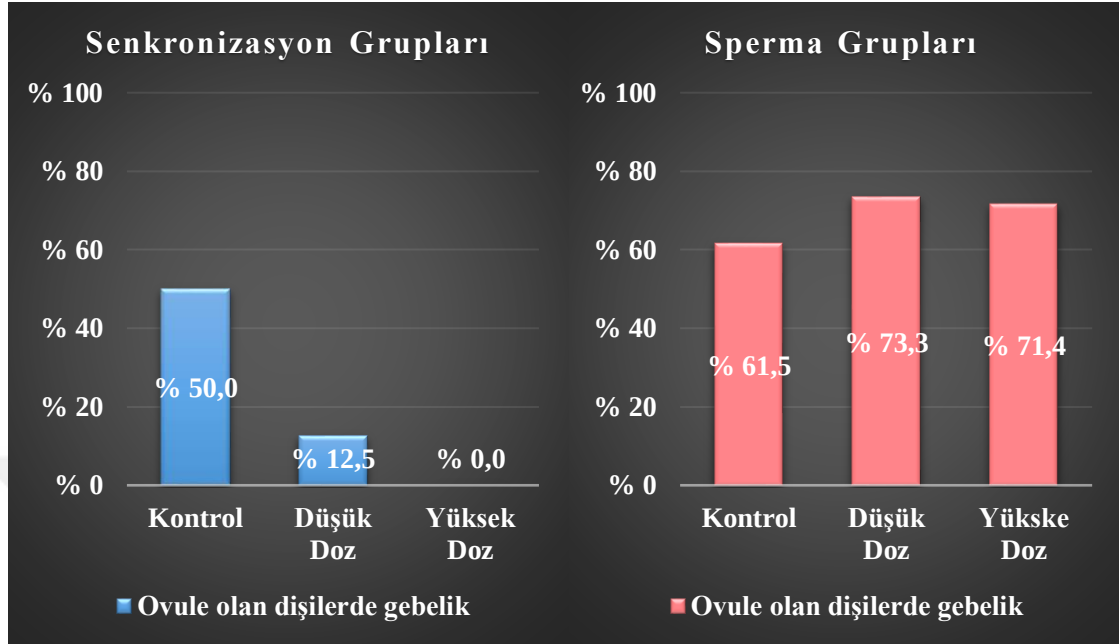
Çizelge 4.2. I. ve II. Çalışma paketi gruplarında ovule olan dişi yönünden değerlendirme



Senkronizasyon gruplarında yapılan çalışmada çapı 5 mm ve üzeri olan folikül varlığı bakımından ovulasyon oranları gruplar arası karşılaştırıldığında en yüksek ovulasyon Düşük doz grubunda elde edilirken bunu Yüksek doz ve Kontrol grupları takip etmiştir. NGF uygulanan gruplarda bu durum PMSG uygulanan sperma gruplarına benzer bir şekilde %75 üzerinde belirlenirken, senkronizasyon sonrası FTS uygulanan Kontrol grubunda ise %50 oranında kalmıştır (Çizelge 4.3). İlgi çeken bir şekilde, tohumlamadan bir gün önce senkronizasyon gruplarından Yüksek doz grubunda 5 mm altında ölçülen foliküllerden %100 oranında ovulasyon gerçekleşmiş aynı oran PMSG uygulanan sperma gruplarında da gözlemlenirken, bu durum Düşük doz grubunda ise %66,7, Kontrol grubunda ise %25 oranında belirlenmiştir.

Koyunlarda *in vitro* olarak gerçekleştirilen bir çalışmada orta-büyük foliküllerden NGF salınımının uyarılması için hem LH hem de FSH hormonu gerekliliği ortaya koyulmuştur. Ayrıca, orta-büyük çaptaki foliküllerin (4 mm) yüksek oranda NGF (240-250 ng/ml) içermekte olduğu, küçük foliküllerde (3 mm) ise NGF miktarının neredeyse saptanılmayan miktarda olduğu bildirilmiştir. Foliküllerin 12 saat süresince *in vitro* inkübe edilmesi ile orta-büyük foliküllerin NGF ürettiği ve bu üretimin folikül çapı ile orantılı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (Mattioli ve ark., 1999). NGF gruplarında ise PMSG uygulaması ile ekzojen olarak gonadotropin salınımı desteklenmeden kontrol grubundan daha yüksek ve PMSG uygulanan gruplara benzer oranda 5 mm ve üzerinde foliküle sahip ve ovule olan dişi gözlemlenmiştir. NGF'ün farklı hayvan türlerinde gonadotropik etkileri bildirilmiştir. Örneğin provoke ovulatör türlerde LH salınımını indüklerken ineklerde böyle bir etki gözlemlenmemiş (Bogle ve ark., 2012), ancak prepubertal düvelerde uygulama sonrası dolaşımdaki FSH konsantrasyonlarını arttırarak yeni bir foliküler dalga oluşumu hızlandırmış, pubertadaki düvelerde ise ovulasyonları senkronize ederek daha dar bir aralıkta gözlemlenmesine neden olmuştur (Tanco ve ark., 2012 ve Tribulo ve ark., 2015). Bunun yanı sıra rat, koyun, keçi ve insan antral foliküllerinde NGF tanımlanarak (Dissen ve ark., 1995; Mattioli ve ark., 1999; Ren ve ark., 2005 ve Seifer ve ark., 2006), steroid hormonların ve prostaglandinlerin ovaryan salınımını desteklediği bildirilmiştir (Dissen de ark., 2000; Romero ve ark., 2002 ve Salas ve ark., 2006). İnsanlarda FSH reseptörü ekspresyonunu ve granüloza hücrelerinin FSH duyarlılığını arttırmıştır (Salas ve ark., 2006). Sığırlarda yapılan bir başka çalışmada ise NGF'ün preovulatör folikül ile etkileşime geçerek vaskülaritesini ve ovulasyon süresince steroid hormon üretimini arttırarak, fonksiyonel ve vaskülarize bir korpus luteum oluşumuna yardımcı olduğu hipotezi test edilmiş bu amaçla saflaştırılmış sığır NGF'ün sığır preovulatör foliküllerde teka ve granüloza hücrelerinin kültür medyumuna eklenmesi sonucu bu hücreler üzerinde direkt etki göstererek testosteron üretimini uyardığını ve erken luteal gelişimde meydana gelen dokunun yeniden yapılanma sürecinin başlamasını hızlandırdığı ortaya konulmuştur (Stewart ve ark., 2020).

Çizelge 4.3. I. ve II. Çalışma paketi gruplarında ovule olan dişilerde gebelik yönünde değerlendirme



İkinci çalışma paketinde β -NGF'ün spermaya düşük ve yüksek dozlarda eklenerek rutin senkronizasyon yöntemi (Progesteron ve PMSG) takibinde tohumlama sonrası elde edilen veriler kontrol grubu (β -NGF ilave edilmeyen spermanın kullanıldığı) ile karşılaştırılmıştır. Tohumlamadan 24 saat önce 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi yüzdesi %73,3-86,7 aralığında ölçülmüştür. PMSG uygulaması içermeyen çalışmanın ilk paketinde ise bu parametre Kontrol grubunda %60'ta kalırken, NGF uygulanan gruplarda, PMSG uygulanan gruplara benzer şekilde %70-80 aralığına ulaşmıştır (Çizelge 4.1).

Sperma gruplarının incelendiği çalışmanın ikinci paketinde, PMSG uygulamasından 1 gün sonra ölçülen en büyük folikül çapı ortalama 6,0 mm bulunurken, ortalama folikül çapı 5,1 mm olarak tespit edilmiştir. PMSG uygulanmayan senkronizasyon gruplarında da benzer şekilde bu ölçümler en büyük folikül çapı ortalaması için 5,6-5,7 mm aralığında belirlenirken, ortalama folikül çapı 4,4-5,0 mm aralığında, belirlenmiştir. Dominant folikül çapı östrüstan 7 gün önceki dönem boyunca yüksek oranda bir değişim göstermezken, östrüsta ve özellikle de ovulasyon günü önemli boyutta artmaktadır (Lopez-Sebastian ve ark., 1997). Ayrıca

folikül sayısının ve boyutunun fertlitye etkilediği bildirilmiştir (Gonzalez-Bulnes ve ark., 2005b; Reyna ve ark., 2007). Neto ve ark. (2012), tarafından koyunlarda gerçekleştirilen bir çalışmada senkronizasyon protokolüne göre progesteron sonrası uygulanan PMSG veya FSH uygulanarak gruplandırılan hayvanların ölçülen folikül çapları strustan 48 saat önce sırasıyla 7,4 ve 7,3 mm olarak bildirilmiştir ($p > 0,05$). Uribe-Velásquez ve ark. (2002), 14 gün Progesteron ile 500 IU PMSG uygulaması sonucu ovulasyon günü folikül çapını 5,3 mm ölçerken, 9 gün ara ile çift doz $PGF_{2\alpha}$ uygulamasında bu ölçümü 4,3 mm olarak bildirmişlerdir ($p < 0,05$). Nakafeero, (2018) koyunlarda 14 gün veya 9 gün süre ile uygulanan progesteron sonrası PMSG veya ko etkisini karşılaştırdığı çalışmasında en büyük folikül çapını strustan 2 gün önce ölçerek gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamıştır ($p > 0,05$). PMSG uygulaması yapılan gruplarda folikül çapı 6,9 mm olarak ölçülürken ko etkisi ile senkronize edilen gruplarda bu değer 6,2 mm olarak ölçülmüştür. Progesteron içeren farklı senkronizasyon protokolleri uygulanan çalışmalarda folikül çapı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması tez çalışmasında da gruplar arası ölçülen benzer folikül çapı yanıtını desteklemektedir.

Her ne kadar sezon içinde sıklık koyun ve keçilerin snđerin çıkarılmasını takiben kısa süre içerisinde PMSG uygulaması ile desteklenmeden östrus göstermesi beklenilse de birçok araştırmacı tarafından PMSG'nin daha kompakt ve tahmin edilebilir östrus ve ovulasyonlarda önemi vurgulanmıştır (Cline ve ark., 2001, Knight ve ark., 1992 ve Koyuncu ve Altıcekic, 2010). Koyuncu ve Altıcekic (2010), 14 gün boyunca snđer ile senkronize edilen koyunlarda farklı zamanlarda uygulanan PMSG ve uygulanmayan Kontrol grubunda östrus görülme yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edememiş ($p < 0,05$), kuzulama oranında ise snđerin çıkarılmasını takiben uygulanan PMSG'nin kontrole göre üstünlük sağladığını bildirmişlerdir ($p > 0,05$). Cline ve ark., (2001) iki replikasyon ile 10 gün boyunca progesteron implantı uyguladıkları koyunlara implantın 6. günü $PGF_{2\alpha}$ uygulamış ve implantın çıkarılmasını takiben uygulanan 400 IU PMSG'nin 2 ml FTS enjeksiyonuna göre östrus başlangıç ve ovulasyon gerçekleşme süresini kısalttığını bildirmişlerdir ($p < 0,05$). İlgili araştırmaya göre ovulasyonlar kontrol grubunda 64-116. saatler aralığında ortalama 89. saatte gözlemlenirken, PMSG uygulanan grupta 60-96. saatler

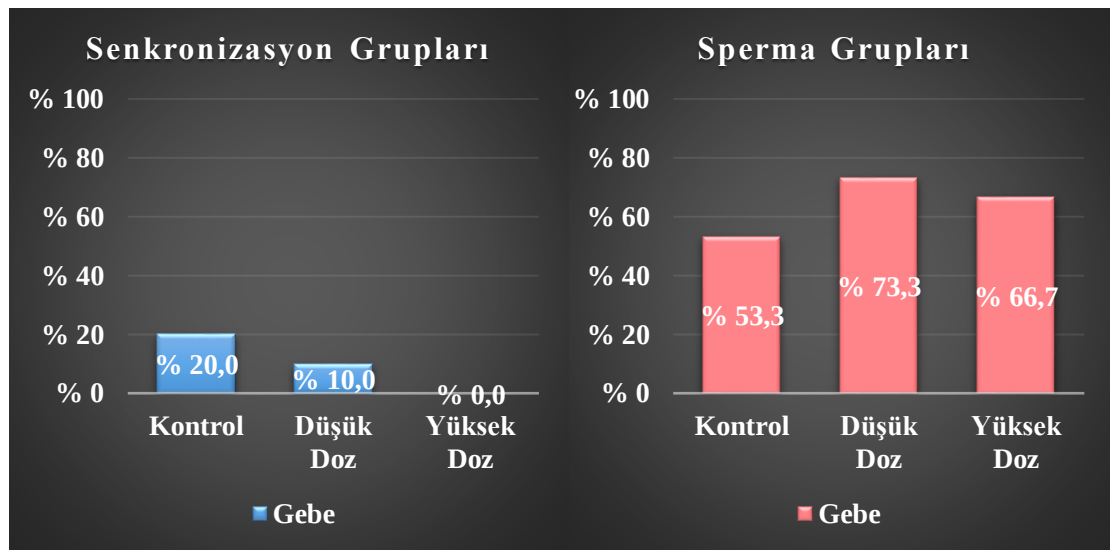
aralığında ortalama 76. saatte gözlemlenmiştir. Ancak ilgili deneyin ilk tekrarında, ovulasyon zamanı bakımından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir.

