



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ANKARA KEÇİLERİNDE  
EMBRYO TRANSFER UYGULAMALARI**

**Kübra KARAKAŞ**

**DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. İsmail Hakkı İZGÜR**

**2015- ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKARA KEÇİLERİNDE**  
**EMBRİYO TRANSFER UYGULAMALARI**

**Kübra KARAKAŞ**

**DOĞUM ve JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. İsmail Hakkı İZGÜR**

Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından  
13B3338001 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**2015-ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Doğum ve Jinekoloji Doktora Programı**

Çerçevesinde Yürütülmüş Olan Çalışma, Aşağıdaki Jüri Tarafından

**Doktora Tezi Olarak Kabul Edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi: 26. 03. 2015



**Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ**  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı



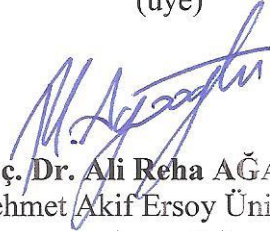
**Prof. Dr. İsmail Hakkı İZGÜR**  
Ankara Üniversitesi  
(üye)



**Prof. Dr. Ergün AKÇAY**  
Ankara Üniversitesi  
(üye)



**Doç. Dr. Hasan Ceyhan MACUN**  
Kırıkkale Üniversitesi  
(üye)



**Doç. Dr. Ali Reha AĞAOĞLU**  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
(raportör)

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Ankara Keçilerinin Genel Özellikleri	2
1.2. Keçilerde Üreme Özellikleri	3
1.3. Keçilerde Üremenin Denetlenmesi	5
1.3.1. Seksüel Siklusların ve Ovulasyonun Senkronizasyonu	6
1.3.1.1. Progestagenler	7
1.3.1.2. Prostaglandinler	8
1.3.1.3. Gonadotropinler	9
1.3.1.4. Melatonin	9
1.3.1.5. Işık Uygulamaları (Fotoperiyot)	10
1.3.1.6. Teke Etkisi	11
1.3.1.7. Flashing	11
1.3.2. Süperovulasyon	12
1.3.2.1. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)	13
1.3.2.2. Gebe Kısrak Serum Gonadotropini (PMSG)	13
1.3.2.3. İnsan Menapozal Gonadotropin (hMG)	14
1.3.2.4. Süperovulasyon Protokolleri	14
1.4. Keçilerde Embriyo Gelişimi ve İn Vivo Embriyo Eldesi	16

1.4.1.	Embriyo Gelişimi	16
1.4.2.	Embriyoların İn Vivo Elde Edilmesi	17
1.4.2.1.	Laparotomik Yöntem	17
1.4.2.2.	Laparoskopik Yöntem	18
1.4.2.3.	Servikal Yöntem	19
1.4.3.	Embriyoların Değerlendirilmesi	19
1.4.4.	Embriyoların Dondurulması	22
1.4.4.1.	Geleneksel Yavaş Dondurma	25
1.4.4.2.	Hızlı Dondurma	27
1.4.4.3.	Vitrifikasyon	27
1.4.5.	Embriyoların Çözdürülmesi	29
1.5.	Embriyo Transferi	30
1.5.1.	Laparotomik Embriyo Transferi	31
1.5.2.	Laparoskopik Embriyo Transferi	32
1.5.3.	Transservikal Embriyo Transferi	33
<b>2.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>34</b>
2.1.	Hayvan Materyali	34
2.2.	Metot	35
2.2.1.	Senkronizasyon Protokolü	35
2.2.2.	Süperovulasyon Protokolü	36
2.2.3.	Kullanılan Vasatlar	36
2.2.4.	Embriyoların Cerrahi Yöntemle Elde Edilmesi	38
2.2.5.	Embriyoların Değerlendirilmesi	41
2.2.6.	Embriyoların Dondurulması	43
2.2.7.	Embriyoların Çözdürülmesi	44
2.2.8.	Embriyoların Transferi	45
2.3.	İstatistiksel Analizler	47

<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	48
3.1.	Senkronizasyon Bulguları	48
3.2.	Süperovulasyon Bulguları	48
3.3.	Embriyo Eldesi Bulguları	49
3.4.	Embriyo Transfer Bulguları	51
3.5.	Alıcı Dişilerin Senkronizasyon Bulguları	52
3.6.	Embriyo Transfer Sonuçları	53
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	57
<b>5.</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	66
	<b>Özet</b>	68
	<b>Summary</b>	70
	<b>Kaynaklar</b>	72
	<b>Ekler</b>	79
	<b>Ek-1 (Etik Kurul Raporu)</b>	79
	<b>Özgeçmiş</b>	80

## ÖNSÖZ

Keçi ilk evcilleştirilen hayvan türlerindedir. Farklı çevre koşullarına kolay uyum sağlaması, hastalıklara karşı dirençli olması ve beslenme maliyetinin düşük olması gibi nedenlerden dolayı, özellikle yüksek ve dağlık bölgelerde yaşayan ailelerin başlıca geçim kaynağını oluşturmaktadır.

Ankara ve yakın çevresi olmak üzere İç Anadolu Bölgesi'nin merkezi kesimi ile Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz Bölgesi'ndeki birkaç lokal alanda rastlanan Ankara Keçisinin, veya diğer bir adıyla tiftik keçisinin, "orman düşmanı" olarak tanıtılması sayılarının azalmasında önemli bir etken olmuştur. Ayrıca sentetik liflerin çok daha ucuz ve kolay ulaşılır olması, kaliteli nadir ve bir o kadar zahmetli olan tiftik eldesi ve dokumalarını adeta piyasadan silmiştir. Yaşanan tüm bu olumsuz gelişmelere karşın son yıllarda hız kazanan bilimsel araştırmalar ve kültürel faaliyetler, Türkiye'ye özgü bu canlıyı yeniden gündeme getirmekte olup sektörde birtakım olumlu gelişmelere de rastlanmaktadır.

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Üniversiteler ve Damızlık Koyun ve Keçi Yetiştiricileri Birlikleri'nin işbirliği ile Ankara Keçisi'nin seleksiyonuna ve korunmasına yönelik çalışmalar yürütülmektedir. Bu nedenle özellikle gen kaynaklarının saklanmasına yönelik yapılacak çalışmalar önem kazanmaktadır. Bu amaçla reproduktif biyoteknolojinin, özellikle embriyo transfer çalışmalarının yaygın hale getirilmesi gerekmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında tiftik kalitesi yönünden dünyada ve ülkemizde önemli olan Ankara Keçisi'nin genetik özelliklerinin sonraki jenerasyonlara aktarılması ve bu genetik materyallerin korunması amacıyla aşım sezonu başında ve sonunda embriyo eldesi, embriyoların taze olarak ya da dondurulup çözdürüldükten sonra

transfer edilmesi ve bu aşamalarda transferleri ile elde edilen gebelik ve canlı yavru oranları üzerine etkisinin belirlenmiştir.

Bu doktora çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Ofisi Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından BAP-13B3338001 kod numarası ile desteklenmiştir.

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hakkı İZGÜR'e, deneysel çalışmalarım sırasında öneri ve destekleri için Sayın Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ'a, tezin yazımı ve değerlendirilmesi sırasında dikkatli ve özverili yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Ayhan BAŞTAN, Prof. Dr. Şükrü KÜPLÜLÜ, Prof. Dr. Rifat VURAL, Doç. Dr. Halit KANCA'ya, tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Ergün AKÇAY'a, tez çalışmamın ilk deneme aşamasında anabilim dalımızda eğitimini sürdüren ve çalışmamın temelini oluşturan yöntemleri öğrendiğim Doç. Dr. Ali Reha AĞAOĞLU'na ve tez çalışmamda emeği geçen anabilim dalımız doktora ve yüksek lisans öğrencileri ile fakültemiz intern öğrencilerine ve anabilim dalımızda görevli idari personeline ve çalışmamın istatistik değerlendirmesinde yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Doğukan ÖZEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Zor zamanlarda yanımda olan, her zorluğun üstesinden birlikte geldiğini bana hep kanıtlayan, desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve her durumda yanımda olan Arş. Gör. Hasan ALKAN'a, Vet. Hekim Ayşegül KUDU'ya, Vet. Hekim Gökçe ONUR'a, İsmail ÜNAL'a, Vet. Hek. Fırat KORKMAZ'a ve hayatımın her aşamasında beni sevgi ve sabırla destekleyip yol gösteren, engeller karşısında asla vazgeçmememi öğütleyen ve hiçbir zaman bana olan inançlarını ve güvenlerini kaybetmeyen değerli aileme, her zaman yanımda oldukları için şükranlarımı sunarım.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
<	Küçük
>	Büyük
±	Artı eksi
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
α	Alfa
β	Beta
βME	Betamerkaptoetanol
ART	Yardımcı Üreme Teknikleri (Assisted Reproductive Technologies)
BI	Blastosist (Blastocyst)
BSA	Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Kalsiyum Klorid Dihidrat
CIDR	Kontrollü salınım yapan vagina içi araç (Controlled intravaginal drug release)
Cl	Korpus Luteum (Corpus Luteum)
CL	Korpora Lutea (Corpora Lutea)
cm	Santimetre (Centimeter)
CM	Kompakt morula (Compact Morula)
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DejBI	Dejenere Blastosist (Degenerated Blastocyst)
Dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit

E <sub>2</sub>	Östradiol
EBl	Erken blastosist
eCG	Kısrak koryonik gonadotropin (Equine chorionic gonadotropin)
EG	Etilen glikol
ET	Embriyo Transferi
ExpBl	Ekspanded blastosist
ExpHedBl	Ekspanded hatched blastosist
FBS	Fötal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
FCS	Fötal Buzağı Serumu (Fetal Calf Serum)
FGA	Fluorogestan asetat
FSH	Folikül Stimule Edici Hormon (Follicle Stimulating Hormon)
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (Gonadotropin Releasing Hormon)
gr	Gram
HedBl	Hatched blastosist
hMG	İnsan Menapozal Gonadotropin (Human Menopausal Gonadotrophin)
IETS	Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğu (International Embryo Transfer Society)
IU	İnternasyonal Ünite (International Unit)
KCl	Potasyum Klorür
kda	Kilodalton
kg	Kilogram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Monobazik potasyum fosfat
LAA	Linoleik asit albumin
LH	Luteinleştirici Hormon (Luteinizing Hormon)
lt	Litre
M	Morula
M	Molar
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Magnesium klorid hegzahidrat