Sabit zamanlı suni tohumlama uygulamalarında, gonadotropin uygulaması, süngerin çıkarılmasından 48 saat önce yapıldığında ideal tohumlama zamanının 36-48. saatler olduğu, sünger çıkarılması ile eş zamanlı yapılan gonadotropin uygulamalarında ise 48. ve 60. saatler olduğu bildirilmiştir (Hristova ve ark., 2011). Tek bir tohumlamanın yapıldığı durumda ise süngerin çıkarılmasını takiben 55. saatin en uygun zaman olduğu bildirilmiştir (Abott ve ark., 2018 ve Cseh ve ark., 2012). Koyunların genital kanalında soğutulmuş spermanın taze spermaya göre daha yavaş ilerlediği (Fernández ve ark., 2001), ve çeşitli araştırmacılar tarafından taze sulandırılmamış sperma kullanımında ortalama %65 fertilite elde edilirken soğutulmuş sperma kullanıldığında ise bu oranın %40 civarında olduğu bildirilmiştir (Cueto ve Gibbons, 2010 ve Naim ve ark., 2009). Progesteron ile PMSG kombinasyonu uygulandığında, süngerin çıkarılmasını takiben 48 saat içinde koyunlarının çoğunun östrusta olduğu, ovulasyonun ise 60 saat içinde gerçekleştiği, servikal tohumlamaların ovulasyondan yaklaşık 12 saat önce, yani hormonal uygulamaları takiben 48 ve 54. saatlerde yapılması gerektiği önerilmiştir (Gibbons ve Cueto 1995). Naim ve ark., (2009), senkronize edilen koyunlarda servikal suni tohumlama yaptıkları araştırmasında süngerin çıkarılmasına takiben 200 IU PMSG uygulamış ve 54-56. saatlerde, 12 saat süreyle saklanan soğutulmuş sperma ile tohumladığı dişilerde 300 milyon sperma dozu kullanarak %38 gebelik başarısı elde etmiştir. De ve ark., (2015) ise farklı ırklardan 487 adet koyunun 12 gün sünger ile senkronizasyonu sonrası 200 IU PMSG uygulamış ve soğutulmuş sperma (100 milyon/doz) ile sabit zamanlı çift suni tohumlama uyguladıkları koyunlarda (48. ve 56. saat) senkronizasyon başarısını %79, kuzulama oranını ise %60 olarak bildirmişlerdir. Fernandez-Abella ve ark., (2003) nullipar 448 koyunda 14 gün süre ile progesteron içeren sünger uygulamış, devamında ise 24 saat soğutulmuş, 120 milyon sperm/dozu kullanarak süngerin çıkarılmasını takiben ovulasyonu PMSG ile desteklemeden 42, 46 ve 50 olmak üzere 3 farklı saatten birinde tohumlama gerçekleştirmiş, bunun sonucunda ise %36,5 %52 ve %45 oranında gebelik elde etmiştir.

Bunun yanısıra koyunlarda senkronizasyon protokollerindeki PMSG'nin dölverimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Örneğin Najafi ve ark., (2014) sezon içi 14 gün CIDR uygulaması sonrası 350, 450, 550 IU PMSG yapılan veya kontrol olarak FTS enjeksiyonu yapılarak çiftleştirilen koyunlarda östrus yanıtı bakımından herhangi bir fark gözlemlenmediği halde gebelik oranı kontrol grubunda (%65) diğer doz gruplarından (%85-95) daha düşük seviyede bulunmuştur ($p < 0,05$). Martinez-Ros ve ark., (2019), 14 gün boyunca CIDR uygulaması sonrası 400 IU PMSG uygulanan hayvanlarda ovulasyonu %100 oranında belirlerken PMSG uygulanmayanlarda ise bu oran %70'e düşmüştür. Koyuncu ve ark. (2000), ise üreme sezonunda progesteron içeren süngerin çıkarılmasını takiben uyguladığı 500 veya 700 IU PMSG dozları ile PMSG uygulanmayan grup arasında gebelik ve kuzulama oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bir başka çalışmada ise 8 gün sünger uygulanan koyunlarda süngerin çıkarılmasını takiben uygulanan 500 IU dozunda PMSG ile uygulanmayan kontrol grubunda dişilerin %83'ü ovule olmuş, süngerin çıkarılmasını takiben gruplarda sırasıyla 108 ve 124. saatlerde gerçekleşen ovulasyonların zamanlamasında ise istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir (Ali, 2007). Benzer şekilde 12 gün CIDR uygulanan hayvanlarda süngerin çıkarılmasını takiben 300 IU veya 400 IU PMSG uygulanan gruplar arasında östrus başlangıcı, gebelik oranı veya doğum oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Lopez-Garcia ve ark., 2021). Nosrati ve ark., (2011) ise 14 gün boyunca CIDR uygulanan hayvanlarda uygulama sonrası 300, 400, 500 ve 600 IU PMSG dozlarının etkinliğini karşılaştırmak amacıyla taze sperma ile servikal tohumladıkları dişilerde gebelik oranları bakımından anlamlı bir fark bulmaksızın %64-68 oranında gebelik elde etmişlerdir. Her ne kadar literatürde en etkili PMSG dozu hala tartışılmaya devam etse de standart olarak kabul edilen ve östrus senkronizasyon programlarında kullanılan dozun 400 IU olduğu (Abbott ve ark., 2018) ve bu doz ile östrus başlangıç zamanının daha senkronize gözlemlendiği, ayrıca ovulasyon oranında 0,5'lik bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Abbott ve ark., 2018). İlgili bu dozun düşürülmesi ise istenilmeyen üçüzlüklerin ve bunun yol açabileceği kuzu kayıplarının önüne geçilebileceği ancak dozun 300 IU altına düşürülmesinin önerilmediği bildirilmiştir.

Sperma gruplarındaki gebelikler ovulasyonlar göz önüne alınarak değerlendirildiğine, istatistiksel olarak bir fark bulunmaksızın spermaya NGF eklenen gruplarda (%71,4-73,3), Kontrol grubuna (%61,5) göre daha yüksek bulunmuştur ($p > 0,05$). Senkronizasyonunda PMSG uygulanmayan ilk çalışma paketi gruplarından Kontrol grubunda ise PMSG uygulanan sperma gruplarına benzer şekilde ovule olan dişilerin %50'si gebe kalırken Düşük doz grubunda bu oran %12,5'a düşmüştür (Çizelge 4.3). Sperma gruplarında ovule olan dişi yüzdesi ve gebelik oranları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmeksizin, Düşük Doz grubundaki dişilerin tamamında ovulasyon gözlemlenmiş, bunu %93,3 oranıyla Yüksek Doz grubu ve %86,7 oranıyla Kontrol grubu takip etmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek gebelik oranı %73,3 ile Düşük Doz grubunda elde edilirken bunu %66,7 oranıyla Yüksek doz grubu takip etmiş, Kontrol grubu ise %53,3 ile gebelik açısından en düşük başarıyı sağlamıştır (Çizelge 4.4). Bu oranların ilk çalışma paketindeki PMSG içermeyen NGF uygulama ve Kontrol gruplarındaki sonuçlardan daha yüksek olması, PMSG'nin sünger çıkarılmasını takiben 53-55. saatler arasında gerçekleştirilen sabit zamanlı suni tohumlama uygulamasında kritik öneme sahip olduğunu düşündürmekte, ancak ilerleyen çalışmalarda NGF uygulamasını takiben ovulasyon zamanının daha kesin sınırlarıyla belirlenerek tohumlamaların uygun saatler ile değiştirilmesi sonucu gebelik oranlarının artabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.4. I. ve II. Çalışma paketi gruplarında gebelik yönünden değerlendirme



Özetle, ilgili tez çalışmasında FTS enjeksiyonu yapılan Kontrol grubundaki düşük ovulasyon yüzdesine rağmen, ovulasyonu gerçekleştiren hayvanlarda, PMSG içeren sperma gruplarına benzer oranda gebelik elde edilmiştir. NGF enjeksiyonu yapılan gruplarda ise yüksek oranda ovulasyon sağlanmış ancak gebelik oranları daha düşük seviyede kalmıştır. Bu sonuçlar, NGF'ün ovulasyon zamanını değiştirmiş olabileceğini, sabit zamanlı suni tohumlama uygulamalarında kullanılması için de tohumlama saatinin, standartlaştırılacak uygulama dozuna göre belirlenmesi gerekliliği kanısını doğurmuştur.

Çalışmanın her iki paketinde de dişilerde tohumlama sonrası 6. ve 10. günde ölçülen serum progesteron seviyeleri bakımından ilgili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. Progesteron düzeyi aktif bir korpus luteum oluşuktan sonra, koyunlarda, ineklerden daha düşük düzeyde, 2,5-4 ng/ml aralığında seyretmektedir (Noakes ve ark., 2018). Senkronizasyon grubunda FTS uygulanan Kontrol grubunda 10.gün progesteron seviyesi 2,5 ng/ml altında kalırken diğer gruplarda ise beklenen fizyolojik aralıkta gözlemlenmiştir. Bu durum grup ortalamalarının ovule olmayan dişileri de içermesi ve bu grupta ovulasyon yüzdesinin diğer gruplara göre daha düşük kalması nedeniyle açıklanabilmekte, sadece ovule olan dişiler göz önünde bulundurulduğunda ise 10. gün progesteron seviyesi ortalamaları tüm gruplar için 2,5 ng/ml üzerinde seyretmektedir. Lamalarda seminal plazmanın intramusküler uygulanması sonucu ovulasyonun uyarılması ile plazma progesteron seviyelerinde artış ile korpus luteum çapında büyüme eğilimi gözlemlenmiştir (Adams ve ark., 2005). Ovulasyonu NGF ile indüklenen lamalarda GnRH ile indüklenenlere kıyasla ovulasyondan sonraki 4. ve 8. günlerde luteal vaskülaritede artış belirlenmiş ancak progesteron konsantrasyonlarında ve korpus luteum boyutunda herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir (Silva ve ark., 2017). Etçi sığırlarda NGF'ün tohumlama zamanı dişilere intramusküler yolla uygulanmasının korpus luteum fonksiyonunu ve bu sayede embriyo gelişimini etkileyebileceği hipotezi üzerine yapılan bir çalışmada senkronize edilen kontrol ve uygulama gruplarından kontrol grubuna tohumlama sonrası FTS uygulanırken diğer hayvanlara 296 µg NGF uygulanmış çeşitli aralıklarla korpus luteum boyutu ve plazma progesteron düzeyleri ölçülmüştür. Korpus luteum hacmi ve çapı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunamazken NGF uygulanan ineklerde tohumlama sonrası 14 ve 19. günler arasında belirgin bir plazma progesteron artışı gözlemlenmiş ($p < 0,05$), gebelik oranları ise NGF grubunda %75 iken kontrol grubunda %59 olarak belirlenmiştir ($p > 0,05$) (Stewart ve ark., 2018). Senkronize edilen sütçü pubertal düvelerde ise preovulatör folikül varlığında yapılan NGF enjeksiyonu sonucu korpus luteumun vaskülarizasyonunda herhangi bir değişim belirlenememekle birlikte çapında artış eğilimi gözlemlenmiş, luteal fazdaki progesteron seviyeleri NGF uygulanan gruplarda daha yüksek bulunmuştur (Stewart, 2019). Ovulasyonu $PGF_{2\alpha}$ ve LH ile indüklenen pubertal etçi düvelerde ise ovulasyondan sonra 4 saat içinde yapılan seminal plazma enjeksiyonun, LH uygulamasından 12 saat sonra yapılan seminal plazma enjeksiyonuna veya seminal plazma enjeksiyonu yapılmayan kontrol grubuna kıyasla luteal gelişimde bir fark belirlenemezken progesteron seviyesinde artış eğilimi gözlemlenmiştir (Tribulo ve ark., 2015). Bunun yanısıra dominant folikülün erken gelişim (3. gün), erken statik (6. gün) veya geç statik (9. gün) fazlarında, lama seminal plazmasından saflaştırılan NGF'ün pubertal düvelere enjeksiyonu ile kontrole göre korpus luteum çapında (3. ve 6. gün uygulanan NGF) ve plazma progesteron konsantrasyonlarında (6. ve 9. gün uygulanan NGF) artış gözlemlenmiştir (Tanco ve ark., 2012). Ayrıca matür sığır korpus luteumuna mikrodializ yöntemiyle 30 dakika boyunca NGF infüzyonu progesteron salınımını stimüle etmiştir (Miyamoto ve ark., 1992).

Kan progesteron seviyesinin düşüşüyle eş zamanlı olarak luteal vaskülarizasyon da düşmekte bu da lutelolizis sürecinin başladığını göstermekte ve dolayısıyla fertilizasyonun veya gebeliğin başarı ile sağlanamadığını belirtmektedir (McCracken ve ark., 1999). Koyunlarda luteolizis östrus siklusunun 13 ile 16. günleri arasında başlamakta (Zarco ve ark., 1988), luteolitik sürecin başlamasından itibaren 24 saat içinde luteal vaskülarizasyonda önemli bir düşüş görülmektedir.

Birçok türde güncel olarak gerçekleştirilen çalışmalarda, vaskülarizasyonun renkli Doppler aracılığıyla değerlendirmesinin, özellikle de erken gebelik dönemi için tanı sağlamakta olduğu bildirilmiştir (Arashiro ve ark., 2018; Balaro ve ark., 2017; Cosentino ve ark., 2018; Cosentino ve ark., 2019; Dal ve ark., 2019; Dubuc ve ark.,

2020; Figueira ve ark., 2015; Gallelli ve ark., 2020; Hassan ve ark., 2019; Samir ve Kandiel, 2019; Santos ve ark., 2020; Scully ve ark., 2015; Siqueira ve ark., 2013 ve Utt ve ark., 2009). Koyunlarda B-mode ultrasonografi ile gebelik tespiti en erken 25. günden itibaren mümkün olurken; luteal vaskülaritenin semikantitatif veya sübjektif değerlendirilmesiyle 17. günden itibaren belirlenebilmektedir (Arashiro ve ark., 2018; Cosentino ve ark., 2019; Dal ve ark., 2019 ve Santos ve ark., 2020).

Özellikle sağlık alanında kullanılan tanı yöntemlerinde, ROC analizi uygulanarak eğri altında kalan alan (AUC) değeri ile yöntemin performansı değerlendirilebilmekte, bu değer 0,5 ile 1 arasında testin ayırım gücüne göre değişiklik göstermektedir. İlgili değer 0,5-0,7 aralığında olması zayıf, 0,7-0,8 aralığında kabul edilebilir, 0,8-0,9 aralığında mükemmel, 0,9-1,0 aralığında yer alması ise tanı yönteminin olağanüstü bir ayırım gücüne sahip olduğunu göstermektedir (Dumlupınar, 2017).

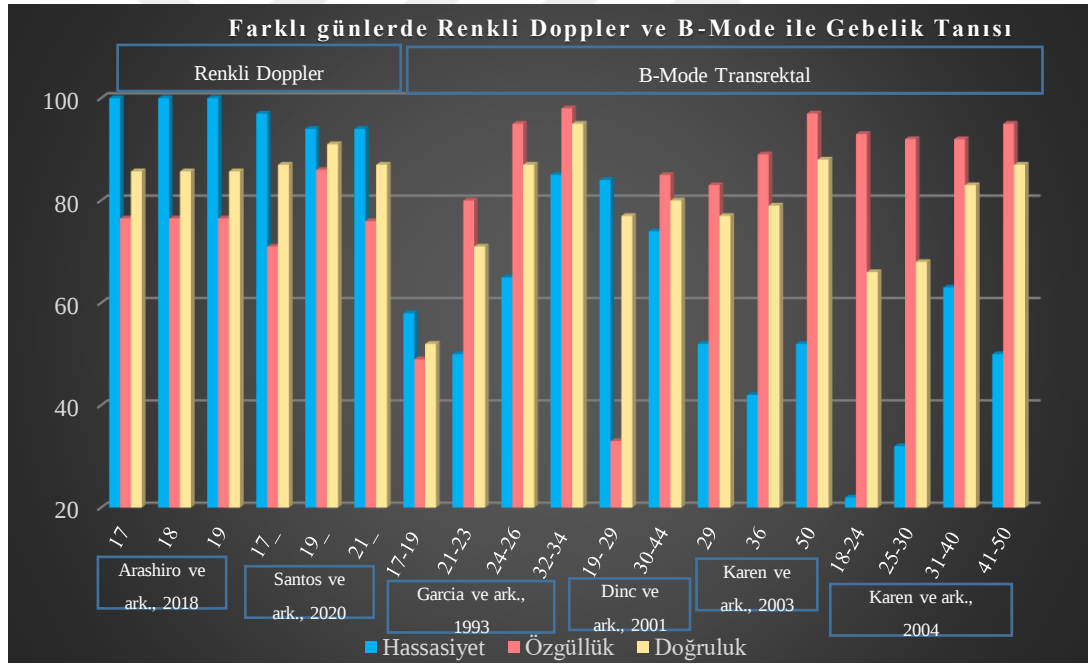
Arashiro ve ark. (2018), koyunlarda erken gebelik tanısını için korpus luteum vaskülarizasyonunun sübjektif değerlendirdiği çalışmada, gebe olmayan dişilerin renkli Doppler ultrasonografi ile çiftleşmeden 12-14 gün sonra değerlendirilmesinin, çoğu dişide hala vaskülarize bir korpus luteum bulunması (luteolizis öncesi dönem) nedeniyle işlevsiz olduğunu, ancak 15. günden itibaren renkli Doppler ile gebe olmayan hayvanların tanısının (negatif prediktif değer) %100 etkinlikle konulabildiğini (vaskülarizasyon %25 altı), özgüllüğün ise maksimum değerine 17. günden itibaren (hassasiyet: %100, özgüllük: %76,5, doğruluk: %85,7, AUC: 0,86) ulaştığını bildirmişlerdir. Korpus luteumun normal aktivitesi göz önünde bulundurulduğunda, 15. günden önce hiçbir operatör vaskülarizasyonu %25 altında bulmamıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise 17. gün vaskülarizasyonu değerlendirilen 178 koyunun gebelikleri 45. gün B-mode ultrasonografi ile karşılaştırılmış, buna bağlı olarak hassasiyet %93,5, özgüllük %80,8, doğruluk ise %87,8 olarak belirlenmiştir (Arashiro ve ark., 2018). Santa Ines ırkı 54 koyunda aynı yöntem ile değerlendirilen bir başka çalışmada ise 17. gün hassasiyetin %97'ye, özgüllüğün %71'e, doğruluğun ise %87'ye (AUC: 0,84) ulaştığı bildirilmiştir ve gebelik tanısı için etkili bir biçimde kullanılabildiği kanısına varmışlardır (Santos ve ark., 2020). Cosentino ve ark., (2019),

tekrarlı senkronizasyon uygulamalarında 186 koyunun erken gebelik tanısı için kullandıkları bu yöntem ile 17. gün belirledikleri gebe olmayan hayvanları tekrar senkronize ederek 59. gün B-mode ultrasonografi ile tekrar değerlendirmiş ve vaskülarizasyon ile gebe olarak belirleyip ileriki dönemde gebe olmayan az sayıda koyunun, gebeliğin 65.gününe kadar devam edebilen erken gebelik kaybindan (Dixon ve ark., 2007) kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu bağlamda koyunlarda çiftleşme sonrası 26-32. günler arası görülen erken embriyonik ölümlerin %17,2 oranında olduğu ancak koyunların stresli yönetime maruz kalması ile bu oranın %30'a kadar çıkabileceği bildirilmiştir (Diskin ve Morris, 2008 ve Doney ve ark., 1976). Dal ve ark. (2019), tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise korpus luteumu lize olan ve gebe olan koyunlarda, Doppler ultrasonografisi ile elde edilen görüntülerin analizi gerçekleştirilerek renkli piksel alanları ölçülmüş, 17. günden itibaren gebe olan hayvanlarda bu değer $0.42 \pm 0.019 \text{ mm}^2$ olarak ölçülürken, korpus luteumu lize olan dişilerde $0.32 \pm 0.028 \text{ mm}^2$ olarak ölçülmüştür ($p < 0,05$). 18 ve 19. günlerde ise aradaki fark artarak sırasıyla 21 ve 30 mm^2 değerine ulaşmıştır ($p < 0,001$). Ancak luteal vaskülarizasyonun subjektif olarak değerlendirilmesinin, ölçülen renkli piksel sayısı hesaplamasına kıyasla saha koşullarında daha uygun olması ve progesteron seviyeleri ve luteal fonksiyon bakımından benzer korelasyon göstermesi nedeniyle tercih edilebileceği vurgulanmıştır (Baloro ve ark., 2017). Etkili, hızlı ve gerçek zamanlı sonuçlar vermesi gibi saha koşullarında kullanım için gerekli kriterleri karşılayan subjektif değerlendirme ile çiftleşmeyi takiben 17. günde gebe olmayan hayvanların belirlenmesi bu hayvanların tekrar senkronizasyonu, tohumlamalar arasında geçen sürenin kısaltılması açısından avantaj sağlayabilmektedir. Elde edilen Doppler görüntülerinin ek analizleri aracılığıyla da sonuçların alınması mümkün görünse de temelde bu tekniğin uygulanabilirliğini kısıtlamakta ve gerçek zamanlı sonuçlar alınmasını engellemektedir. 3 boyutlu değerlendirmeler ve renkli piksel alanlarının yüzde ölçümü veya renkli piksellerin sayısının belirlenmesiyle de sonuçlara ulaşılabilirken (Figueira ve ark., 2015; Ginther ve ark., 2007; Ginther ve Utt, 2004 ve Herzog ve Bollwein, 2004), bu yöntemler çeşitli yazılımlara ihtiyaç duymakta ve görüntülerin ileri işleme prosedürü gerektirmesi nedeniyle gerçek zamanlı sonuç alınmasını engellemektedir. Ayrıca ineklerde tohumlama sonrası ilk 3 hafta boyunca luteal vaskülarite, progesteron seviyesi ve luteal çap ölçümlerinin gerçekleştirdiği bir

çalışmada ise luteal vaskülaritenin, gebe ve boş hayvanlar arasındaki luteal fonksiyon değişimini belirlemede, luteal çap ve progesteron ölçümüne kıyasla daha duyarlı bir parametre olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Hassan ve ark., 2019).

Bununla birlikte çeşitli araştırmalarda koyunlarda transrektal ultrasonografi ile gebeliğin tespit edilebilmesinde ilgili hassasiyet, özgüllük ve doğruluk değerleri doğum verileri göz önünde bulundurularak bildirilmiştir (Dinc ve ark., 2001; Garcia ve ark., 1993; Karen ve ark., 2003 ve Karen ve ark., 2004). İlgili değerler, renkli Doppler ultrasonografi ile elde edilen değerler ile karşılaştırması amacıyla Çizelge 4.5'te birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.5. Çeşitli çalışmalarda gebelik tanısı amacı ile kullanılan iki farklı yöntemle ait hassasiyet, özgüllük ve doğruluk oranları



Garcia ve ark., (1993), 17-26. günler arasında belirlenen gebeliğin hassasiyetinin %65 altında kaldığı özgüllüğün ise 24. günden sonra %85'e ulaştığı bildirilmiştir. Dinc ve ark. (2001) ise 19-29 günler arasında transrektal ultrasonografi ile gebelik tespitinin %88 oranında hassasiyete, %33 oranında özgüllüğe ve %77 doğrula sahip olduğunu, 30-44. günler arasında ise hassasiyetin %74 özgüllüğün %85 doğruluğun ise %80 olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Karen ve ark., (2003), 29, 36 ve 50. gün

gerçekleştirdikleri gebelik muayenelerinde hassasiyeti %42-52 aralığında özgüllüğü %83-97 ve doğruluğu %77-88 aralığında bulduklarını bildirmişlerdir. Gerçekleştirdikleri bir başka çalışmada ise 18-24 günler arasında hassasiyet %22, özgüllük %93 ve doğruluk %66 olarak belirlenirken, 25-30. günlerde hassasiyet %32'ye ulaşmış, 31-40. günlerde hassasiyet %63 iken doğruluk %83'e ve 41-50. günlerde hassasiyet %50 iken doğruluk %87'ye ulaşmıştır (Karen ve ark., 2004).

Tez çalışmasında da korpus luteum vaskülarizasyonu tohumlamadan sonraki 17. günde sübjektif olarak değerlendirilmiş vaskülarizasyonu %25 ve üzerinde bulunan hayvanlar gebe olarak sınıflandırılmıştır. Östrüstan 17 gün sonra belirlenebilen gebelik, gebe olmayan hayvanların transrektal klasik ultrasonografik görüntülemeye kıyasla 2 hafta kadar daha erken belirlenerek tekrar senkronizasyonu gibi daha yoğun reproduktif yönetim için stratejiler geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Arashiro ve ark., 2018; Cosentino ve ark., 2019 ve Jones ve Reed, 2017). Bunun yanı sıra renkli Doppler ultrasonografi sayesinde, tekrar östrus göstermenin güvenilirliğinin düşük olduğu sezon dışı senkronizasyon yöntemlerinde fayda sağlayabileceği düşünülmektedir (Ishwar, 1995). Ayrıca ilgili yöntemin tercihi ile suni tohumlama zamanı uygulanan NGF'ün suni tohumlama başarısı üzerindeki etkileri en erken dönemde ortaya konulabilmiş, bu sayede ileriki dönemlerde gebelik durumunu etkileyebilecek, genetik, hormonal, bakım-besleme, enfeksiyon ve çevresel stresler gibi faktörlere bağlı geç embriyonik dönemde meydana gelebilecek kayıpların (Fthenakis ve ark., 2012) çalışma sonuçları üzerindeki etkisi en aza indirilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlk çalışma paketinde Kontrol grubu 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişi yüzdesi, ovulasyon, 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişilerde ovulasyon oranı ile 6. ve 10. gün progesteron seviyesi bakımından en düşük değerleri sağlamıştır. Gebelik açısından değerlendirildiğinde ise Yüksek doz grubunda herhangi bir gebelik elde edilememiş, Kontrol ve Düşük doz gruplarında ise bu oran sırasıyla %20 ve %10 olarak belirlenerek ilgili araştırmanın PMSG uygulanan Sperma gruplarından daha düşük bir seviyede olduğu gözlemlenmiştir. 5 mm ve üzeri folikül varlığı bakımından en yüksek değer Yüksek Doz grubunda görülürken, ovulasyon bakımından ise Düşük ve Yüksek doz grupları Kontrol grubuna üstünlük sağlamıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Fakat elde edilen verilerin klinik açıdan önemli veriler olduğu düşünülmektedir. Çalışma gruplarındaki hayvan sayılarının artırılması ile istatistiksel açıdan karşılaşılan bu durumun değişebileceği düşünülmektedir.