MAP	Metilasetoksiprogesteron
mDPBS	Modifiye Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Solüsyonu (Modifiye Dulbecco's Phosphate Buffered Solution)
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MOET	Çoklu ovulasyon ve embriyo transferi (Multiple Ovulation and Embryo Transfer)
NaCl	Sodyum Klorür
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sodyum fosfat dibazik
OPS	Open Pulled Straw
P <sub>4</sub>	Progesteron
PBS	Fosfat Tamponlu Solüsyon (Phosphate Buffered Solution)
PEG	Polietilen glikol
PG	Prostaglandin
PG	Propilen glikol
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub> α	Prostaglandin F <sub>2</sub> alfa
PMSG	Gebe Kısarak Serum Gonadotropini (Pregnant Mare Serum Gonadotropin)
PRID	Progesteron salıveren vagina içi araç (Progesteron Releasing Intravaginal Device)
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil pirolidon
sn	Saniye
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UFO	Fertilize olmamış oosit (Unfertilized Oocyte)
USG	Ultrasonografi
VS	Vitrifikasyon Solüsyonu (Vitrification Solution)

**ŞEKİLLER**

<b>Şekil 1.1.</b>	Ankara Keçisi keçisi ve tekesi	3
<b>Şekil 1.2.</b>	Progesteron ihtiva eden intravaginal araçlar	7
<b>Şekil 1.3.</b>	Cognie'nin uyguladığı süperovulasyon protokolü	15
<b>Şekil 1.4.</b>	Lehloenya'nın uyguladığı süperovulasyon protokolü	15
<b>Şekil 1.5.</b>	Ağaoğlu ve ark.'nın uyguladığı süperovulasyon protokolü	15
<b>Şekil 1.6.</b>	Embriyo gelişim aşamaları	17
<b>Şekil 1.7.</b>	Keçilerde laparoskopik embriyo toplama işlemi	18
<b>Şekil 1.8.</b>	Keçilerde servikal yöntemle embriyo toplama işlemi	19
<b>Şekil 1.9.</b>	Embriyoların morfolojilerine göre değerlendirilmesi	21
<b>Şekil 1.10.</b>	Embriyo dondurma cihazı	26
<b>Şekil 1.11.</b>	Keçilerde laparoskopik embriyo transferi	32
<b>Şekil 2.1.</b>	Uygulanan senkronizasyon protokolü	36
<b>Şekil 2.2.</b>	Uygulanan süperovulasyon protokolü	36
<b>Şekil 2.3.</b>	Embriyoların cerrahi yöntemle elde edilmesi sırasında alınan operasyon görüntüleri.	39
<b>Şekil 2.4.</b>	Operasyon sırasında ovaryumların muayenesi ve süperovulasyon yanıtları.	40
<b>Şekil 2.5.</b>	Embriyoların cerrahi yöntemle elde edilmesi işlemi.	40
<b>Şekil 2.6.</b>	Kornu uterusunun yıkanması.	41

<b>Şekil 2.7.</b>	Laboratuvarda embriyo arama işlemi.	42
<b>Şekil 2.8.</b>	Toplanan embriyoların bir kısmının görüntüsü	42
<b>Şekil 2.9.</b>	Vitrifikasyon işleminin şematize edilmiş hali ve bu işlemde kullanılan 24 gözlü petri kabı	43
<b>Şekil 2.10.</b>	Payet kapatma makinesi ve payetler	44
<b>Şekil 2.11.</b>	Embriyoların transfer edilişi	46
<b>Şekil 3.1.</b>	Çalışma sonucunda elde edilen oğlaklar.	56

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b>	Keçilerde östrus siklusunun evreleri	4
<b>Çizelge 1.2.</b>	Keçilerde uygulanan senkronizasyon yöntemleri	6
<b>Çizelge 1.3.</b>	Embriyonun gelişim aşamalarında numaralandırma ve kısaltmaları	20
<b>Çizelge 1.4.</b>	2008-2012 yılları arasında sığır, koyun ve keçilere transfer edilen taze ve dondurulmuş embriyo sayıları.	23
<b>Çizelge 1.5.</b>	Vitrifikasyon vasatlarında kullanılan kimyasalların oranları ve ekilibrasyon süreleri	28
<b>Çizelge 2.1.</b>	Çalışmada kullanılan Ankara Keçisi keçi ve tekelerinin gruplara dağılımı.	35
<b>Çizelge 2.2.</b>	Kullanılan vasatlar için hazırlanan mD-PBS'in içeriği.	37
<b>Çizelge 2.3.</b>	Uterus yıkama vasatı için kullanılan kimyasallar.	37
<b>Çizelge 2.4.</b>	Vitrifikasyon vasatlarının hazırlanması için kullanılan bazal medyumun içeriği.	37
<b>Çizelge 2.5.</b>	Vitrifikasyon vasatlarının hazırlanması için kullanılan kimyasallar.	37
<b>Çizelge 2.6.</b>	Vitrifikasyon işlemi sırasında kullanılan 1 M sükrozun hazırlanması için kullanılan kimyasallar.	38
<b>Çizelge 2.7.</b>	Çözdürme (Devitrifikasyon) vasatlarının hazırlanması için kullanılan bazal medyumun içeriği.	38
<b>Çizelge 2.8.</b>	Vitrifikasyon vasatlarının hazırlanması için kullanılan kimyasallar.	38
<b>Çizelge 2.9.</b>	Embriyo transferinde kullanılan transfer vasatının hazırlanması.	38
<b>Çizelge 2.10.</b>	Vitrifikasyon işlemi sırasında kullanılan zaman çizelgesi.	44
<b>Çizelge 3.1.</b>	Senkronizasyon protokolü uygulanan verici keçilerde alınan yanıtlar.	48

<b>Çizelge 3.2.</b>	Süperovulasyon protokolü uygulanan verici keçilerde alınan ovaryum yanıtları.	49
<b>Çizelge 3.3.</b>	Verici keçilerden toplanan embriyoların değerlendirilmesi.	49
<b>Çizelge 3.4.</b>	Verici keçilerden toplanan hücrelerin değerlendirilmesi.	50
<b>Çizelge 3.5.</b>	Verici keçilerden toplanan embriyoların kalitesinin değerlendirilmesi.	51
<b>Çizelge 3.6.</b>	Yapılan embriyo transferi sayıları.	52
<b>Çizelge 3.7.</b>	Senkronizasyon protokolü uygulanan alıcı keçilerde elde edilen yanıtlar.	53
<b>Çizelge 3.8.</b>	Transfer sonrası gebelik ve oğlak sayıları.	53
<b>Çizelge 3.9.</b>	Transfer sonrası ultrasonografi muayeneleri ile aşım sezonu başında belirlenen gebelik sayıları.	54
<b>Çizelge 3.10.</b>	Transfer sonrası ultrasonografi muayeneleri ile aşım sezonu sonunda belirlenen gebelik sayıları.	54
<b>Çizelge 3.11.</b>	Transfer sonrası elde edilen oğlak sayıları ve embriyo yaşam oranları.	55

## 1. GİRİŞ

Genel olarak keçiler çoğu canlının erişip tüketemediği bitkilerden yararlandıklarından ve yetiştiricisine ek bir maliyet getirmemesinden dolayı “Fakirin ineği” olarak bilinmektedir. Ankara Keçisi (*Capra hircus ancryrensis*), *Bovidae* familyasının *Capra* cinsinden evcilleştirilmiş küçükbaş hayvanlar grubundan bir canlıdır ve keçi türlerinden farklı olarak sadece kendilerine has kılları nedeniyle yetiştirilmektedir (Şahin, 2013).

Tiftik adı verilen ve dünyada farklı yerlerde de yetiştiriciliği yapıldığı halde Türkiye’deki keçilerden elde edilen tiftiklerle aynı niteliği taşımayan, bu özel dokuma ürünü son yıllarda önemini büyük ölçüde yitirmiştir. Ankara ve yakın çevresi olmak üzere İç Anadolu Bölgesi’nin merkezi kesimi ile Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz Bölgesi’ndeki birkaç lokal alanda rastlanan Ankara Keçisi, bundan yaklaşık iki asır önce yurtdışına da götürülerek yetiştirilmiştir. Ankara veya diğer bir adıyla tiftik keçisi varlığı ile ilgili yapılan bu ilk hatanın ardından, tüm keçi türlerinin “orman düşmanı” olarak tanıtılması sayılarının azalmasında ikinci büyük hata olmuştur. Bu sektöre son olarak en büyük darbe sentetik liflerin çok daha ucuz ve kolay ulaşılır olması, kaliteli, nadir ve bir o kadar zahmetli olan tiftik eldesi ve dokumalarını adeta piyasadan silmiştir. Yaşanan tüm bu olumsuz gelişmelere karşın son yıllarda hız kazanan bilimsel araştırmalar ve kültürel faaliyetler, Türkiye’ye özgü bu canlıyı yeniden gündeme getirmekte olup sektörde birtakım olumlu gelişmelere de rastlanmaktadır. Bununla birlikte, ne yazık ki Ankara Keçisi sayısındaki azalmanın önüne geçilememiştir (Şahin, 2013).

Türkiye İstatistik Kurumu’nun verilerine göre 1991 yılında 1.184.942 baş olarak belirtilen Ankara Keçisi varlığı 2013 yılı verilerine göre ciddi azalma göstermiş ve 166.289 baş olarak bildirilmiştir (TUİK, 2014). Türkiye hayvancılığında önemli bir yeri olan Ankara Keçisi’nin bu nedenle geliştirilmesi gerekmektedir. Bu da yetiştirildiği çevre koşullarında daha iyi bakım, besleme ve daha da önemlisi her türlü verim



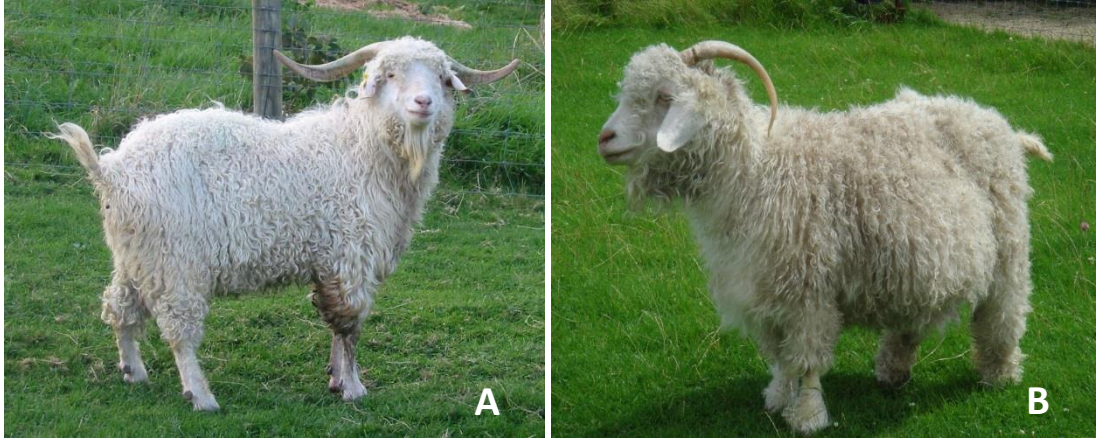
özelliklerinin saptanması ve bu verimlerin geliştirilmesi amacıyla yapılacak bilimsel çalışmalarla gerçekleştirilebilir. Bu amaçla reproduktif biyoteknolojinin, özellikle embriyo transfer çalışmalarının yaygın hale getirilmesi gerekmektedir (Sevinç ve ark., 1985).