İkinci çalışma paketinde ön çalışma ile gerçekleştirilen sitotoksosite değeri belirlenmiş buna göre spermaya 10 ng/ml ve 100 ng/ml olmak üzere iki farklı dozda ilave edilen β -NGF'ün çeşitli etkileri NGF ilavesi olmayan Kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Düşük Doz grubu ovulasyon, gebelik, 5 mm ve üzeri foliküle sahip dişilerde ovulasyon, ovule olan dişilerde gebelik oranı ile 6. ve 10. günlerde progesteron seviyeleri bakımından en yüksek değerleri sağlamıştır. Kontrol grubunda ise tüm bu değerlendirilen parametreler bakımından en düşük sonuçlar elde edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Elde edilen veriler β -NGF'ün sperm prezervasyon ve suni tohumlama protokollerine adaptasyonunun araştırılabilmesi yönünde temel sağlamıştır.

Sonuç olarak koyunlarda β -NGF uygulamasının 10-100 ng/ml dozunda spermaya katılmasının olumlu etki yaratabileceği, ancak sabit zamanlı suni tohumlama uygulamasında dişilerin senkronizasyon programında PMSG hormonu yerine uygulanmasının özellikle gebelik açısından beklenen yeterli başarıyı sağlamadığı görülmüştür. Ancak bu sonuçların daha çok hayvan ile tekrarlanması ve koyunlarda β -

NGF'ün moleküler etki mekanizmasının daha derin olarak araştırılması gerektirmektedir. Elde edilen bu sonuçlar, β -NGF'ün sperm kriyoprezervasyon protokollerine adaptasyonu ile elde edilecek fertilizasyon başarısının araştırılması yönünde temel sağlamıştır. Ayrıca spermanın soğutularak uzun süreli saklanmasıyla ilgili çalışmalar için de bir ön basamak olmuştur. Bunun yanısıra koyunlarda senkronizasyon protokollerinde sıklıkla kullanılan ancak yüksek doz ve uzun süreli tekrarlı kullanımlarında çeşitli yan etkilerin görüldüğü PMSG hormonu bakımından, β -NGF dozlarının gebelik oranı haricinde kontrole sağladığı üstünlük göz önünde bulundurularak PMSG ile beraber kullanım olanağı ve bu sayede gerekli PMSG dozunun düşürülebilmesi bağlamında yeni araştırmaların dizaynına olanak sağlamıştır.

ÖZET

β -NGF'ün Koyunlarda Ovulasyon Mekanizması ve Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi

Bu araştırmada seminal plazmada halihazırda mevcut olan proteinlerden biri olan β sinir büyüme faktörünün (β -NGF) ekzojen olarak dişilere uygulanması ve spermaya ilavesinin koyunlarda fertilité üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Araştırma kapsamında 75 baş Akkaraman koyunu ve 3 baş Akkaraman koç kullanılmıştır. Araştırma iki çalışma paketine ayrılarak ilk çalışma paketinde (Senkronizasyon grupları) 30 adet dişiye 12 gün süre ile progesteron hormonu içeren intravaginal süngerler (medroksiprogesteron asetat) uygulanmış ve takibinde 13. gün 20 adet dişiye β -NGF enjeksiyonu 250 μ g (n = 10) veya 100 μ g (n = 10) dozunda i.m. olarak uygulanmıştır. Kontrol grubundaki (n = 10) dişilere ise β -NGF enjeksiyonu yerine i.m. olarak 1 ml %0,09'luk NaCl enjeksiyonu yapılmıştır. İkinci çalışma paketi (Sperma grupları) için, 45 koyuna 12 gün süre ile vajinal sünger uygulanmış ve 12. süngerler çıkarılırken 350-400 IU i.m. PMSG (gebe kısarak serum gonodotropin) enjeksiyonu yapılmıştır. 3 adet koçtan tohumlama günlerinde alınan spermalar pooling yöntemi ile birleştirilerek payette 250 milyon motil spermatozoa olacak şekilde dozlanmış ve ilk çalışma paketi için β -NGF ilavesi olmadan, ikinci çalışma paketi için üç alt gruba bölünerek, kontrol grubu (n = 15) için sadece sulandırıcı içeren medyum kullanılarak, diğer iki grup olan yüksek doz ve düşük doz grupları (n = 15, n = 15) için; ön çalışma ile belirlenen 10 ng/ml ve 100 ng/ml dozunda β -NGF, 500 $\times 10^6$ sperm/ml dozunda sulandırılmış spermaya ilave edilmiştir. Her iki çalışma paketi için de hazırlanan payetler soğutulularak ilk 3 saat içerisinde kullanmak üzere, toplam 75 baş koyunun tohumlaması, süngerlerin çıkarılmasından itibaren 53-55. saatleri aralığında servikal metot ile gerçekleştirilmiştir. Senkronizasyonun 13. gününde tüm dişilerin ultrasonografik muayeneleri yapılarak ovaryum üzerindeki foliküller belirlenmiş ve ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca tohumlamadan sonra 17. günde korpus luteum vaskülarizasyonları ultrasonografi ile görüntülenerek gebelik tespiti yapılmıştır. Tohumlama sonrası 6. ve 10. günlerde serum progesteron düzeyleri Elisa test kiti ile belirlenmiştir. Araştırmada her iki çalışma paketi için de değerlendirilen parametrelerden elde edilen veriler, senkronizasyon gruplarında 5 mm ve üzeri çapa sahip folikül varlığı, ovulasyon, 6. ve 10. gün serum progesteron seviyeleri bakımından en düşük sonuçlar Kontrol grubunda elde edilirken, Yüksek doz grubunda gebelik elde edilmemiş, Düşük Doz grubunda %10, Kontrol grubunda ise %20 oranında kalmıştır. Sperma gruplarında ise ilgili tüm parametreler en yüksek Düşük doz grubunda belirlenirken, en düşük olarak Kontrol grubunda elde edilmiştir. Gruplar arası değerlendirilen parametreler bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiş (p > 0,05) ve veriler klinik olarak önemi açısından değerlendirilmiştir. Sonuç olarak koyunlarda β -NGF'ün spermaya katılmasının olumlu etki yaratabileceği, ancak dişilerin senkronizasyon programında PMSG hormonu yerine uygulanmasının gebelik bakımından yeterli başarıyı sağlamadığı görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, β -NGF'ün sperm kriyoprezervasyon ve çeşitli senkronizasyon protokollerine adaptasyonunun araştırılabilmesi yönünde temel sağlamıştır.

Anahtar Sözcükler: β sinir büyüme faktörü, koyun, senkronizasyon, suni tohumlama, vaskülarizasyon.

SUMMARY

The effect of β -NGF on Ovulation Mechanism and Semen Quality in Sheep

The aim of this research was to evaluate the effect of exogen treatment of B nerve growth factor (β -NGF), which is one of the naturally present proteins in seminal plasma, both as administration to females and additive to semen on fertility in sheep. Within the scope of the research, 75 White Karaman sheep and 3 White Karaman rams were used. The research was divided into two study packages and in the first study package (Synchronization groups), 30 females were treated with intravaginal sponges (medroxyprogesterone acetate) for 12 days and β -NGF injection was administered to 20 ewes on the 13th day ($n = 10$) at a dose of 250 μg ($n = 10$) or 100 μg ($n = 15$) intramuscularly. Ewes in the control group ($n = 15$) received 1 ml of 0.09 %NaCl injection i.m. For the second study package (Semen groups), 45 sheep were treated with a vaginal sponge for 12 days and 350-400 IU i.m. PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) injection was administered at the sponge removal. The semen was collected from 3 rams on the insemination days, pooled and dosed to 250 million motile spermatozoa in the straw. For the second study package, following the pooling the semen was divided into three subgroups, containing only diluent for the control group ($n = 15$) and for the other two subgroups, two different β -NGF doses determined by the preliminary study, at the dose of 10 ng/ml (Low dose) and 100 ng / ml (High dose) groups ($n = 15$, $n = 15$) were added to the diluted semen at a dose of 500×10^6 sperm/ml. The straws prepared for both study packages were cooled and used for inseminations within the first 3 hours. The inseminations were carried out transcervically at 53-55 hours following the sponge removal. On the 13th day of synchronization, ultrasonographic examinations of all females were performed and the follicles on the ovaries were determined and measured. In addition, on the 17th day after insemination, the vascularization of the corpus luteum was evaluated by ultrasonography and pregnancy was determined. Serum progesterone levels were determined by Elisa test kit on the 6th and 10th days after insemination. According to the data obtained from the parameters evaluated for both study packages, the lowest results obtained in the presence of follicles with a diameter of 5 mm and above, ovulation and serum progesterone levels on the day 6 and 10 post-insemination were in the Control group, while no pregnancy was obtained in the High dose group and the pregnancies were 10% and 20% in the Low dose and Control group respectively. In the semen groups, the highest parameters were obtained in the Low Dose group whereas the lowest were obtained in the Control group. No statistically significant difference was found between the groups ($p > 0.05$) and the data was evaluated in terms of clinical significance. As a result, it was observed that the addition of β -NGF to semen may have a positive effect in sheep, however, implantation of β -NGF to the synchronization program instead of PMSG hormone did not provide the expected success in terms of pregnancy outcome. These results provided the basis for investigating the adaptation of β -NGF to sperm cryopreservation and synchronization protocols.

Keywords: Artificial insemination, β nerve growth factor, ewe, synchronization, vascularization.

KAYNAKLAR

- ABAD M, GARCÍA JC, SPRECHER DJ, CASSAR G, FRIENDSHIP RM, BUHR MM, KIRKWOOD RN (2007). Effect of insemination-ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. *Reprod. Domest. Anim.* **42**: 418-422.
- ABBOTT K, HYND P, DE GRAAF S, LEAHY T, LARSEN J (2018). Controlled breeding. In: The Practice of Sheep Veterinary Medicine. University of Adelaide Press. 238–264
- ABECIA J, FORCADA F, GONZÁLEZ-BULNES A (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130**: 173-179.
- ABECIA JA, FORCADA F, GONZÁLEZ-BULNES A (2011). Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, **27**: 67-79.
- ADAMS GP, RATTO MH, HUANCA W, SINGH J (2005). Ovulation inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction*, **73**: 452–457.
- ADAMS GP, RATTO MH, SILVA ME, CARRASCO RA (2016). Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) in seminal plasma: a review and update. *Reproduction in Domestic Animals*, **51(2)**: 4-17.
- AHN JY, KANG L, KIM H, KANG H, KIM S, KIM J, KIM SK, WANG K, CHO BK, WOO K, LEE ROH J, KIM M (2005). Induction method of tyrosine kinase A-mediated cell death in rat pheochromocytoma. *Biotechnol Lett*, **27**: 583-7.
- AISEN EG, MEDIANO VH, VENTURINO A (2002). Cryopreservation and post-thawed of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*, **57**: 1801-1808.
- AK K (2008). Koyunlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. In: Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama, Ed.: İleri, K, Ak, K, Pabuccuoğlu, S, Birler S, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Masaüstü Yayıncılık Ünitesi, İstanbul. 189-203.
- ALAÇAM E (1993). Koyunlarda siklik düzen ve üremenin denetlenmesi. *Hay Araş Derg*, **3**: 65-69
- ALİ A (2007). Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. *Small Ruminant Research*, **72(1)**: 33-37.
- ALİ A, HAYDER M, SAIFELNASER E (2009). Ultrasonographic and endocrine evaluation of three regimes for oestrus and ovulation synchronization for sheep in the subtropics. *Reproduction in Domestic Animals*, **44**: 873-878.
- ALLAİ L, DRUART X, CONTELL J, LOUANJLİ N, MOULA AB, BADİ A, EL AMİRİ B (2015). Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk based extenders. *Animal reproduction science*, **160**: 57-67.
- ALLEN WR, MOOR RM (1972). The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J Reprod Fertil* **29(2)**: 313-316.
- ALOE L, ROCCO ML, BIANCHI P, MANNI L. (2012). Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of Translational Medicine*, **10(1)**: 239.

- ANGELETTI RH, BRADSHAW RA. (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **68(10)**: 2417-2420.
- APÍCHELA SA, ARGANARAZ ME, GIULIANO S, ZAMPINÌ R, CARRETERO I, MİRAGAYA M, MÍCELİ DC (2014). Llama oviductal sperm reservoirs involvement of bulbourethral glands. *Andrologia*, **46**: 290-295.
- ARAL F (1994). Koçlarda sperma kalitesi üzerine mevsimin etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara
- ARASHİRO EKN, UNGERFELD R, CLARİGET RP, PÍNTO PHN, BALARO MFA, BRAGANÇA GM, BRANDÃO FZ (2018). Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularisation using colour Doppler ultrasonography. *Theriogenology*, **106**: 247-252.
- ARSOY D, SAĞMANLIGİL V (2018). Reproductive cycles in white Karaman ewes: comparison of ovarian hormone secretion and reproductive behavior in non-pregnant and pregnant ewes in semi-intensive conditions. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, **40**: e39908
- AYER-LELIEVRE C, OLSON L, EBENDAL T, HALLBÖÖK F, PERSSON H. (1988). Nerve growth factor mRNA and protein in the testis and epididymis of mouse and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85(8)**: 2628-2632.
- BALARO MFA, SANTOS AS, MOURA LFG, FONSECA JF, BRANDÃO FZ (2017). Luteal dynamic and functionality assessment in dairy goats by luteal blood flow, luteal biometry, and hormonal assay. *Theriogenology*, **95**: 118-126.
- BARBONİ B, MATTIOLİ M, GIOIA L, TURRIANI M, CAPACCHIETTI G, BERARDINELLI P, BERNABÒ N (2002). Preovulatory rise of NGF in ovine follicular fluid: possible involvement in the control of oocyte maturation. *Microscopy research and technique*, **59(6)**: 516-521.
- BARİL G, LEBOEUF B, SAUMANDE J. (1993). Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*, **40**: 621-628.
- BARİL G, REMY B, LEBOEUF B, BECKERS JF, SAUMANDE J (1996). Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*, **45**: 1553-1559.
- BARİL G, REMY B, VALLET JC, BECKERS JF (1992). Effect of repeated use of progestagen-PMSG treatment for estrus control in dairy goats out of breeding season. *Reprod Domest Anim*, **27**: 161-168.
- BARRETT D, BARTLEWSKI P, BATISTA-ARTEAGA M, SYMINGTON A, RAWLINGS N (2004). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology*, **6**: 311-327.
- BARTLEWSKI P, BEARD A, COOK S, CHANDOLIA R, HONARAMOOZ A, RAWLINGS N (1999a). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Journal of Reproduction and Fertility*, **115**: 111-124.
- BARTLEWSKI P, BEARD A, RAWLINGS N (1999b). An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology*, **52**: 115-130.

- BARTLEWSKI PM, BABY TE, GIFFIN JL (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, **124**: 259-268.
- BAVISTER BD, DEES C, SCHULTZ RD (1986). Refractoriness of rhesus monkeys to repeated ovarian stimulation by exogenous gonadotropins is caused by non precipitating antibodies. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, **11**: 11-16.
- BEARDEN H, FUQUAY J (1992). *Applied Animal Reproduction*, New Jersey, Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- BISTER JL, NOEL B, PERRAD B, MANDIKI S, MBAYAHAGA J, PAQUAY R (1999). Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Domestic Animal Endocrinology*, **17**: 315-328.
- BOGLE OA, RATTO MH, ADAMS GP (2012). Ovulation-inducing factor (OIF) induces LH secretion from pituitary cells. *Animal Reproduction Science*, **133**: 117-122.
- BONEV G (2003). Biotechnological methods for improving reproductive efficiency in different sheep breeds. Doktora Tezi. Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria.
- BOSCOS C, SAMARTZI F, DELLIS S, ROGGE A, STEFANAKIS A, KRAMBOVITIS E (2002). Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. *Theriogenology*, **58**: 1261-1272.
- BRAGANÇA GM, BALARO MFA, FONSECA JF, PÍNTO PHN, ROSA RM, RIBEIRO LS, ALMEIDA MS, SOUZA FABJAN JMG, GARCÍA AR, BRANDAO FZ (2016). Doppler ultrasound in the diagnosis of early pregnancy in sheep. *Anim Reprod*, **13**: 587
- BRUNO-GALARRAGA M, CANO-MORENO V, LAGO-CRUZ B, ENCINAS T, GONZALEZ-BULNES A, MARTINEZ-ROS P (2021). The Use of hCG for Inducing Ovulation in Sheep Estrus Synchronization Impairs Ovulatory Follicle Growth and Fertility. *Animals*, **11**: 984. <https://doi.org/10.3390/ani11040984>
- CABALLERO I, VAZQUEZ JM, MAYOR GM, ALMIÑANA C, CALVETE JJ, SANZ L, ROCA J, MARTÍNEZ, EA (2009) PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *Int. J. Androl*, **32**: 505-513.
- CARATY A, SKINNER DC (1999). Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*, **140**: 165-170.
- CARRASCO R, SINGH J, ADAMS GP (2016). The dynamics of trkA expression in the bovine ovary are associated with a luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF). *Reproductive Biology and Endocrinology*, **14(1)**: 47
- CASIDA LE, WARWICK EJ (1945). The necessity of the corpus luteum for maintenance of pregnancy in the ewe. *J. Anim. Sci*, **4**: 34-36.
- CASTELLINI C, MATTIOLI S, DAL BOSCO A, COLLODEL G, PISTILLI A, STABILE AM, RENDE M (2019). In vitro effect of nerve growth factor on the main traits of rabbit sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **17**: 1-11.
- CATCHPOLE HR, COLE HH, PEARSON PG (1935). Studies of the rate of disappearance and fate of mare gonadotropic hormone following intravenous injection. *Am J Physiol*, **112**: 21-26.
- CHAO MV, HEMPSTEAD BL. (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends in Neurosciences*, **18(7)**: 321-326.

- CLINE MA, RALSTON JN, SEALS RC, LEWIS GS (2001). Intervals from norgestomet withdrawal and injection of equine chorionic gonadotropin or PG 600 to estrus and ovulation in ewes. *Journal of Animal Science*, **79**: 589-594.
- COLE HH, CUPPS PT (2013). *Reproduction in Domestic Animals*. Elsevier.
- COLE HH, HART GH (1930). The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting sexual maturity of the im-mature rat. *Am J Physiol*, **93**: 57-68.
- COMBARNOUS Y, SALESSE R, GARNIER J (1981). Physico-chemical properties of pregnant mare serum gonadotropin. *Biochim Biophys Acta*, **667**: 267-276.
- COMBELLES CM, ALBERTINI DF (2003). Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse 1. *Biology of Reproduction*, **68(3)**: 812-821.
- CORTELL C, VIUDES DE CASTRO MP. (2008). Immune response to repeated rhFSH superovulation treatment in rabbit does. Proc. 9th World Rabbit Congress. pp. 333-337.
- COSENTINO IO, BALARO MFA, ARASHIRO EKN, SANTOS JDR, DA SILVA CARVALHO AB, CLARIGET RP, ... BRANDÃO FZ (2019). Hormonal protocols for early resynchronization of ovulation in ewes: The use of progestagens, eCG, and inclusion of early pregnancy diagnosis with color Doppler ultrasound. *Theriogenology*, **133**: 113-118.
- COSENTINO IO, BALARO MFA, LEAL FSC, DA SILVA CARVALHO AB, DE SOUZA PRC, ARASHIRO EKN, BRANDÃO FZ (2018). Accuracy of assessment of luteal morphology and luteal blood flow for prediction of early pregnancy in goats. *Theriogenology*, **121**: 104-111.
- CSEH S, FAIGL V, AMIRIDIS GS (2012). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130**: 187-192.
- CUETO M, GIBBONS A, ALBERIO R, TADDEO H, GONZALEZ-BULNES A (2006). Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. *Animal Reproduction Science*, **91**: 275-284.
- CUETO M, GIBBONS AE, BRUNO GALARRAGA MM, FERNANDEZ J (2016). Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. *Ediciones INTA*
- CUETO M, GIBBONS A (2010). Conservación seminale inseminación artificial en ovinos. In Actualización en Prod Ovina Ed.: Mueller, J.P., Cueto, M.I. 61-78.
- DAL GE, ENGİNLER SO, BAYKAL K, SABUNCU A (2019). Early pregnancy diagnosis by semiquantitative evaluation of luteal vascularity using power Doppler ultrasonography in sheep. *Acta Veterinaria Brno*, **88(1)**: 19-23.
- DE K, KUMAR D, SETHI D, GULYANI R, NAQVI SMK (2015). Estrus synchronization and fixed-time artificial insemination in sheep under field conditions of a semi-arid tropical region. *Tropical Animal Health and Production*, **47**: 469-472.
- DELL'AQUILA S, VARRIALE B, ALBERICO G (1988). Pierantoni. seasonal fluctuations in plasma progesterone concentrations In Gentile-Di-Puglia and Ile-De-France ewes In Southern Italy. *Journal of Reproduction and Fertility*, **83**: 825-828.

- DEMİRCİ E (2002). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. F Ü Vet Fak Ders Teksiri. No: 53 Elazığ.
- DENAMUR R, MARTINET J (1955). Effects de l'ovariectomie chez la brebis pendant la gestation. *C. R. Seances Soc. Biol*, **149**: 2105-2107.
- DISSEN GA, HIRSHFIELD AN, MALAMED S, OJEDA SR (1995). Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*, **136**: 4681-4692
- DISSEN GA, PARROTT JA, SKINNER MK, HILL DF, COSTA ME, OJEDA SR (2000). Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology*, **141**: 4736-4750
- DİNC AD, ERDEM H, TASAL I, SEMACAN A, ERGİN A (2001). Early pregnancy diagnosis in ewes by means of transrectal realtime ultrasonography. *Archives Animal Breeding*, **44**: 65-70.
- DİSKİN MG, MORRIS DG (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**: 260-267.
- DİXON AB, KNIGHTS M, WINKLER JL, MARSH DJ, PATE JL, WILSON ME, INSKEEP EK (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. *Journal of Animal Science*, **85**: 1274-1284.
- DİXON AB, KNIGHTS M, WINKLER JL, MARSH DJ, PATE JL, WILSON ME, INSKEEP EK (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. *Journal of Animal Science*, **85**: 1274-1284.
- DONEY JM, SMITH WF, GUNN RG (1976). Effects of post-mating environmental stress or administration of ACTH on early embryonic loss in sheep. *The Journal of Agricultural Science*, **87**: 133-136.
- DRIANCOURT M (1994). Lack of between-follicle interactions in the sheep ovary. *Reproduction Nutrition Development*, **34**: 249-260.
- DRIANCOURT M. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, **55**: 1211-1239.
- DRUART X, MAXWELL C, KERSHAW-YOUNG C (2015). Use of Beta-Nerve Growth Factor for Inducing Ovulation in Mammals. United States Patent Application Publication. Pub. No.: US 2015/0005236 A1
- DRUART X, RICKARD JP, MACTIER S, KOHNKE PL, KERSHAW-YOUNG, CM, BATHGATE R, GIBB Z, CROSSETT B, TSIKIS G, LABAS V, HARİCHAUX G, GRUPENCG, DE GRAAF SP (2013). Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of proteomics*, **91**:13-22.
- DUBUC J, HOULE J, ROUSSEAU M, RO JP, BUCZİNSKİ S (2020). Accuracy of corpus luteum color flow Doppler ultrasonography to diagnose nonpregnancy in dairy cows on day 21 after insemination. *Journal Of Dairy Science*, **103**: 2019-2023.
- DUMLUPINAR E (2017). Klinik Vaka Tanısında Roc Analizi Tekniği. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.

- ELMETWALLY M, ROHN K, MEÏNECKE-TILLMANN S (2016). Noninvasive color Doppler sonography of uterine blood flow throughout pregnancy in sheep and goats. *Theriogenology* **85**: 1070-1079
- EVANS A, FLYNN J, DUFFY P, KNIGHT P, BOLAND M (2002). Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction*, **123**: 59-66.
- EVANS A, FLYNN J, QUINN K, DUFFY P, QUINN P, MADGWICK S, CROSBY T, BOLAND M, BEARD A (2001). Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology*, **56**: 923-936.
- EVANS ACO, DUFFY P, CROSBY TF, HAWKEN PAR, BOLAND MP, BEARD AP (2004). Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus synchronisation and fertility during the breeding season in ewes. *Animal Reproduction Science*, **84**: 349-358.
- EVANS G, MAXWELL WC (1987). *Salamons' artificial insemination of sheep and goats* (No. Ed. 2). Butterworths.
- FATET A, PELLICER-RUBIO MT, LEBOEUF B (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, **124**: 211-219
- FERNÁNDEZ ABELLA D, BONILLA RIERA C, BONILLA RIERA R, VILLEGAS N, IBAÑEZ W (2001). Efecto de la refrigeración del semen de carnero a 4-5° C sobre el transporte espermático. *Producción Ovina SUL.*, **14**:55-63.
- FERNANDEZ-ABELLA D, PREVE MO, VILLEGAS N (2003). Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*, **60**: 21-26.
- FERNÁNDEZ-GAGO R, ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ M, ALONSO ME, GONZÁLEZ JR, ALEGRE B, DOMÍNGUEZ JC, MARTÍNEZ-PASTOR F (2017). Thawing boar semen in the presence of seminal plasma improves motility, modifies subpopulation patterns and reduces chromatin alterations. *Reprod. Fertil. Dev.* **29**: 1576-1584.
- FÍGUEIRA LM, FONSECA JF, ARASHIRO EKN, SOUZA-FABIAN JMG, RIBEIRO ACS, OBA E, et al. (2015). Colour Doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Ines ewes. *Reprod Dom Anim*, **50**: 643e50.
- FÍGUEIRA LM, FONSECA JF, ARASHIRO EKN, SOUZA-FABIAN JMG, RIBEIRO ACS, OBA E (2015). Colour Doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Ines ewes. *Reprod Dom Anim* **50**: 643e50
- FLYNN J, DUFFY P, BOLAND M, EVANS A (2000). Progestagen synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Animal Reproduction Science*, **62**: 285-296.
- FOLCH J, ALABART JL (2000). Características reproductivas de la oveja Rasa Aragonesa. *Ovis*, **68**: 27-36.
- FOOTE RH, BROCKETT CC, KAPROTH MT (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal reproduction science*, **71(1-2)**: 13-23.
- FORCADA F, ABECÍA JA (2006). The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reproduction Nutrition and Development*, **46**: 355-365.