### **1.1 Ankara Keçileri'nin Genel Özellikleri**

Türkiye yerli keçi ve koyun gen kaynağı bakımından oldukça zengin bir ülke olup Norduz, Honamlı, Kıl, Kilis ve Ankara (Tiftik) keçisi gibi dünyaca tanınan ırkların gen merkezi olan sahanın bir parçasıdır (Şahin, 2013). Ankara Keçisi tiftik verimiyle diğer keçilerden ayrılan, Orta Asya'da tarih sahnesine çıkmış, günümüzden 7-8 yüzyıl önce, Türklerin Anadolu'ya gelirken beraberlerinde getirdikleri bir keçi ırkıdır (Ankara Tarım İl Müdürlüğü, 2002).

Türklerin Anadolu'ya yerleşmesinden sonra, özellikle İç Anadolu'nun iklim koşullarına uyum sağlamış, ırk özellikleri netleşmiş ve bu bölgeye özel bir ırk olarak ünü dünyaya yayılmıştır. 1840'lı yıllara kadar sadece İç Anadolu'da yetiştirilmiş ve bu tarihlerde Güney Afrika'ya (1838) ve Amerika'ya (1849) götürülmüş ve bu ülkelere uyum sağlamıştır. Anadolu'ya özgü olan bu ırk, tüm dünyada da Ankara Keçisi (Angora Goat) olarak tanınmaktadır (Ankara Tarım İl Müdürlüğü, 2002).

Ankara Keçileri'nde cidago yüksekliği ortalama 55 cm, vücut uzunluğu ortalama 56 cm olup, yandan bakıldığında kare şeklini andıran bir yapı görülmektedir. Sağrısı biraz yüksek, yani arka bacaklar önlerden biraz uzundur (Arıkan ve Aral, 2013). Erişkin bir Ankara Keçisi keçisinin ağırlığı 30-45 kg arasında değişmekle birlikte erişkin bir tekenin ağırlığı 45-55 kg'ı bulabilmektedir. Canlının diğer karakteristik özelliklerinden biri de gerek dişisi gerekse erkeğinin sakallı ve boynuzlu oluşudur (Şekil 1.1) (Şahin, 2013).



**Şekil 1.1.** Ankara Keçisi tekesi (A) ve keçisi (B).

Ankara Keçisi'ne ününü veren, tüm bedenini kaplayan, ince, sık, yumuşak, dayanıklı, yüksek yalıtım özelliğine sahip, kir tutmayan buna karşılık kolaylıkla boyanabilen, göz alıcı parlaklığa sahip tiftiğidir (Şahin, 2013). Tiftik; parlak, elastik, zararlı güneş ışınlarını geçirmeyen, nem çeken, ısıya dayanıklı, kolayca boyanabilen ve kolay kir tutmayan bir elyaf olmasından dolayı, dokuma sanayinin vazgeçilmez bir ham maddesidir (Ankara Tarım İl Müdürlüğü, 2002).

## 1.2 Keçilerde Üreme Özellikleri

Keçiler, mevsime bağlı üreme aktivitesi göstermeleri nedeniyle mevsimsel poliöstrik hayvanlar olarak adlandırılırlar (Greyling, 2000). Üreme sezonunun başlangıcı ve uzunluğu; bölge, iklim, ırk, yaş, fizyolojik durum, teke varlığı, çiftleştirme sistemi ve özellikle fotoperiyot gibi birçok faktöre bağlı olarak değişir (Gordon, 1997; Greyling, 2000; Fatet ve ark., 2011). Ülkemizin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede, keçiler, gün uzunluğunun azaldığı yaz sonu ve sonbahar başlarında seksüel aktivite göstermektedir. Keçilerde seksüel siklus süresi 17-24 (21) gün (Çizelge 1.1), östrus süresi ise 24-48 (36) saat sürdüğü bildirilmektedir (Greyling, 2000). Ovulasyon, kızgınlık başlamasından 24-36 saat sonra spontan olarak meydana gelmektedir (Jainudeen ve ark., 2000).

**Çizelge 1.1.** Keçilerde östrus siklusunun evreleri (Abebe, 2008)

<b>Siklus evresi</b>	<b>Süresi</b>	<b>Özellikleri</b>
Proöstrus	2-3 gün	Preovulatör folikül büyümesi
Östrus	1-2 gün (36 saat)	Folikül büyümesi Ovulasyon Servikal mukus artışı Çiftleşmeyi kabul etme
Metöstrus	2-3 gün	Cl şekillenmesi
Diöstrus	14-15 gün	Luteal evre

Keçiler, gün ışığı sürelerinin arttığı dönemlerde anöstrus dönemine girmektedirler. Anöstrus döneminde hipofiz bezi inaktif olduğu için gonadotropin salgısı düşük düzeyde kalır ve foliküler aktivite uyarılamaz. Bu nedenle keçilerde anöstrus döneminde östrus ve ovulasyon şekillenmemektedir (Kalkan ve Horoz, 2007).

Keçilerde seksüel siklus iki ayrı evreden oluşmaktadır. İlki, ovumun gelişip atıldığı foliküler evre, ikincisi ise ovulasyonla başlayan ve Cl'nin oluştuğu luteal evredir (Fatet ve ark., 2011). Azalan gün ışığı etkisiyle retinadaki optik sinirler beyinde kiazma optikuma sinirsel uyarılar gönderir ve gün ışığı süresindeki azalmanın etkisiyle epifiz bezinden melatonin salınımı artırılır. Melatonin keçilerde gonadotropik etkilidir ve hipotalamustan Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) salınımını aktive ederek seksüel faaliyetleri başlatır (Yellon ve ark., 1992). Gonadotropin Salgılatıcı Hormonunun etkisiyle hipofiz ön lobundan Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinleştirici Hormon (LH) salınımı uyarılır. Foliküler evre sırasında, hipofiz bezinden salgılanan FSH, ovaryumda folikül gelişimini uyarır ve 2-3 mm çapında çok sayıda antral folikül oluşur, bu foliküllerden 2-3 tanesi dominant folikül olmak üzere 4 mm çapa ulaşırken, diğerleri LH etkisiyle atreziye olurlar. Ovulasyon öncesi folikül çapı 6-9 mm'ye ulaşır ve bu foliküllerden salgılanan Östradiol-17β'nın periferal kanda konsantrasyonu artar ve östrus davranışları görülür (Fatet ve ark., 2011).

Östradiol (E<sub>2</sub>) seviyesi belirli bir düzeye ulaştınca, granuloza hücrelerinden inhibin salgınır. İnhibin, hipofiz ön lobunda negatif geri bildirim ile FSH salgınımını azaltır ve böylece foliküler gelişim baskılanmış olurken (Canooğlu ve Sarıbay, 2012) aynı zamanda LH salgınımı uyarılır, LH'nın etkisiyle 20-26 saat sonra ovulasyon şekillenir ve luteal evre başlar. Ovule olan folikül hücrelerinin luteal hücrelere dönüşmesiyle Cl şekillenir ve Cl'den Progesteron (P<sub>4</sub>) salgılanır. Periferal kanda P<sub>4</sub> seviyesinin arttığı ve en üst düzeye ulaştığı dönem diöstrus olarak bilinir. Gebelik şekillenmemişse siklusun 16-18. günlerinde uterus endometriyumundan salgılanan PGF<sub>2</sub>α Cl regresyonuna neden olur, kan P<sub>4</sub> konsantrasyonu düşer ve negatif geri bildirim etkisi ortadan kalkarak tekrar gonadotropin salgınımı başlar, böylece yeni bir foliküler evre başlamış olur. Eğer gebelik oluştuysa, siklik Cl gebelik Cl'sine dönüşür (Abebe, 2008; Fatet ve ark., 2011)

### **1.3. Keçilerde Üremenin Denetlenmesi**

Türkiye'de son yıllardaki keçi varlığına bakıldığında 1991 yılında 1.184.942 baş olarak belirtilen Ankara Keçisi varlığının, 2014 yılı başlarında 176.456 baş olduğu, önceki yıllara göre sayısının önemli derecede azaldığı görülmektedir (TUİK, 2014). Bu nedenle keçilerin üreme performanslarının artırılması hedeflenmektedir. Keçilerde fertilité doğal yöntemlerle ya da uygulanan yardımcı üreme teknikleri ile artırılmaktadır (Paramio ve Izquierdo, 2014). Sürüye teke katımı, ışık/karanlık süresinin ayarlanması, çevre ısısının düzenlenmesi, laktasyonun sona erdirilmesi ve feromonlar; üremenin denetlenmesinde kullanılan doğal yöntemlerdir (Alaçam, 2007; Uçar ve Özyurtlu, 2012). Yardımcı üreme teknikleri ise östrus senkronizasyonu, süperovulasyon, suni tohumlama, çoklu ovulasyon ve embriyo transferi (Multiple Ovulation and Embryo Transfer / MOET), in vitro fertilizasyon, in vivo embriyo üretimi, in vitro embriyo üretimi ve embriyo transferi, embriyo ve spermanın dondurulması, embriyonun bölünmesi, kopyalama, transgenik yavru üretimi, cinsiyeti belli yavru elde edilmesi gibi tekniklerdir (Paramio ve Izquierdo, 2014).

### 1.3.1 Seksüel Siklusların ve Ovulasyonun Senkronizasyonu

Senkronizasyon; östrus ve ovulasyonun istenilen zamana göre planlanması işlemidir (Alaçam, 2007). Senkronizasyon; suni tohumlama ve embriyo transfer prosedürünün uygulanması ve başarısı açısından çok önemlidir (Abecia ve ark., 2012). Embriyo transferinde verici ve taşıyıcı hayvanların aynı zamanda senkronize edilmesi başarıda rol oynayan önemli faktörlerden biridir. Embriyonun yaşaması için uygun ortam oluşturmak amacıyla verici ve taşıyıcı hayvanların östrusları arasındaki süre 24 saatten fazla olmamalıdır (Kaymaz, 2012). Sürüye teke katımı, hayvanların ağıldan karanlık saatlerde çıkartılması, ısı ya da ışık ayarlaması gibi doğal yöntemlerle ve progestagen, PGF<sub>2</sub>α ve analogları, gonadotropinler, melatonin gibi hormonlar ya da kombinasyonları kullanılarak senkronizasyon yapılabilmektedir (Alaçam, 2007). Hormonal yaklaşımların; Cl'nin PGF<sub>2</sub>α gibi luteolitik etkili preparatlarla ortadan kaldırılması ya da progestagenlerle korpus luteumun varlığının taklit edilmesi olmak üzere iki temel prensibi vardır (Kaymaz, 2012).