- FORCADA F, ABECÍA JA, SIERRA I (1992). Seasonal changes in oestrous activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body conditions levels. *Small Ruminant Research*, **8**: 313-324.
- FRANDSON RD, WILKE WL, FAILS AD (2009). *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, John Wiley & Sons
- FTHENAKIS GC, ARSENOS G, BROZOS C, FRAGKOU IA, GIADINIS ND, GIANNENAS I, VALASI I (2012). Health management of ewes during pregnancy. *Animal Reproduction Science*, **130**:198-212
- GALLELLI MF, BIANCHI C, ZAMPINI E, TRASORRAS V, GAMBAROTTA M, MIRAGAYA M (2020). Corpus luteum vascularization during the maternal recognition of pregnancy in llamas (*Lama glama*). *Reproduction in Domestic Animals*, **55**: 74-80.
- GARCÍA A, NEARY MK, KELLY GR, PIERSON RA (1993). Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. *Theriogenology*, **39**: 847-861.
- GARCÍA J, DOMÍNGUEZ JC, PEÑA F, ALEGRE B, GONZALEZ R, CASTRO MJ, HABING G, KIRKWOOD R (2009). Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* **119**: 160–165.
- GARNER DL, THOMAS CA, GRAVANCE CG, MARSHALL CE, DEJARNETTE JM, ALLEN CH (2001). Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, **56**: 31–40.
- GIBBONS A, CUETO M (2012). Investigación, Desarrollo e Implementación De La Inseminación Artificial y La Transferencia De Embriones En Las Especies Ovina y Caprina. *Spermova*, **2**: 1-5
- GINTHER O, KOT K, WILTBANK M (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, **43**: 689-703.
- GIBBONS AE, CUETO MI (1995). Manual de inseminación artificial en la especie ovina. *Actualización en Prod Ovina*, INTA Bariloche 1-19.
- GINTHER OJ, GASTAL EL, GASTAL MO, UTT MD, BEG MA (2007). Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*, **99**: 213-220.
- GINTHER OJ, UTT MD (2004). Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *Journal of Equine Veterinary Science*, **24**: 516-526.
- GÓMEZ-BRUNET A, LÓPEZ SEBASTIÁN A (1991). Effect of season on plasma concentrations of prolactin and cortisol in pregnant, nonpregnant and lactating ewes. *Animal Reproduction Science*, **26**: 251-268.
- GÓMEZ-BRUNET A, SANTIAGO-MORENO J, CAMPO AD, MALPAUX B, CHEMINEAU P, TORTONESE DJ, LÓPEZ-SEBASTIÁN A (2008). Endogenous circannual cycles of ovarian activity and changes in prolactin and melatonin secretion in wild and domestic female sheep maintained under a long-day photoperiod. *Biology of Reproduction*, **78**(3): 552-562.
- GÓMEZ-BRUNET A, SANTIAGO-MORENO J, DEL CAMPO A, MALPAUX B, CHEMINEAU P, TORTONESE DJ, GONZALEZ-BULNES A, LÓPEZ-SEBASTIÁN A (2008). Endogenous circannual cycles of ovarian activity and changes in prolactin and melatonin secretion in wild and domestic female sheep maintained under a long-day photoperiod. *Biology of Reproduction*, **78**: 552-562.
- GÓMEZ-BRUNET A, SANTIAGO-MORENO J, TOLEDANO-DÍAZ A, LÓPEZ-SEBASTIÁN, A (2012). Reproductive seasonality and its control in Spanish sheep and goats. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **15**: 47-70

- GONZALEZ DE BULNES A, MORENO JS, BRUNET AG, LOPEZ-SEBASTIÁN A (2000). Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovulvar ewes. *Reproduct Domest Anim* **35**(2): 65–68.
- GONZALEZ-BULNES A, MENCHACA A, MARTIN GB, MARTINEZ-ROS P (2020). Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: Where we are and where we should go. *Reprod Fertil Dev*, **32**: 441–452
- GONZALEZ-BULNES, A, DIAZ-DELFA, C, GARCIA-GARCIA, R, URRUTIA, B, CARRIZOSA, J, LOPEZ-SEBASTIAN, A. (2005a). Origin and fate of preovulatory follicles after induced luteolysis at different stages of the luteal phase of the oestrous cycle in goats. *Animal Reproduction Science*, **86**: 237-245.
- GONZALEZ-BULNES, A, VEIGA-LOPEZ, A, GARCIA, P, GARCIA-GARCIA, R, ARIZNAVARRETA, C, SANCHEZ, M, TRESGUERRES, J, COCERO, M, FLORES, J. (2005b). Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*, **63**: 2523-2534
- GONZALEZ-LÓPEZ J (1993). La reproducción en la oveja Merina. Caracterización de su fisiología. Ovis. 28. Ed. Luzán S.A. pp 71.
- GORDON I. Controlled reproduction in sheep 2004 CABI UK The Ewe's Oestrous Cycle and Seasonal Breeding Activity 53-84.
- GÜNAY Ü, NUR Z, DOĞAN İ, BAŞPINAR B, SOYLU MK (2003). Sıfat Sezonuna Geçiş Döneminde ve Sıfat Sezonunda Koç Spermasının Dondurulabilirliğinin Araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Journal Faculty Veterinary Medicine*, **22**: 81-85.
- HAFEZ E, HAFEZ B. (2000). *Reproduction in Farm Animals*, Ed. Lippincott William&Wilkins, United States of America
- HARPER GP, GLANVILLE RW, THOENEN H (1982). The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma. Biochemical characterization and partial amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry*, **257**(14): 8541-8548.
- HARPER GP, THOENEN H (1980). The distribution of nerve growth factor in the male sex organs of mammals. *Journal of Neurochemistry*, **34**: 893–903.
- HASSAN, M., ARSHAD, U., BİLAL, M., SATTAR, A., AVAİS, M., BOLLWEİN, H., & AHMAD, N. (2019). Luteal blood flow measured by Doppler ultrasonography during the first three weeks after artificial insemination in pregnant and non-pregnant Bos indicus dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*. **65**: 29–36
- HENAULT MA, KILLIAN GJ, KAVANAUGH JF, GRIEL JR LC (1995). Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biol Reprod*, **52**: 390–7. doi:10.1095/biolreprod52.2.390.
- HERZOG K, BOLLWEİN H (2007). Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, **42**: 51-58.
- HOFMANN HD, UNSICKER K (1982). The seminal vesicle of the bull: A new and very rich source of nerve growth factor. *European Journal of Biochemistry*, **128**: 421–426

- HRÍSTOVA T, STOYCHEVA S, MASLEV T, RALCHEV I (2011). The influence of the time of implementation of PMSG on some of the reproductive parameters in sheep with synchronized oestrus. *Biotechnology in Animal Husbandry*, **27**:1845-1850.
- ISHWAR AK (1995). Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. *Small Rumin Res*, **17**: 37e44.
- İNANÇ ME (2016). Akkaraman Koçlarda Spermanın Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterol ile Dondurulması ve Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Ankara.
- İNCE D, KARACA O (2009). Çine Çaparı ve Karya koçlarında testis ve sperma özelliklerinin mevsimsel değişimi. *Hayvansal Üretim*, **50**: 9-15.
- JAINUDEEN MR, HAFEZ ESE, GOLLNICK PD, MOUSTAFA LA (1966). Antigonadotropins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections. *Am J Vet Res*, **27**: 669-675.
- JANA B, KOSZYKOWSKA M, CZARZASTA J (2011). Expression of nerve growth factor and its receptors, TrkA and p75, in porcine ovaries. *Journal of Reproduction and Development*, 1104150366-1104150366.
- JIN W, ARAI KY, SHIMIZU K, KOJIMA C, ITOH M, WATANABE G, TAYA K (2006). Cellular localization of NGF and its receptors trkA and p75LNGFR in male reproductive organs of the Japanese monkey (*Macaca fuscata fuscata*). *Endocrine*, **29**: 155-160.
- JIN WZ, TANAKA A, WATANABE G, MATSUDA H, TAYA K (2010). Effect of NGF on the motility and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, **56**: 437-443.
- JOHNSON S, DAILEY R, INSKEEP E, LEWIS P (1996). Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Domestic Animal Endocrinology*, **13**: 69-79.
- JONES AK, REED SA (2017). Benefits of ultrasound scanning during gestation in the small ruminant. *Small Rumin Res*, **149**: 163e71.
- JUYENA NS, STELLETTA C (2012). Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*, **33**(4): 536-551.
- KAEOKET K, CHANAPIWAT P, TUMMARUK P, TECHAKUMPHU M, KUNAVONGKRIT A (2011). A preliminary study on using autologous and heterologous boar sperm supernatant from freezing processes as post-thawing solution: Its effect on sperm motility. *Trop. Anim. Health Prod*, **43**: 1049-1055.
- KARACA T, ARIKAN S, KALENDER H, YORUK M (2008). Distribution and heterogeneity of mast cells in female reproductive tract and ovary on different days of the oestrus cycle in Angora goats. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**: 451-456
- KARAGIANNIDIS A, VARSAKELI S, ALEXOPOULOS C, AMARANTIDIS I (2000). Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research*, **37**:125-130
- KAREN A, BECKERS JF, SULON J, AMİRİ BE, SZABADOS K, ISMAİL S, ... SZENCI O (2003). Evaluation of False Transrectal Ultrasonographic Pregnancy Diagnoses in sheep by measuring the plasma level of pregnancy-associated glycoproteins. *Reproduction Nutrition Development*, **43**: 577-586.
- KAREN A, SZABADOS K, REICZIGEL J, BECKERS JF, SZENCI O (2004). Accuracy of transrectal ultrasonography for determination of pregnancy in sheep: effect of fasting and handling of the animals. *Theriogenology*, **61**, 1291-1298.

- KASIMANICKAM V, KASIMANICKAM R, ARANGASAMY A, SABERIVAND A, STEVENSON JS, KASTELIC JP (2012). Association between mRNA abundance of functional sperm function proteins and fertility of Holstein bulls. *Theriogenology*, **78(9)**: 2007-2019.
- KAYA A, YILDIZ C, LEHİMCİOĞLU NC, ERGİN A, AKSOY M (1999). Konya merinosu koçlarında sperma kalitesi, testis ölçüleri ve kan testosteron düzeylerine ilişkin mevsimsel değişikliklerin araştırılması. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, **9**: 1-5.
- KAYMAKÇI M, AŞKIN Y, KARACA O (1987). Akkaraman koyunlarının temel dölerme özellikleri. *Çukurova Üniv. Zir. Fak. Derg.*, **3**: 341-357.
- KAZAK F, YARIM GF (2014). Nörotrofinler. *Kocatepe Vet J.* **7(1)**: 47-57.
- KERSHAW-YOUNG CM, DRUART X, VAUGHAN J, MAXWELL WMC (2012). β -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reproduction, Fertility and Development*, **24**: 1093-1097.
- KILLIAN GJ, CHAPMAN DA, ROGOWSKI LA (1993). Fertility-associated proteins in Holstein bull seminalplasma. *Biol Reprod*, **49**: 1202-7. doi:10.1095/biolreprod49.6.1202.
- KNIGHT TW, O'NEILL KT, RIDLAND M, HAMILTON G (1992). Effects of month and PMSG on the interval from CIDR removal to ovulation in Romney and Merinos ewes. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* **52**:261-263.
- KOBAYASHI S, BERİSHA B, AMSELGRUBER WM, SCHAMS D, MIYAMOTO A (2001). Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2alpha. *Journal of Endocrinology*, **170(2)**: 369-380.
- KOLBECK R, JUNGBLUTH S, BARDE YA (1994). Characterisation of neurotrophin dimers and monomers. *Eur J Biochem*, **225**: 995-1003.
- KOYUNCU M, KARA UZUN Ş, ŞENGÜL L (2001). Kıvırcık Koyunlarında Progesteron ve Farklı Dozda PMSG Kullanımının Kızgınlık Denetimi ve Döl Verimini Arttırma Olanakları. *Turk. J Anim Sci*, **25**: 971-974.
- KOYUNCU M, OZİS ALTİCEKİC S (2010). Effects of progestagen and PMSG on estrous synchronization and fertility in Kıvırcık ewes during natural breeding season. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **23**: 308-311.
- LETETIER C, CONTRERAS-SOLIS I, GARCÍA-FERNÁNDEZ R, ARIZNAVARRETA C, TRESGUERRES J, FLORES J, GONZALEZ-BULNES A (2009). Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology*, **71**: 676-682.
- LETETIER C, CONTRERAS-SOLIS I, GARCÍA-FERNÁNDEZ R, SÁNCHEZ M, GARCÍA-PALENCIA P, SÁNCHEZ B, ARIZNAVARRETA C, TRESGUERRES J, FLORES J, GONZALEZ-BULNES A (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Animal Reproduction Science*, **126**: 61-69.
- LEYVA V, BUCKRELL B, WALTON J (1998). Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*, **50**: 395-416.
- LIC, SUN Y, YIK, MA Y, ZHANG W, ZHOU X (2010a). Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. *Theriogenology*, **74**: 1615-1622.

- LI C, WATANABE G, WENG Q, JIN W, FURUTA C, SUZUKI AK, KAWAGUCHI M, TAYA K (2005). Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors TrkA and p75 in the reproductive organs of the adult male rats. *Zoological Science*, **22**: 933-937.
- LI C, ZHENG L, WANG C, ZHOU X (2010b). Absence of nerve growth factor and comparison of tyrosine kinase receptor A levels in mature spermatozoa from oligoasthenozoospermic, asthenozoospermic and fertile men. *Clinica Chimica Acta*, **411**: 1482-1486.
- LIN K, DING XF, SHI CG, ZENG D, QUZONG S, LIU SH, WAN Y, LUOBU G, FAN M, ZHAO YQ (2015). Nerve growth factor promotes human sperm motility in vitro by increasing the movement distance and the number of A grade spermatozo. *Andrologia*, **47**: 1041-1046.
- LÓPEZ-GARCÍA S, SÁNCHEZ-TORRES MT, CORDERO-MORA JL, FIGUEROA-VELASCO JL, MARTÍNEZ-AISPURO JA, GARCÍA-CUÉ J L, MARTÍNEZ-CRUZ I, CÁRDENAS-LEÓN M (2021). Estrous synchronization in sheep with reused progesterone devices and eCG. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **50**:e20200176. <https://doi.org/10.37496/rbz5020200176>
- LUTHER J, GRAZUL-BILSKA A, KIRSCH J, WEIGL R, KRAFT K, NAVANUKRAW C, PANT D, REYNOLDS L, REDMER D (2007). The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. *Small Ruminant Research*, **72**: 227-231.
- MAMLUK R, CHEN D, GREBER Y, DAVIS JS, MEIDAN R (1998a). Characterization of messenger ribonucleic acid expression for prostaglandin F2 alpha and luteinizing hormone receptors in various bovine luteal cell types. *Biol Reprod*, **58**(3): 849-56.
- MAMLUK R, WOLFENSON D, MEIDAN R (1998b). LH receptor mRNA and cytochrome P450 side-chain cleavage expression in bovine theca and granulosa cells luteinized by LH or forskolin. *Domest Anim Endocrinol*. **15**(2): 103-14.
- MARTÍNEZ-ROS P, RÍOS-ABELLAN A, GONZALEZ-BULNES A (2019). Influence of progesterone-treatment length and eCG administration on appearance of estrous behavior, ovulatory success and fertility in sheep. *Animals*, **9**: 9.
- MATA-CAMPUZANO M, ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ M, TAMAYO-CANUL J, LÓPEZ-URUEÑA E, DE PAZ P, ANEL L (2014). Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Anim. Reprod. Sci*, **151**: 137-147
- MATTIOLI M, BARBONI B, GIOIA L, LUCIDI P (1999). Nerve growth factor production in sheep antral follicles. *Domest Anim Endocrinol*, **17**: 361-371.
- MAXWELL WM, WELCH GR, JOHNSON LA (1996). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev*, **8**: 1165-1178.
- MCALLISTER AK. (2001). Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**(8): 1054-1060.
- MCCRACKEN JA, CUSTER E, LAMSA JC (1999) Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev*, **79**: 263e323.
- MCINTOSH JE, MOOR RM, ALLEN WR (1975). Pregnant mare serum gonadotrophin: rate of clearance from the circulation of sheep. *J Reprod Fertil*, **44**: 95-100.

- MCNEILLY A, PICTON H, CAMPBELL B, BAIRD D (1990). Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, **43**: 177-186.
- MENEGATOS J, CHADIO S, KALOGIANNIS T, KOUSKOURA T, KOUIMTZIS S (2003). Endocrine events during the periestrus period and the subsequent estrous cycle in ewes after estrus synchronization. *Theriogenology*, **59**: 1533-1543
- MİYAMOTO A, OKUDA K, SCHWEIGERT FJ, SCHAMS D (1992). Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- β and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum *in vitro*. *J Endocrinol* **135**: 103-14. doi:10.1677/joe.0.1350103.
- MOSMANN T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- MOURA AA, KOC H, CHAPMAN DA, KILLIAN GJ (2006). Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl*, **27**: 201-11. doi:10.2164/jandrol.05089.
- MURAGAKI Y, CHOU TT, KAPLAN DR, TROJANOWSKI JQ, LEE VM (1997). Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors. *J Neurosci*. **17**: 530-42.
- NAIM P, CUETO M, GIBBONS A (2009). Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. *Arch Zootec.*, **58**:435-40.
- NAİM P, CUETO M, GİBBONS A (2009). Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. *Archivos de Zootecnia*, **58**: 435-440.
- NAJAFİ G, CEDDEN F, MOJTAHEDİ S, ALİVERDİNASAB R (2014). Estrus synchronization and twinning rate of ghezel ewes treated with CIDR and PMSG during the breeding season. *Online J. Anim. Feed Res*, **4**: 144-149.
- NAKAFFERO A (2018). Response to different oestrus synchronisation protocols and fertility of ewes following artificial insemination. Master of Science Dissertation, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria.
- NAKAGAWARA A, ARIMA-NAKAGAWARA M, SCAVARDA NJ, AZAR CG, CANTOR AB, BRODEUR GM (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*, **328(12)**: 847-854.
- NETO C, MATÍAS B, BARBOSA, PÍRES L, AGUIAR, SÍLVA CD, SOUZA, SÍLVA R, SANTANA, ALMEIDA AL, MENDES, SÍLVA C, DUTRA, ALVES P, LEITE, PAULA MCD (2012). Follicle-stimulating hormone to substitute equine chorionic gonadotropin in the synchronization of ovulation in Santa Inês ewes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **41(3)**:603-606. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000300018>
- NISWENDER GD, JUENGEL JL, SILVA PJ, ROLLYSON MK, MCINTUSH EW (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, **80**: 1-29.
- NORRIS DO, LOPEZ KH (Eds.) (2010). *Hormones and reproduction of vertebrates* (Vol. 5). Mammals Academic Press. The Endocrinology of the Mammalian Ovary 59-72 USA
- NOSRATİ M, TAHMORESPOOR M, VATANDOOST M, BEHGAR M (2011). Effects of PMSG doses on reproductive performance of Kurdi ewes artificially inseminated during breeding season. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, **1**: 125-129.

- O'HARA L, HANRAHAN JP, RICHARDSON L, DONOVAN A, FAIR S, EVANS AC, LONERGAN P (2010). Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, **73**: 541-549.
- OKAZAKI T, ABE S, YOSHIDA S, SHIMADA M (2008). Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*, **71**: 491-498.
- OKAZAKI T, SHIMADA M (2012). New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim. Sci. J*, **83**: 623-629.
- ÖZKOCA A (1984). Çiftlik hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ.Ü Vet.Fak.Yayınları, İstanbul
- PANG SF, CHOW PH, WONG TM (1979). The role of the seminal vesicles, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *J. Reprod. Fertil*, **56**: 129-132.
- PARTHIPAN S, SELVARAJU S, SOMASHEKAR L, ARANGASAMY A, SIVARAM M, RAVINDRA JP (2017). Spermatozoal transcripts expression levels are predictive of semen quality and conception rate in bulls (*Bos taurus*). *Theriogenology*, **98**: 41-9. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.04.042.
- PATTERSON JC, CHILDS GV. (1994). Nerve growth factor and its receptor in the anterior pituitary. *Endocrinology*, **135**(4): 1689-1696.
- PEITZ B, OLDS-CLARKE P (1968). Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house *Mouse*. *Biol Reprod*, **35**: 608-617.
- PİGON H, CLEGG MT, COLE HH (1960). The formation of antigonadotrophin in sheep and its effect on the endocrines and reproductive system. *Acta Endocrinol*, **35**: 253-260.
- PINET-CHARVET C, FLEUROT R, DEROUIN-TOCHON F, DE GRAAF S, DRUART X, TSİKİS G, TARAGNAT C, TEIXEIRA-GOMES, A, LABAS V, MOREAU T, CAYLA X, DUÏTTOZ AH (2020). Beta-nerve growth factor stimulates spontaneous electrical activity of in vitro embryonic mouse GnRH neurons through a P75 mediated-mechanism. *Scientific Reports*, **10**: 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67665-4>
- POIANI A (2006). Complexity of seminal fluid, a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **60**: 289-310.
- POPE WF, MC CLURE KE, HOGUE DE, DAY MY (1989). Effect of season and lactation on postpartum fertility of Polipay, Dorset, St Croix and Tharghe ewes. *Journal of Animal Science*, **67**: 1167-1174.
- RAJAMAHENDRAN R, RANIOWSKI J (1993). Effects of PMSG and ram contact on the reproductive performance of progestagen-treated ewes during breeding and anestrus seasons. *Small Ruminant Research*, **10**: 341-347.
- RAJAPAKSHA WR, ROBERTSON L, O'SHAUGHNESSY PJ (1996). Expression of follicle-stimulating hormone-receptor mRNA alternate transcripts in bovine granulosa cells during luteinization in vivo and in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, **120**(1): 25-30.
- RALCHEV I, MASLEV TS, TODOROV M., HRISTOVA TS (2007). Gonadotropin action of medication administered in various doses to synchronise the oestrus of anoestrous sheep. *Biotechnology in Animal Husbandry*, **23**: 339-347.

- RATTO MH, DELBAERE LTJ, LEDUC YA, PIERSON RA, ADAMS GP (2011). Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **9**: 24.
- RATTO MH, HUANCA W, SINGH J, ADAMS GP. (2006). Comparison of the effect of natural mating, LH, and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Animal Reproduction Science*, **91**: 299–306.
- RATTO MH, LEDUC YA, VALDERRAMA XP, VAN STRAATEN KE, DELBAERE LTJ, PIERSON RA, ADAMS GP (2012). The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**: 15042–15047.
- RAWLINGS N, COOK S (1993). LH secretion around the time of the preovulatory gonadotrophin surge in the ewe. *Animal Reproduction Science*, **30**: 289-299.
- RECUERO S, FERNANDEZ-FUERTES B, BONET S, BARRANCO I, YESTE M (2019). Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, **137**: 36–42.
- REN L, MEDAN MS, WENG Q, JIN W, LI C, WATANABE G, TAYA K (2005). Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats. *Journal of Reproduction and Development*, **51**: 399-404.
- ROBERTSON SA (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell and tissue research*, **322**(1): 43-52.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H, MARTÍNEZ EA, CALVETE JJ, PEÑA VEGA FJ, ROCA J (2021). Seminal Plasma: Relevant for Fertility? *Int. J. Mol. Sci*, **22**(9): 4368. <https://doi.org/10.3390/ijms22094368>
- ROMERO C, PAREDES A, DISSEN GA, OJEDA SR (2002). Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, **143**: 1485-1494.
- ROSA HJD, BRYANT MJ (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, **48**: 155-171.
- ROY F, MAUREL MC, COMBES B, VAIMAN D, CRÎBIU EP, LANTIER I, POBEL T, DELÉTANG F, COMBARNOUS Y, GUÏLLOU F (1999). The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biology of reproduction*, **60**(4): 805-813.
- RUBIANES E, MENCHACA A (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, **78**: 271-287
- SAEEDNIA S, BAHADORAN H, AMIDI F, ASADI MH, NAJI M, FALLAHI P, NEJAD NA (2015). Nerve growth factor in human semen: Effect of nerve growth factor on the normozoospermic men during cryopreservation process. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **18**(3): 292.
- SAEEDNIA S, NASHTAEI MS, BAHADORAN H, ALEYASIN A, AMIDI F (2016). Effect of nerve growth factor on sperm quality in asthenozoospermic men during cryopreservation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **14**(1): 29.
- SALAS C, JULIO-PIEPER M, VALLADARES M, POMMER R, VEGA M, MASTRONARDI C, KERR B, OJEDA SR, LARA HE, ROMERO C (2006). Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, **91**: 2396-2403.