Keçilerde; aşım sezonu içinde, aşım sezonu dışında ve geçiş dönemlerinde hormonal ya da hormonal olmayan uygulamalar ile senkronizasyon yapılmaktadır (Alaçam, 2007). Bu amaçla uygulanan yöntemler aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir (Çizelge 1.2).

**Çizelge 1.2.** Keçilerde uygulanan senkronizasyon yöntemleri

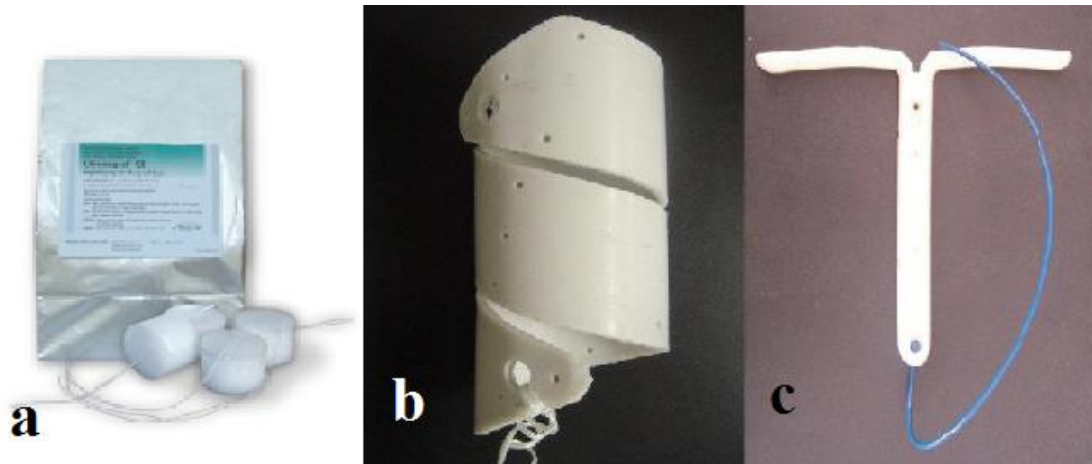
Aşım Sezonu	Geçiş Dönemi	Aşım Sezonu Dışı
PG	Teke etkisi	P <sub>4</sub> +gonadotropin+PG
P <sub>4</sub>	P <sub>4</sub> +gonadotropin+PG	Işık uygulaması
P <sub>4</sub> +gonadotropin	P <sub>4</sub> +gonadotropin+teke etkisi	Melatonin

P<sub>4</sub>: progesteron, PG: prostaglandin

### 1.3.1.1. Progestagenler

Progestagenler, progesteron molekülünde modifikasyon yapılarak oluşturulmuş ve progesteron benzeri etki yapan yapılar olarak tanımlanırlar. Progestagenler steroid yapıda hormonlardır ve ana kaynağı Cl'yi oluşturan luteal hücrelerdir (Alaçam, 2007).

Progestagenler; premiks, tablet, kapsül, solüsyon formlarında oral, enjeksiyon, deri altı implant, intravaginal araçlar (sünger, spiral, silikon) (Şekil 1.2) şeklinde kullanılmaktadır (Alaçam, 2007; Uçar ve Özyurtlu, 2012).



**Şekil 1.2.** Progesteron ihtiva eden intravaginal araçlar. a: vaginal sünger, b: PRID (Progesteron Releasing Intravaginal Device), c: CIDR (Controlled Intravaginal Drug Release).

Progestagenler, östrus siklusunda Cl'nin aktif olduğu süre kadar (11-14 gün) uygulandığında, GnRH ve gonadotropinler üzerinde negatif geri bildirim ile siklik aktiviteyi, dolayısıyla ovulasyonu baskılar. Uygulamanın sona erdirilmesi ile östrus senkronize edilmiş olur (Alaçam, 2007; Amiridis ve Cseh, 2012).

Progestagen içeren intravaginal araçlar, aşım sezonu içinde, aşım sezonu dışında ve geçiş döneminde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Vaginaya yerleştirilen

süngerler, vaginal mukozaya difüzyon yoluyla geçebilen ve endojen progesteron gibi etki eden sentetik progesteron analoglarını ihtiva etmektedir ve bu araçlar normal siklustaki diöstrusu taklit etmektedir (Whitley ve Jackson, 2004; Taşdemir ve ark., 2011; Uçar ve Özyurtlu, 2012; Ağaoğlu ve ark., 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda fluorogeston asetat (FGA; Chronogest CR®, MSD) ve metilasetoksiprogesteron (MAP; Repromap®, Upjohn) içeren vaginal süngerler kullanılmaktadır. Aynı amaçla kontrollü olarak progesteron salınımı yapan silikon formunda intravaginal araçlar da (CIDR®) kullanılmaktadır. Kullanılan CIDR® % 9-12 (300 mg) progesteron içeren sert medikal silikondan yapılmıştır ve uygulama sonrası kan progesteron düzeyinde çok hızlı bir artışa neden olmaktadır (Whitley ve Jackson, 2004; Holtz, 2005).

En sık kullanılan yöntemlerden biri vaginaya progesteron içeren süngerler yerleştirilmesidir. Senkronizasyon için süngerlerin kısa ve uzun süreli kullanımları söz konusudur. Uzun süreli uygulamalarda süngerler (FGA, MAP) 15-18 gün uygulanır ve luteolizisi uyaracak herhangi bir preparat kullanmadan senkronizasyon sağlanmış olur. Fakat spermatozoonların dışı genital kanalda taşınmasının etkilenmesi nedeniyle fertilizasyon oranları düşmektedir (Baldassarre ve Karatzas, 2004; Holtz, 2005). Kısa süreli uygulamalarda ise sünger 5 gün kullanılmaktadır ve süngerin çıkarılacağı gün 200-300 IU PMSG (Gebe Kısırak Serum Gonadotropini) enjekte edilmektedir. Ya da sünger 5-12 gün uygulanıp sünger çıkarılmadan 24-48 saat önce bir doz prostaglandin enjekte edilerek luteolizis uyarılmakta ve senkronizasyon sağlanmaktadır (Baldassarre ve Karatzas, 2004; Holtz, 2005).

### **1.3.1.2. Prostaglandinler**

Küçükbaş hayvanlarda kullanılan  $PGF_{2\alpha}$  ve analogları güçlü luteolitik ajanlardır ve başarılı bir senkronizasyon uygulaması için ovaryumlarda aktif bir  $Cl^{-}$ 'nin bulunması

gerekmektedir (Ishwar ve Memon, 1996; Baldassarre ve Karatzas, 2004; Abecia ve ark., 2012; Edmondson ve ark., 2012).

Prostaglandinler luteolizisi sağlayarak Cl'nin regresyonunu sağlar ve böylece takip eden foliküler evrede ovulasyon uyarılmış olur (Abecia ve ark., 2012). Östrus siklusunda luteal fazda tek doz PG uygulaması ile östrus senkronize edilebilmektedir (Amiridis ve Cseh, 2012). Korpus luteum varlığının bilinmediği durumlarda ise 10-14 gün arayla çift doz PG yapılmasını takip eden 2-4. günlerde östruslar görülmektedir (Whitley ve Jackson, 2004, Alaçam, 2007; Uçar ve Özyurtlu, 2012).

#### **1.3.1.3. Gonadotropinler**

Gonadotropinler anöstrus dönemindeki hayvanlarda progesteron uygulamalarına ek olarak östrus ve ovulasyonu uyarması ve senkronizasyonu sağlaması amacıyla kullanılmaktadır (Uçar ve Özyurtlu, 2012). Progesteron içeren süngerlerin çıkarılmasından 48 saat önce yada sünger çıkarıldığında 200-600 IU PMSG uygulaması, progesteron konsantrasyonunun düşmesini hızlandırmaktadır (Baldassarre ve Karatzas, 2004). İntravaginal süngerlerin çıkarılmasından 24 saat sonra 100 µg dozunda uygulanan GnRH, ovaryum faaliyetlerini ve senkronize sikluslarda ovulasyonu artırmaktadır (Özyurtlu ve Bademkiran, 2010).

#### **1.3.1.4. Melatonin**

Melatonin, gün ışığının azalmasıyla karanlık sürecin seksüel siklusu etkilemesine benzer etki yapmaktadır (Özyurtlu ve Bademkiran, 2010). Epifiz bezinden salgılanan melatonin, keçilerde özellikle anöstrüstan aşım sezonuna geçiş döneminde hipotalamusa etki ederek gonadotropin salınımını artırmaktadır. Melatonin; deri altı implant, enjeksiyon, vaginal sünger ya da oral formda kullanılabilir. En yaygın



kullanımı ise aşım sezonundan 40-60 gün önce anöstrustaki dişilere deri altı implantlar (18 mg) halinde uygulanmasıdır (Abecia ve ark., 2012; Edmondson ve ark., 2012; Uçar ve Özyurtlu, 2012). Kan melatonin seviyesi geceleri pik seviyedeyken gündüzleri bazal seviyelere inmektedir. İmplantlar tüm gün boyunca, hipofizden endojen melatonin salınımını baskılamadan, kan melatonin seviyesini yüksek tutmaktadır (Abecia ve ark., 2012). Koyunlarda ise melatonin implantların ovaryum aktivitelerini daha erken başlattığı, ikizlik ve gebe kalma oranlarını artırdığı belirlenmiştir (Baştan ve Küplülü, 1995).

### **1.3.1.5. Işık Uygulamaları (Fotoperiyot)**

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

Keçilerin üreme sezonları fotoperiyoda bağlıdır. Sıcak ve ılıman bölgelerde fotoperiyot düzenlenerek sezon dışı senkronizasyon uygulamaları yapılmaktadır. Fotoperiyodik uygulamalar, dişilere uygulanan hormon tedavilerine benzer bir etkiyi dişi ve erkeklerde sağlayarak seksüel aktiviteyi artırmaktadır (Fatet ve ark., 2011).

Aşım sezonu dışındaki keçilere teke katımından 30 gün öncesi ve 30 gün sonrasını içeren 60 gün boyunca 16 saat karanlık ve 8 saat ışık uygulaması sonucu en iyi östrus cevabının alındığı bildirilmiştir (Whitley ve Jackson, 2004). Fotoperiyodik uygulamalar genellikle hormonal tedaviler ve teke etkisiyle kombine olarak uygulanmaktadır (Fatet ve ark., 2011).

### **1.3.1.6. Teke Etkisi**

Keçi ve tekeler sosyal çevrelerine oldukça hassastır ve feromonlar senkronizasyonda kullanılabilir. Teke etkisi olarak adlandırılan bu durum anöstrusta olan keçilerde seksüel aktivitenin uyarılmasında kullanılmaktadır. Keçilerde teke etkisiyle 5-7 günlük kısa östrus siklusu görülmektedir ve bunu takip eden siklusta normal bir luteal faz ve östrus davranışları görülmektedir (Fatet ve ark., 2011).

Feromonların kimyasal bir iletişim mekanizması vardır ve vücuttaki bazı salgı bezlerinden salgılanmalarının yanısıra dışkı ve idrar ile doğrudan dışarı atılarak da etki gösterirler. Uzun süre erkek hayvanlardan ayrı tutulan keçilerin yanına teke katılmasıyla feromonların, dişilerin üreme mekanizmasını etkilediği bilinmektedir. Aynı zamanda dişilerin vaginal salgısı ve idrarında bulunan feromonlar da benzer şekilde tekeler üzerinde etkili olmaktadır (Yılmaz, 1999).

Üreme sezonundaki keçilerde siklusun luteal fazındaki progesteron etkisi nedeniyle tekeler ovulasyonu indükleyememektedir. Bu nedenle teke etkisi siklik keçilerde kullanılmamaktadır (Fatet ve ark., 2011).

### **1.3.1.7. Flashing**

Koyun ve keçi senkronizasyonunda beslenmenin de etkisi çok önemlidir. Rasyonlarda yapılacak değişikliklerle, hormon uygulamalarına gereksinim duymadan ovulasyon oranlarının artırılması mümkündür. Bu amaçla siklusun her bir evresindeki ihtiyaçlar, metabolik durum ve üreme performansı değerlendirilmelidir. Uzun süreli besin madde takviyesinde vücut ağırlığı artarken, kısa süreli uygulanmasında folikülogenezis uyarılmaktadır (Fatet ve ark., 2011).

Ankara Keçileri'nde aşım sezonunda çiftleştirmeler genellikle Ekim ayında başlar. Eylül ayı başından itibaren kondisyon düzeltici ve canlı ağırlığı %10 kadar artırıcı yönde konsantre yem ilavesi (150-300 gr/gün/baş dişi damızlık keçiye, tohumlamadan en az 3 hafta önce) yaparak flashing etki sağlanabilir. Gebeliğin ilk üç haftasında da benzer düzeyde beslenme uygulanmalı ve gebeliğin son 55-60 gününe kadar önceki kondisyonu düşürmeyecek şekilde beslenme yapılmalıdır. Gebeliğin son döneminde gittikçe artan oranda konsantre yem (250-450gr/gün/gebe keçi) verilebilir. Kaliteli kaba yem ilavesi yaparak hayvanların bu dönem içinde canlı ağırlıklarında %8-10 civarı bir artış sağlanmaya çalışılır. Bu kazancın genellikle hepsi doğumda verilir (Çolpan, 2006).

### **1.3.2. Süperovulasyon**

Gonadotropin uygulaması ile dişinin ırk özelliğine göre her östrusta normal olarak ürettiği sayıdan daha fazla ovum üretmesini sağlamak için uygulanan işlem süperovulasyondur. Bu işlem ile uygulama sonunda yüksek oranda fertilizasyon ve çok sayıda embriyo elde etmek amaçlanır (Bowen, 2003). Bu amaçla FSH, PMSG ve hMG (İnsan Serum Gonadotropini) gibi gonadotropinler kullanılmaktadır (Kaymaz, 2012). Hayvanların süperovulasyona verecekleri yanıt ırk, yaş, genel kondüsyon, hormon tipi, uygulama şekli, iklim, beslenme ve çevresel koşullar gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Akyol ve ark., 2004; Kaymaz, 2012) ve bu faktörlerin etkilerini değerlendirmek neredeyse imkânsızdır. Uygulama sonrası alınacak cevaplar tahmin edilemeyeceği için embriyo üretim programlarında en kritik basamak süperovulasyondur (Amiridis ve Cseh, 2012).

Süperovulasyon protokolüne alınan yanıt; folikülogenezis, ırk, aşım sezonu, beslenme, ovaryum üzerindeki folikül ve Cl varlığı, tekrarlayan süperovulasyon çalışmalarına bağlı olarak etkilenmektedir (Ağaoğlu ve ark., 2014).

### **1.3.2.1. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)**

Gonadotropin Salgılatıcı Hormonun etkisiyle adenohipofizden FSH, foliküllerin gelişimi, antrum oluşumu ve östrojen salınımı için gereklidir (Alaçam, 2007). FSH, gelişen foliküllerin teka interna ve granuloza hücrelerinden başta  $\beta$ -östradiol olmak üzere östrojenlerin salınımını uyarır. Östrojen, foliküllerin gelişiminde FSH'ya yardım eder. Kanda östrojen konsantrasyonu arttıkça, FSH salınımı azalır ve LH etkin hale geçer (Akyol, 2001).

Embriyo transferi çalışmalarında çeşitli FSH preparatları kullanılmakta ve bunlar değişen oranlarda LH etkisi de göstermektedir. Ancak son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte saf FSH preparatları (rekombinant FSH) ya da minimum dozda LH içeren FSH preparatları at, domuz veya koyun hipofiz bezi ekstraktından elde edilmektedir. Hormonun elde edilme yönteminden dolayı pahalı olması, yarılanma ömrünün kısa olması (3-4 saat) nedeniyle 12 saat arayla uygulama tekrarı gerektirmesi FSH etkili diğer preparatlara göre dezavantaj oluşturmaktadır (Gordon, 2004; Kaymaz, 2012). Yapılan çalışmalarda süperovulasyon uygulamalarında FSH'nın PMSG'den daha etkili olduğu bildirilmektedir (Cognie, 1999; Menchaca ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada anöstrus dönemindeki Ankara ve Kilis Keçilerinde FSH ile yapılan süperovulasyon yanıtlarına bakıldığında, senkronizasyon oranları ve ovaryumlardaki Cl oranları arasında fark olmadığı ancak transfer edilebilir embriyo oranlarında önemli farklılık olduğu belirtilmektedir (Taşdemir ve ark., 2011).

### **1.3.2.2. Gebe Kısırak Serum Gonadotropini (PMSG/eCG)**

PMSG hem FSH hem de LH'nın biyolojik özelliklerini bir arada bulunduran 43-63 kda molekül ağırlığına sahip glikoprotein yapıda bir hormondur (Kaymaz, 2012). Gebe kısırakların serumlarından elde edilen plasenta kaynaklı bir gonadotropindir. Kısıraklarda endometriyal kapları oluşturan özel trofoblast hücrelerden gebeliğin 40-

50. günleri arasında salınmaya başlar ve gebeliğin 60-80. günlerinde en yüksek düzeye ulaşır (Yılmaz, 1999; Alaçam, 2007).

Gebe Kısırak Serum Gonadotropinin yarılanma ömrü sığırlarda 40 saat, keçilerde ise 10-15 saattir. Bu nedenle keçilerde süperovulasyon protokollerinde beklenen cevaplar alınamamaktadır (Holtz, 2005; Kaymaz, 2012). Tekrarlayan PMSG uygulamalarıyla yapılan süperovulasyon çalışmalarında, PMSG'ye karşı antikor oluşumundan dolayı düşük fertilitte oranları ile karşılaşılmaktadır (Baldassarre ve Karatzas, 2004; Amiridis ve Cseh, 2012). Yapılan birçok çalışmada keçilerde süperovulasyon protokollerinde FSH kullanımının PMSG (eCG) ve hCG kullanımından daha etkili olduğu vurgulanmaktadır (Cognie, 1999; Menchaca ve ark., 2007).

### **1.3.2.3. İnsan Menapozal Gonadotropin (hMG)**

Pubertasa erişmiş bir dişide gonadotropik hormonların etkisiyle folikül gelişimi başlar ve bu foliküllerden östrojen salınımıyla kan E<sub>2</sub> konsantrasyonu artar. Bu artışa bağlı olarak FSH ve LH salınımı baskılanır ve kandaki düzeyleri azalır. Menopoz sonrası kadınlarda östrojen salınımı önemli ölçüde düşer ve FSH ile LH salınımı baskılanmadığı için kandaki ve idrardaki seviyeleri 4-10 kat artar (Yılmaz, 1999).

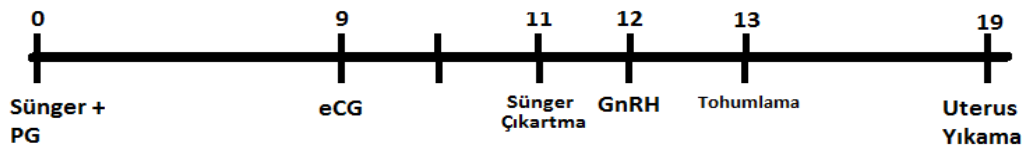
Menopoz sonrasındaki bir kadının idrarından elde edilen bu gonadotropin süperovulasyon amacıyla kullanılabilir (Akyol, 2001). Süperovulasyon yanıtı PMSG'ye benzerlik göstermekte ancak erken luteal regresyona neden olduğu için kullanılmamaktadır (Amiridis ve Cseh, 2012).

### **1.3.2.4. Süperovulasyon Protokolleri**

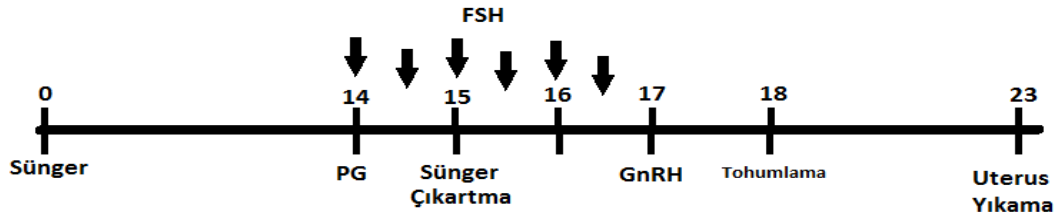
Keçilerde genellikle süperovulasyon protokolleri, progestagen içeren vaginal sünger ya da araçların (Sünger, CIDR) intravaginal olarak 9-11 gün süreyle uygulanması ve

bunun uzaklaştırılmasından 24-48 saat önce gonadotropinlerin uygulanması ile yapılmaktadır (Cognie, 1999; Lehloenya, 2008; Paramio, 2010; Taşdemir ve ark., 2011; Ağaoğlu ve ark., 2014). Bu amaçla, FSH altı yada sekiz bölünmüş doz halinde ve 3-4 gün süreyle azalan dozlarda; PMSG ise seksüel siklusun 16. gününde tek enjeksiyon tarzında uygulanır. Gonadotropin uygulamasını takiben 24-72 saat sonra  $PGF_{2\alpha}$  enjeksiyonu yapılır ve bunu izleyen 24-36 saat içinde östruslar gözlenir (Tekeli, 2007).