- SAMİR H, KANDİEL MM (2019). Accuracy of subjective evaluation of luteal blood flow by color Doppler ultrasonography for early diagnosis of pregnancy in Egyptian buffalo. *Animal Reproduction Science*, **208**: 106129.
- SANTIAGO-MORENO J, LÓPEZ-SEBASTIÁN A, GONZÁLEZ-BULNES A, GÓMEZ-BRUNET A, CHEMINEAU P (2000). Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*) ewes. *Reproduction Nutrition and Development*, **40**: 421–430.
- SANTOS L, BRILHANTE G, DRECHMER J, de MELO LAMP, RAMOS A, SILVA, B (2020). Vascularização luteal e diagnóstico de gestação precoce em ovinos. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, **207**:1-8
- SCARAMUZZI R, ADAMS N, BAIRD D, CAMPBELL B, DOWNING J, FINDLAY J, HENDERSON K, MARTIN G, MCNATTY K, MCNEILLY A (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction, Fertility and Development*, **5**: 459-478.
- SCULLY S, EVANS AC, CARTER F, DUFFY P, LONERGAN P, CROWE MA (2015). Ultrasound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers. *Theriogenology*, **83**: 449–458.
- SEIFER DB, FENG B, SHELDEN RM (2006). Immunocytochemical evidence for the presence and location of the neurotrophin-Trk receptor family in adult human preovulatory ovarian follicles. *Am J Obstet Gynecol*, **194**: 1129-1134.
- SENGER PL (2015). *Pathways to pregnancy and parturition*. 3rd edition Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd.
- SHI CG, LN K, XU XB, ZHANG SC, WANG N, FAN M (2012). Evidence for the involvement of NGF in human sperm motility. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, **5**: 534-541.
- SILVA ME, SMULDERS JP, GUERRA M, VALDERRAMA XP, LETELIER C, ADAMS GP, RATTO MH (2011). Cetrorelix suppresses the preovulatory LH surge and ovulation induced by ovulation-inducing factor (OIF) present in llama seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **9**: 74.
- SIQUEIRA LG, AREAS VS, GHETTI AM, FONSECA JF, PALHAO MP, FERNANDES CA, VIANA JH (2013). Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *J Dairy Sci*, **96**: 6461–6472.
- SMITH MJ, JENNES L (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction*, **122**: 1-10.
- SOUZA CJ, CAMPBELL BK, BAIRD DT (1997). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, **56**: 483-488.
- SPENCER TE, JOHNSON GA, BAZER FW, BURGHARDT RC (2007). Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Society of Reproduction and Fertility*, **64**: 379-396.
- SPENCER TE, SANDRA O, WOLF E (2008). Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*, **135**: 165-179
- STEWART F, ALLEN WR, MOOR RM (1976). Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J Endocrinol*, **71**: 371–382.

- STEWART JL (2019). Determining the role of nerve growth factor-beta in seminal plasma on bovine reproduction. Doctoral thesis. Comparative Biosciences in the Graduate College of The University Of Illinois, Urbana-Champaign.
- STEWART JL, CANİSSO IF, ELLERBROCK RE, MERCADANTE VRG, LİMA FS (2018). Nerve Growth Factor- β production in the bull: Gene expression, immunolocalization, seminal plasma constitution, and association with sire conception rates. *Anim Reprod Sci*, **197**: 335–42. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.09.006.
- STEWART JL, CUNHA S, DİAS L, CANİSSO NW, MERCADANTE IF, CARDOSO VRG, WILLİAMS RC, POHLER GL, LİMA KGFS (2020). Administration of nerve growth factor-b to heifers with a pre-ovulatory follicle enhanced luteal formation and function and promoted LH release. *Theriogenology*, **148**: 37–47.
- STEWART JL, GAO L, FLAWS JA, MERCADANTE VRG, DİAS NW, CANİSSO IF, LİMA F (2020). Direct Effects of Nerve Growth Factor- β , Purified from Bull Seminal Plasma on Steroidogenesis and Angiogenic Markers of the bovine Pre-ovulatory Follicle. *Research Square* doi.org/10.21203/rs.3.rs-48525/v1
- STEWART JL, MERCADANTE VRG, DİAS NW, CANİSSO IF, YAU P, IMAİ B, LİMA FS (2018). Nerve Growth Factor-Beta, purified from bull seminal plasma, enhances corpus luteum formation and conceptus development in *Bos taurus* cows. *Theriogenology*. **106**: 30–8.
- STORMSHAK, F, INSKEEP, E. K, LYNN, J. E, POPE, A. L, & CASİDA, L. E. (1963). Progesterone levels in corpora lutea and ovarian effluent blood of the ewe. *Journal of Animal Science*, **22(4)**: 1021-1026.
- SWANSON WF, HOROHOV DW, GODKE RA (1995). Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. *J Reprod Fertil*, **105**: 35–41.
- SWANSON WF, ROTH TL, GRAHAM K, HOROHOV DW, GODKE RA (1996). Kinetics of the humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. *Am J Vet Res*, **57**: 302–307.
- TANCO VM, RATTU MH, LAZZAROTTO M, ADAMS GP (2011). Dose-Response of Female Llamas to Ovulation-Inducing Factor from Seminal Plasma. *Biology of Reproduction*, **85(3)**: 452-456.
- TANCO VM, VAN STEELANDT MD, RATTU MH, ADAMS GP (2012). Effect of purified llama ovulation-inducing factor (OIF) on ovarian function in cattle. *Theriogenology*, **78**: 1030–1039.
- TAŞDEMİR U, KİNET H, ÖZCAN İ, YURTSEVEN R. TUNCER PB (2003). Farklı sulandırıcılar kullanılarak dondurulmuş çözündürülmüş koç sperması ile laparoskopik intrauterin tohumlama. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **43**: 1-8.
- TEKİN N (1994). Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In: Alaçam, E. Ed. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Dizgievi, Konya. 69-79
- TEKİN K, CİL B, ALEMDAR H, OLGAC KT, TİRPAN MB, DASKİN A, STELLETTA C (2020). Semen collection by trans-rectal digital stimulation and insemination campaign in goat. *Andrologia*, **52(2)**: e13458.
- TEKİN N, ROSE AGA, YURDAYDIN N, YAVAŞ Y, DAŞKIN A, KESKİN O, ETHEM H (1991). Östrusları sinkronize edilen koyunlarda sun'i tohumlama yöntemiyle elde edilen dölverimi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **38**: 60-73

- TEKİN N, UYSAL O, AKÇAY E, YAVAŞ İ (2006). Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **53**:179-184
- TRIBULO P, BOGLE O, MAPLETOFT RJ, ADAMS GP (2015). Bioactivity of ovulation inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF) in bovine seminal plasma and its effects on ovarian function in cattle. *Theriogenology*, **83**: 1394–1401.
- TSAFRİRİ A, LİNDNER HR, ZOR U, LAMPRECHT SA. (1972). Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. *Prostaglandins*; **2**: 1–10. doi:10.1016/0090-6980(72)90024-X.
- TURNA YILMAZ O, GÜNDÜZ MC, EVKURAN DAL G, UCMAN M, GÜNAY UCMAN Z, KARACAM E, KASIKCI G, KILICARSLAN MR (2017). Evaluation of changes in Doppler ultrasonography indices and levels of maternal serum angiogenic factors throughout pregnancy in ewes. *Theriogenology*, **89**: 183-191
- TÜRK G, DEMİRCİ E (2005). Spermatolojik Özelliklerle Testosteron Miktarı Arasındaki İlişki. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **19**:21-27.
- UÇAR M, GÜNDOĞAN M, ÖZDEMİR M, TEKERLİ M, ERYAVUZ A, SABAN E, ÖZENÇ E (2002). Değişik ırk koyunlarda Progesteron+eCG ile östrusların senkronize edilmesi ve hayvanlarda Kolesterol ile Progesteron seviyelerinin araştırılması. *Vet Bil Derg* **18**: 79-85
- ULUKAYA, E., ÖZDEKİCİOĞLU, F., YILDIZTEPE ORAL, A., DEMİRAĞ, M. (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*. **22**: 232-239.
- UNGERFEDL R, FOSBERG M, RUBIANES E (2004). Overview of the response of anoestrus ewes to the ram effect. *Reproduction Fertility and Development*, **16**: 479-490.
- URIBE-VELÁSQUEZ LF, OBA E, LARA-HERRERA LC, SOUZA MIL, VILLA-VELÁSQUEZ H, TRINCA LA, FERNANDES CADC (2002). Respostas endócrinas e ovarianas associadas com o folículo dominante da primeira onda folicular em ovelhas sincronizadas com CIDR ou PGF2alfa. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **31**(2): 944-953.
- UTT MD, JOHNSON GL 3RD, BEAL WE (2009). The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology*, **71**: 707–715.
- UYSAL O, TAŞDEMİR U, KİNET H., ÖZCAN İ (2003). Akkaraman ırkı Koçlarda başlıca spermatolojik özellikler. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **43**:23-28.
- VALLS ORTÍZ M (1983). Frequent lambing of sheep flocks in Spain: Productivity and management consequences. *Livestock Production Science*, **10**: 49-58
- VAN CLEEFF J, KARSCH FJ, PADMANABHAN V (1998). Characterization of endocrine events during the peri-estrous period in sheep after estrous synchronization with controlled internal drug release (CIDR) device. *Domestic Animal Endocrinology*, **15**(1): 23-34.
- VIANA AGA, MARTINS AMA, PONTES AH, FONTES W, CASTRO MS, RICART CAO, SOUSA MV, KAYA A, TOPPER E, MEMILI E, MOURAL AA (2018). Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. *Sci Rep*, **8**:16323. doi:10.1038/s41598-018-34152-w.

- VILARIÑO M, RUBIANES E, MENCHACA A (2013). Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, **79**: 206-210
- VILARIÑO M, RUBIANES E, VAN LIER E, MENCHACA A (2010). Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®) in sheep. *Small Ruminant Research*, **91**: 219-224.
- VIÑALES C, RUBIANES E (1998). Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Canadian Journal of Animal Science*, **78**: 429-432
- VIÑALES-GİL C, GONZALEZ-BULNES A, MARTÍN GB, SALES ZLATAR F, SALE S (2009). Sheep and Goats. *Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography*, 181-210. Blackwell Publishing.
- WILDEUS S (2000). Current concept in synchronization of estrus: Sheep and goats, *J Anim Sci* **77**: 114.
- XU TR, WANG WY, HUANG YH, MENG QX, LI DS, LU QM, XIONG YL (1999). A nerve growth factor from the venom of Chinese cobra (*Naja naja atra*) and its effects on male reproductive system in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **124(2)**: 149-156.
- YAN Z, NEULEN J, RACZEK, S, WEICH HA, KECK, C, GRUNWALD K, BRECKWOLDT M (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. *Gynecological Endocrinology*, **12(3)**: 149-153.
- YAVAŞ İ (2008). Koç spermasının farklı oranlarda süroz içeren sulandırıcılar ile gliserollü ve gliserolsüz sulandırılması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Ankara.
- YENİ D, AVDATEK F, GÜNDOĞAN M (2010). An Investigation on Certain Andrological and Biochemical Parameters in Rams under Afyonkarahisar Conditions. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, **3**: 1-6
- YILDIZ S (2004). Koç spermasının farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla kısa süreli (+5°C) saklanması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Ankara.
- YILMAZ O (2004). Sakız ve Karya Tipi koçların sperma kalitesinde meydana gelen mevsimsel değişimler üzerine bir araştırma. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- ZARCO L, STABENFELDT GH, QUİRKE JF, KİND AHL H, BRADFORD GE (1988). Release of prostaglandin F-2a and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *J Reprod Fert*, **83**: 517e26.

EKLER

BAŞVURU DEĞERLENDİRME FORMU

Evrak Kayıt	: 1138
Geliş Tarihi	: 20.06.2017
Karar Tarihi ve Sayısı	: 29.06.2017-138
Araştırma Yürütücüsü : Prof. Dr. Ergün AKÇAY	
Projenin Adı: β NGF'ün Koyunlarda Ovulasyon Mekanizmaları ve Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi	
Hayvan türleri ve sayıları: 90 baş Akkaraman Koyunu, 3 (Üç) baş Akkaraman Koçu	

Araştırma daha önce yapılmış mı?	Evet ☐	Hayır ☒
Araştırma için seçilen hayvan türü uygun mu?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırma için öngörülen hayvan sayıları yeterli mi?	Evet ☒	Hayır ☐
Mümkün olan en az sayıda hayvan kullanımı amaçlanmış mıdır?	Evet ☒	Hayır ☐
Hayvanlar için optimum şartlar sağlanmış mıdır?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırmacıların deney hayvanı sertifikası / yetkisi var mı?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırma protokolünde hayvanlara en az ağrı ve acı verecek önlemler alınmış ve bu konudaki standartlar gözetilmiş mi?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırmada çevre ve/veya iş sağlığını tehdit edecek kimyasal, biyolojik radyoaktif maddelerin bulaşması riski var mıdır?	Evet ☐	Hayır ☒
Araştırma sonunda hayvanlara yapılacak işlemler konusunda gerçekçi tespitler yapılmış mıdır?	Evet ☒	Hayır ☐
Hayvanlara ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet ☐	Hayır ☐
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet ☐	Hayır ☐
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi edildi ise atıkların imhası için gerekli önlem alınmış mıdır?	Evet ☐	Hayır ☐
Açıklamalar: Proje, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğünde türleri ve sayıları belirtilmiş hayvanlarda uygulanacaktır. Müdürlüğümüzün "Deney Hayvanı Üretici, Kullanıcı ve Tedarikçi Kuruluşlara Mahsus Çalışma İzni" mevcuttur.		

Tarafımızdan değerlendirilen bu çalışma Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Çalışma Yönergesi'nde belirtilen ilkelere **uygun bulunmuştur.**

Dr. Sedat Hamdi KIZIL
Kurul Başkanı

Dr. Hüseyin KINET
Üye

Vedat KARAKAŞ
(Üye)

Selahattin ŞEN
Üye

Mehmet Ali YILMAZ
Sorumlu Vet. Hekim

Dr. Engin ÜNAY
Üye

Dr. Halil EROL
(Üye)

Mustafa KÖYLÜOĞLU
(Üye)