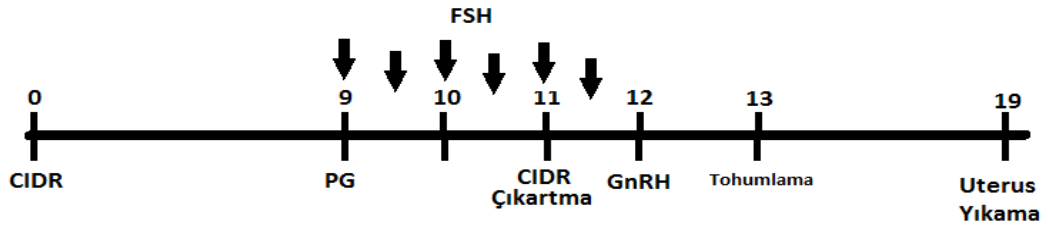
Embriyo elde etmek için yapılan farklı araştırmacıların çalışmalarında özetlenen süperovulasyon protokolleri şematik olarak aşağıda açıklanmıştır (Şekil 1.3, 1.4 ve 1.5).



Şekil 1.3. Cognie'nin uyguladığı süperovulasyon protokolü (Cognie, 1999).



Şekil 1.4. Lehloenya'nın uyguladığı süperovulasyon protokolü (Lehloenya, 2008).

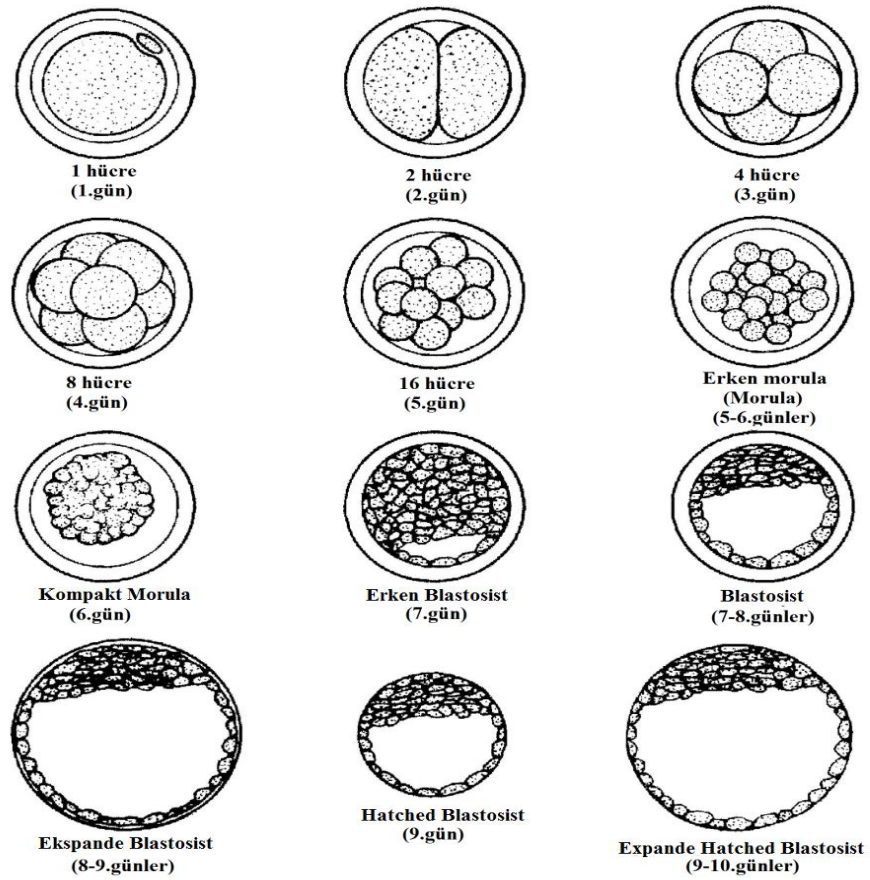


Şekil 1.5. Ağaoğlu ve ark.'nın uyguladığı süperovulasyon protokolü (Ağaoğlu ve ark., 2014).

## **1.4. Keçilerde Embriyo Gelişimi ve İn Vivo Embriyo Eldesi**

### **1.4.1. Embriyo Gelişimi**

Doğal aşım ya da suni tohumlama sonrası oositin döllenmesiyle oluşan zigot, ilk beş günlük süreçte oviduktan uterusu doğru hızla bölünerek göç eder ve bölünmeler sonucu embriyo oluşur. Zigotun bölünen her bir hücrelerine blastomer adı verilir. Fertilizasyondan sonraki 5. günde blastomerler arasında sıkı bağlantılar oluşur ve kompakt bir hal alır. Bu aşamadaki embriyoya “morula” denmektedir. Blastomerler arasında bağlantıların gelişmesiyle büzüşme başlar ve perivitellin boşlukta artış meydana gelerek kompakt bir yapı oluşur (Kompakt Morula) ve blastomerler bireysel olarak ayırt edilemeyecek hale gelir. Perivitellin boşlukta meydana gelen artış sonrası embriyoda ozmotik basınç değişir ve hücre dışından hücre içine sodyum geçişiyle hücre kümesinin alt kısmında biriken sıvıya bağlı olarak blastosist kavitesi şekillenir. Bu aşama “erken blastosist” olarak adlandırılır ve oluşan kavite embriyonun %50’sinden daha azdır. Bu kavite artmaya başladığında embriyo “blastosist” (7-8 gün) adını alır. Ozmotik basıncın artmasına paralel olarak embriyo kavitesi genişlemeye devam eder ve embriyonun dışındaki “zona pellucida” adı verilen zar gerilir ve incilir. Bu durumdaki embriyoya ise “expanded blastosist” (8-9 gün) adı verilir. Fertilizasyon sonrası 9-11. günlerde zona pellucida yırtılır ve embriyo zonadan dışarı çıkar ve “hatched blastosist” olarak adlandırılır (Şekil 1.6) (Gordon, 1997; Gordon, 2004; Kaymaz, 2012).



**Şekil 1.6.** Embriyo Gelişim Aşamaları (Kaymaz, 2012).

#### 1.4.2. Embriyoların İn Vivo Elde Edilmesi

İn vivo olarak elde edilen embriyolar çiftleşmeyi takip eden 6-8 gün sonra uterus kornularının bir vasat yardımıyla yıkanmasıyla (Flushing) elde edilmektedir (Paramio ve Izquierdo, 2014). Uterusun yıkanması laparotomik, laparoskopik ve servikal olmak üzere 3 farklı şekilde yapılabilmektedir (Paramio, 2010).

##### 1.4.2.1. Laparotomik Yöntem

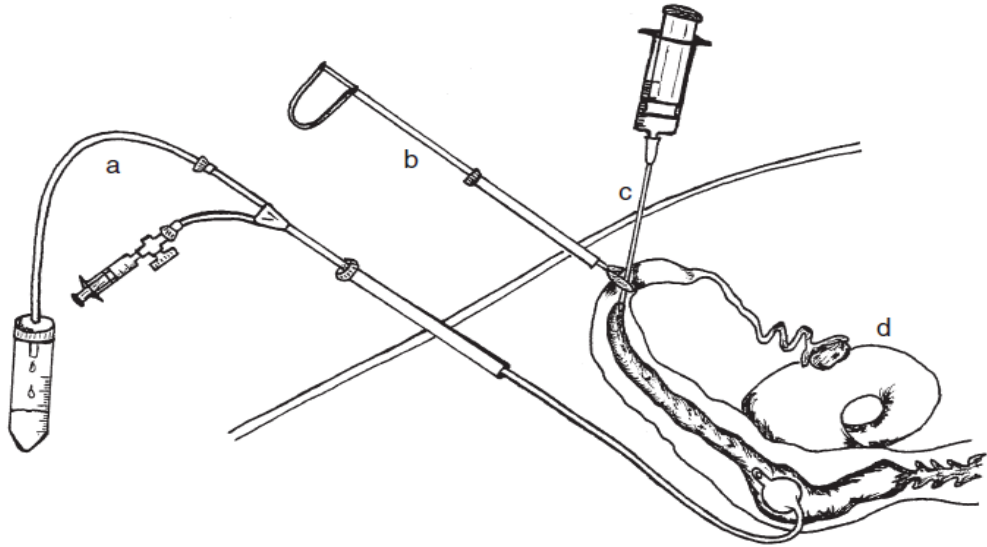
Çiftleşmeyi takip eden 6-7 günde verici hayvanlara genel anestezi altında ventral-laparotomi yapılır ve uterus kornularına katater yerleştirilerek yıkama yapılır. Elde



edilen yıkantıda embriyolar aranarak değerlendirilir (Holtz, 2005; Tekeli, 2007; Paramio, 2010). Bu yöntemde ovidukt ve uterus dışarı alınarak yıkandığı için embriyo elde etme oranı oldukça yüksektir (Ishwar ve Memon, 1996). Bu prosedür her bir keçi için 2-3 kez uygulanabilmektedir. Yapılan uygulamayı takiben yapışmalar şekillendiği için tekrarlanmaları sınırlamaktadır (Paramio, 2010).

#### 1.4.2.2. Laparoskopik Yöntem

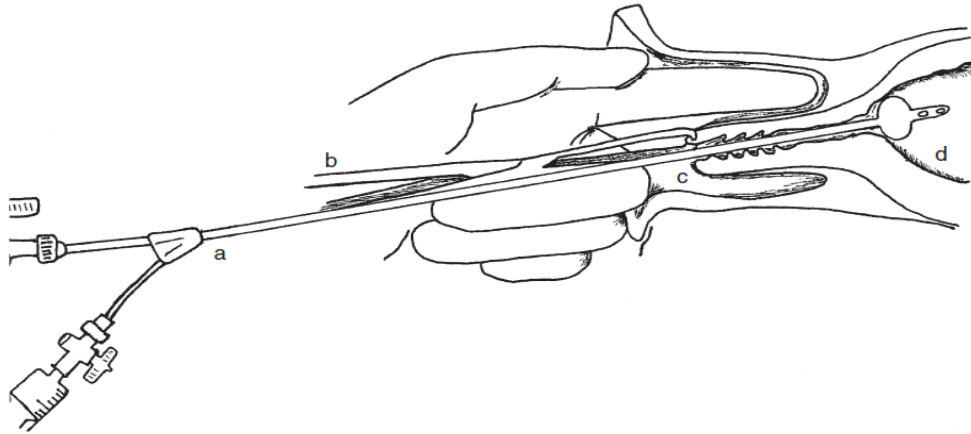
Yapılacak operasyondan 36 saat önce hayvanlar aç ve susuz bırakılmalıdır. Genel anestezide alınan hayvanlar 45 derecelik açıyla baş aşağı yatırılır ve periton içine yaklaşık 4-5 lt CO<sub>2</sub> gazı verilerek pneumoperitoneum oluşturulur. Yapılan bir ensizyon ile uterus kornuları tutulur ve dışarı alınır. Utero-tubal birleşim yerine yakın kornu uterusun uç kısmına katater yerleştirilerek yıkama yapılır (Şekil 1.7) (Ishwar ve Memon, 1996). Bir hayvanda laparotomik yöntemle embriyo toplama işlemi 2-3 kez uygulanabilirken laparoskopik yöntem ile embriyo toplama işlemi 7 kez tekrarlanabilmektedir (Paramio, 2010).



**Şekil 1.7.** Keçilerde laparoskopik embriyo toplama işlemi. a, Balon folley katater ve toplama tüpü; b, laparoskopik atravmatik yakalama forsepsi; c, intravenöz katater (18 gauge, 40 cm); d, kornu uteriler (Flores-Foxworth, 2007).

### 1.4.2.3. Servikal Yöntem

Laparotomik ve laparoskopik yöntemler sonrasında genellikle genital organ ve dokularda yapışmalar meydana gelmektedir. Oluşan yapışmalar verici hayvanların daha sonraki kullanımını sınırlamaktadır. Servikal yöntemde serviksin PGE<sub>2</sub> ve östradiol ile gevşemesi sağlandıktan sonra embriyolar serviks yoluyla toplanabilmektedir (Şekil 1.8). Uygulama için genel anestezi altında servikal genişletici yardımıyla PGE<sub>2</sub> tabletleri izotonik tuzlu solüsyonda eritilerek servikse sürülür ve aynı zaman kas içi östradiol uygulanır. Yıkama için üç yollu katater kullanılır. Östradiol ve PGE<sub>2</sub>'nin embriyoların canlılıkları üzerine olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Ishwar ve Memon, 1996). Östradiol'ün kullanımı yasak olduğu için ülkemizde bu uygulama yapılamamaktadır.



**Şekil 1.8.** Keçilerde servikal yöntemle embriyo toplama işlemi. a, katater; b, allis doku forsepsi; c, vagina; d, korpus uteri (Flores-Foxworth, 2007).

### 1.4.3. Embriyoların Değerlendirilmesi

Embriyoların değerlendirilmesi, Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğu (IETS) tarafından belirtilen kriterlere uygun olarak gelişim dönemlerine ve kalitesine uygun olarak yapılmaktadır. Gelişme dönemlerine göre 1'den 9'a kadar (Çizelge1.3) değerlendirilmektedir (Kaymaz, 2012). Değerlendirme işlemi çoğunlukla stereo mikroskop kullanılarak yapılmaktadır.

**Çizelge 1.3.** Embriyonun gelişim aşamalarında numaralandırma ve kısaltmaları (Kaymaz, 2012).

Değerlendirme	Gelişim Aşaması	Uluslararası Kısaltma
1	Fertilize olmamış	UFO
2	2-12 hücreli aşama	
3	Erken morula	M
4	Morula (Kompakt morula)	CM
5	Erken blastosist	EBl
6	Blastosist	Bl
7	Ekspanded blastosist	ExpBl
8	Hatched blastosist	HedBl
9	Ekspanded hatched blastosist	ExpHedBl

Embriyoların kalitesi ise embriyonun morfolojisine göre değerlendirilmektedir. Sınıflandırma embriyonun yapısı, sitoplazmanın dansitesi, rengi ve dejenere alan oranına göre 1'den 4'e kadar derecelendirilerek yapılmaktadır (Kaymaz, 2012).

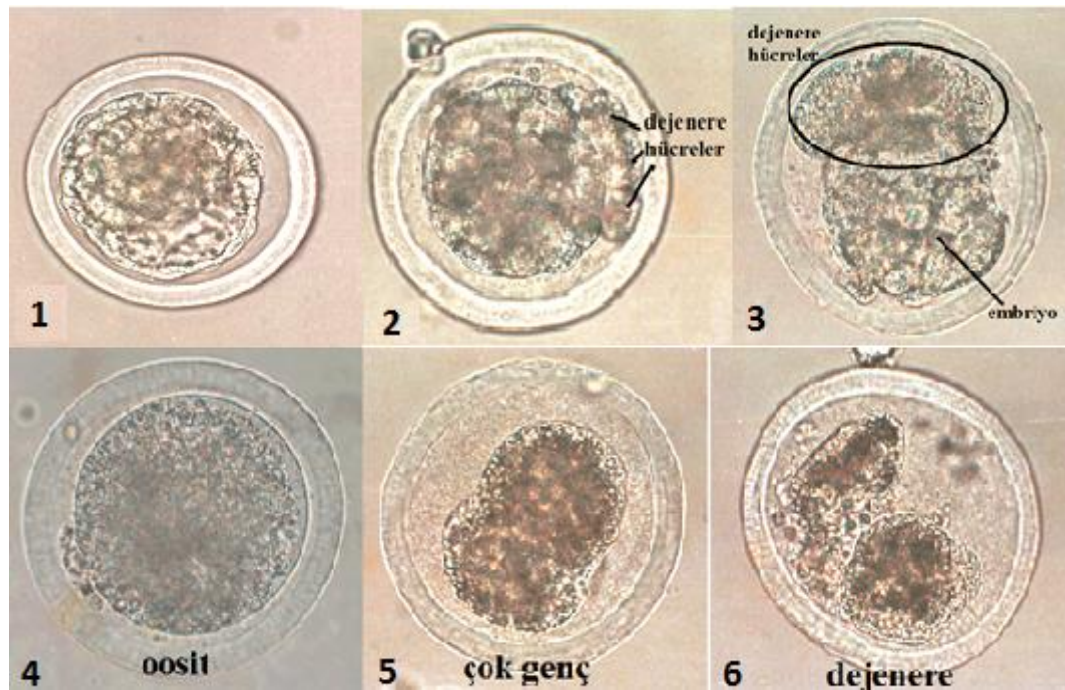
**Kod 1 (Çok İyi veya Güzel):** Embriyo küme şeklinde, gelişim dönemlerine göre uyumlu, blastomerler yuvarlak şekilli, üniform büyüklük, renk ve yoğunluktadır. Hücreler arasındaki düzensizlik çok düşük seviyede, yaşayan embriyonik hücre oranı %85 ve üzerindedir. Zona pellusida yuvarlaktır (Şekil 1.9.1). Bu embriyolar transfer edilebilir ve dondurulabilir (Robertson ve Nelson, 2010; Kaymaz, 2012).

**Kod 2 (İyi):** Embriyoda ve blastomerlerde büyüklük, renk ve yoğunlukta orta seviyede düzensizlikler olabilmektedir. Bu düzensizlikler, embriyo kütlesi dışında kalmış, küçük ve az sayıda hücreler veya hafif düzeyde asimetrik şekillidir. Embriyoda yaşayan hücre oranı %50'dir (Şekil 1.9.2). Embriyolar transfer edilebilir veya dondurulabilir (Robertson ve Nelson, 2010; Kaymaz, 2012).

**Kod 3 (Sağlıksız):** Embriyonik kütlede ya da blastomerlerin büyüklük renk ve yoğunluğunda fazla miktarda düzensizlikler bulunmaktadır. Bunlar, çok sayıda

embriyo kütlesi dışında kalmış hücreler, normalden küçük büyüklük, az miktarda dejenerasyon ve gelişimde bir güne kadar gecikme gibi anormalliklerdir. Embriyonik hücrelerin %25'i yaşayan hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 1.9.3). Kültür sonrası transfer edilebilir ya da dondurulabilir (Robertson ve Nelson, 2010; Kaymaz, 2012).

**Kod 4 (Ölü veya dejenere):** Önemli derecede dejenerasyon, veziküllü hücreler, embriyo hücrelerinin büyüklüklerinde önemli değişiklikler, kompaktlaşmanın gerçekleşmemesi ve aynı zamanda embriyonun gelişiminde 2 güne kadar gecikme gibi bozukluklara sahip embriyolardır (Şekil 1.9.4, Şekil 1.9.5, Şekil 1.9.6). Dejenere embriyolar, oositler ve bir hücreli embriyolar ölü olarak değerlendirilmektedirler ve kullanılamazlar (Robertson ve Nelson, 2010; Kaymaz, 2012).



**Şekil 1.9.** Embriyoların morfolojilerine göre değerlendirilmesi. 1, çok iyi (Kod 1); 2, iyi (Kod 2); 3, sağlıklı (Kod 3); 4-5-6, ölü veya dejenere (Kod 4) (Kaymaz, 2012).

#### 1.4.4. Embriyoların Dondurulması

Embriyoların dondurularak saklanması (kriyoprezervasyonu), memeli reproduksiyonunun kontrolü ve manipülasyonu için kullanılan yardımcı üreme tekniklerinin en önemlisidir ve birçok avantaja sahiptir (Martinez ve ark., 2006). Üstün niteliklere sahip hayvanlardan elde edilen embriyolar dondurularak başka bölgelere kolayca transfer edilebilirler ve genetik ıslah çok hızlı gelişir. Uluslararası hayvan ticaretinde, canlı hayvanların taşınmasından donmuş embriyoların taşınması daha kolaydır. Taşıma sırasında hastalıkla ya da ölümlerle karşılaşma riski yoktur. Ayrıca taşıyıcı hayvanlarda senkronizasyona gerek duyulmadan transfer yapılabilmektedir. Aynı zamanda embriyoların dondurulması gen kaynaklarının korunması ve devamlılığı açısından çok önemli bir yöntemdir (Gordon, 2003; Amiridis ve Cseh, 2012; Kaymaz, 2012).

IETS'nin son beş yıla ait verilerine bakıldığında transfer edilen sığır embriyolarının neredeyse yarıya yakın bir kısmının dondurulmuş olduğu görülmektedir. Koyun ve keçilere ait transfer verilerine bakıldığında ise kayıtların düzenli tutulmamasından dolayı doğru sayılara erişilemediği düşünülmektedir (Çizelge 1.4) (Perry, 2014).

**Çizelge 1.4.** 2008-2012 yılları arasında siğir, koyun ve keçilere transfer edilen taze ve dondurulmuş embriyo sayıları (Perry, 2014).

		2008	2009	2010	2011	2012
<b>Siğir</b>	<b>Taze</b>	242 006	243 885	263 036	248 193	209 071
	<b>Donmuş</b>	297 677	291 279	327 525	324 149	296 805
<b>Koyun</b>	<b>Taze</b>	4 793	1 326	26 480	13 383	8 124
	<b>Donmuş</b>	433	408	2 598	436	4 120
<b>Keçi</b>	<b>Taze</b>	824	206	1 619	2157	979
	<b>Donmuş</b>	278	146	14	0	34

Embriyoların dondurularak saklanmasında amaç, embriyonun dondurulduğu andaki hali ile kalmasını ve çözündürme işlemi sonrası canlılığına devam etmesini sağlamaktır. Embriyoların düşük ısılarda korunmasıyla hücre içi enzim aktivitesi, hücresel respirasyon, metabolizma, gelişim ve bölünme gibi birçok olay neredeyse tamamen durmaktadır. Sonuçta; hücrenin fizyolojik aktivitesi belirgin bir şekilde durdurulmakta ve çok uzun süre yaşama yeteneğine zarar vermeden ve genetik bozukluklara neden olmadan korunabilmektedir. Sperma ve embriyolar için  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de yüzlerce yıl direkt radyasyona maruz kalmaları dışında koruma sağlanacağı düşünülse de ticari üreticiler en fazla birkaç yıl süreli korumayı tercih etmektedir (Kaymaz, 2012).

Kriyoprezervasyon stratejileri kriyoprotektan maddeler ve soğutma-çözündürme oranları olmak üzere iki temel prensibe dayanır (Vajta ve Kuwayama, 2006; Kaymaz, 2012). Kriyoprotektan maddeler, dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan

kimyasallardır. Kriyoprotektan maddeler temel olarak hücre içine girebilenler (intrase ll ler) ve hücre içine giremeyenler (ekstrasellüler) olmak üzere iki ayrı grupta değerlendirilmektedir (Kaymaz, 2012).

Intrase ll ler kriyoprotektanlar düşük molekül ağırlığına sahiptir. Embriyo donmadan önce ozmotik basınc farkından dolayı embriyo içindeki sıvı ile kriyoprotektan maddeler yer değiştirerek embriyoda dehidrasyona neden olurlar. Bu sayede embriyo içinde buz kristali oluşumu engellenmiş olur (Palasz ve Mapletoft, 1996; Sağırkaya ve Bağış, 2003; Kaymaz, 2012). Dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol (EG), propilen glikol (PG), polietilen glikol (PEG) ve etanol intrase ll ler kriyoprotektan maddeler arasında yer almaktadır (Kaymaz, 2012).

Ekstrasellüler kriyoprotektanlar ise molekül ağırlıklarına göre kendi içinde ikiye ayrılmaktadır. Glikoz, sükroz, rafinoz ve galaktoz gibi bazı şekerler düşük molekül ağırlıklı; polivinil alkol (PVA), polivinil pirolidon (PVP) ve sodyum hyaluronat gibi polimerler ise yüksek molekül ağırlıklı ekstrasellüler kriyoprotektan maddelerdir (Palasz ve Mapletoft, 1996; Sağırkaya ve Bağış, 2003; Kaymaz, 2012). Düşük molekül ağırlıklı şekerler, dondurma  z d rme sırasında hücre içine girmeden hücreler arası suyu çekerek hücre zarı ve sitoplazmasını korumakta,  z d rme işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir. Yüksek molekül ağırlıklı polimerler ise embriyolar dondurulup  z d r l rken oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak biçimde değiştirirler (Palasz ve Mapletoft, 1996; Sağırkaya ve Bağış, 2003; Amiridis ve Cseh, 2012; Kaymaz, 2012).

Embriyo dondurma işlemi sırasında, hücreyi daha fazla korumak için düşük molekül ağırlığına sahip intrase ll ler kriyoprotektanlar, düşük molekül ağırlığına sahip ekstrasellüler kriyoprotektanlar ile birlikte kullanılmalıdır (Palasz ve Mapletoft, 1996).

Keçi embriyolarının dondurulma yöntemleri de sığırlarda başarılı bir şekilde kullanılan yöntemlere benzerdir. Gliserol (Puls-Kleingeld ve ark., 1992; Nowshari ve Holtz, 1995) ve DMSO (Li ve ark., 1990)'nun başarılı kullanımları da bildirilmiş olmasına rağmen en fazla kullanılan kriyoprotektan etilen glikoldür (Le Gal ve ark., 1993; Fieni ve ark., 1995). Uygun şartlar altında dondurulmuş blastosistin transferinden sonra gebelik oranı %45-80 arasındadır ve bu oran hayvan başına transfer edilen embriyo sayısına bağlı olarak artırılabilir (Holtz ve ark., 2000; Holtz, 2005).

Embriyo dondurmak amacıyla geleneksel yavaş dondurma (Slow freezing), hızlı dondurma (Rapid freezing) ve vitrifikasyon olmak üzere kullanılan üç farklı yöntem vardır. İlk başlarda embriyolar dondurulurken yavaş dondurma yöntemi kullanılmıştır. Fakat bu yöntemde kullanılan cihazlar çok pahalıdır ve işlemin tamamlanması uzun sürmektedir. Hızlı dondurma işleminde en az iki farklı kriyoprotektan madde ile embriyolar dondurulurken yüksek donma hızları kullanılmaktadır. Son yıllarda embriyo dondurma işleminde vitrifikasyon yöntemi oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde özel bir cihaza ihtiyaç duyulmamakta ve çok hızlı bir biçimde embriyo dondurulabilmektedir (Sağırkaya ve Bağış, 2003; Vajta ve Kuwayama, 2006; Amiridis ve Cseh, 2012; Kaymaz,2012).

#### **1.4.4.1. Geleneksel Yavaş Dondurma (Slow – Freezing)**

Yavaş dondurma protokolü standart, geleneksel ya da dengeli dondurma yöntemi olarak da bilinmektedir (Kaymaz, 2012) ve embriyolar daha düşük konsantrasyondaki kriyoprotektan maddeler (etilen glikol, gliserol, DMSO, propilen glikol) ve programlanabilir bir dondurma cihazı vasıtasıyla dondurulmaktadır (Palasz ve Mapletoft, 1996).





**Şekil 1.10.** Embriyo Dondurma Cihazı (Putro, 2011).

Dondurma işleminde ilk olarak; embriyo ile kriyoprotektan madde arasındaki ozmotik dengeyi sağlamak amaçlanır. Embriyo 1-2 M konsantrasyondaki dondurma solüsyonunda oda sıcaklığında 10-30 dk bekletilir. Payet içerisindeki embriyo, dondurma cihazına (Şekil 1.10) alınarak sıvı azotta soğutulmuş bir penset yardımıyla kristalizasyonun başlaması (seeding) sağlanır. Cihaz içerisindeki sıvının derecesi  $-5/-9$  °C'ye ulaştıktan sonra cihazın ısısı, dakikada ortalama  $0,3-0,6$  °C azalacak şekilde ayarlanır ve  $-30/-35$  °C'ye kadar kontrollü olarak düşürülerek dondurma işlemi gerçekleştirilir. Bunu takiben dondurulan payet sıvı azot tankına alınır ve muhafaza edilir (Palasz ve Mapletoft, 1996; Mukaidai ve Kasai, 2004; Kaymaz, 2012; Kruse, 2012).

Yavaş dondurma yönteminde embriyolar kriyoprotektan maddelerin toksik etkisine uzun süre maruz kalmaktadır ve intrasellüler buz kristalizasyonundan dolayı zona pellusida'da kırılma, hücre membranları ile iskelette bozulma ve metabolik problemler oluşmaktadır. Bu oluşan hasarlar nedeniyle hücrede apoptozis ve nekroz meydana gelmektedir (Mukaidai ve Kasai, 2004; Vajta ve Kuwayama, 2006).

#### **1.4.4.2. Hızlı Dondurma (Rapid - Freezing)**

Hızlı dondurma yöntemi, yavaş dondurma yöntemine göre daha basit, ekonomik ve zaman kazandıran bir yöntemdir (Cseh ve ark., 1997). Bu yöntemde intrasellüler (gliserol, DMSO, EG) ve ekstrasellüler (sükroz, laktoz, galaktoz) kriyoprotektanların karışımı kullanılarak dondurma solüsyonları hazırlanır ve embriyolar dehidre edilir. Dehidrasyon işleminin tamalanmasının ardından payetler 5 dk sıvı azot buharında tutulduktan sonra sıvı azot içerisine daldırılırlar. Bu protokolda uygun çözdürme işlemi yapılmazsa, hücre içi buz kristalleri embriyoya zarar verebilir (Cseh ve ark., 1997; Sağırkaya ve Bağış, 2003). Dondurma başarısı yüksek olmasına rağmen pratikte çok kullanılan bir yöntem değildir (Kaymaz, 2012).

#### **1.4.4.3. Vitrifikasyon**

Vitrifikasyon (camlaşma, cam benzeri yapı haline gelme); hücre, doku ve organların düşük sıcaklıklarda tamamen camsı bir hale getirilmesi işlemidir (Palasz ve Mapletoft, 1996; Vajta, 2000; Sağırkaya ve Bağış, 2003; Kaymaz, 2012). Bu protokolda embriyolar yüksek oranda kriyoprotektan madde içeren vitrifikasyon solüsyonu içerisinde buz kristalizasyonunun önlenmesi için hızlı bir biçimde dondurularak (2500°C/dk) cam benzeri bir yapıda korunur (Vajta, 2000; Sağırkaya ve Bağış, 2003, Amiridis ve Cseh, 2012; Kaymaz, 2012).

Vitrifikasyon sürecinde embriyo dehidre edilirken, çözdürme sırasında kaybettiği suyu tekrar geri kazanır. Vitrifikasyon yönteminin düşük maliyetli oluşu, programlanabilir herhangi bir dondurma cihazına ihtiyaç duyulmaması, dondurma işlemi sırasında embriyoda buz kristali oluşumunu baskılaması ve oldukça kısa bir sürede tamamlanması gibi avantajları bulunurken, kullanılan tekniğe bağlı olarak çözdürme sırasında çoğunlukla stereo mikroskoba ihtiyaç duyulması, kriyoprotektanların uzaklaştırılması için farklı molaritelerdeki dilüsyon solüsyonlarına

ihtiyaç duyulması, kriyoprotektan maddenin oldukça konsantre olması nedeniyle hücrelere toksik etki yapma ihtimali gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Vajta, 2000; Kaymaz, 2012).

Vitrifikasyonda, embriyolar farklı konsantrasyondaki vitrifikasyon solüsyonlarıyla (VS1, VS2, VS3) ekilibre edilirler ve her bir solüsyonun kriyoprotektan madde konsantrasyonu diğerine göre daha yüksektir. Bu artışa bağlı olarak embriyo üzerinde oluşabilecek toksik etkilere karşı ekilibrasyon süresi azalmaktadır. Embriyoların VS1 ve VS2’de bekleme süresi 3 dk iken VS3’te kalma süresi yaklaşık 30 sn’dir (Çizelge 1.5) (Kaymaz, 2012).

**Çizelge 1.5.** Vitrifikasyon vasatlarında kullanılan kimyasalların oranları ve ekilibrasyon süreleri (Kaymaz, 2012).

	Gliserol	Etilen glikol	Ekilibrasyon süresi
<b>VS1</b>	-	%20	3 dakika
<b>VS2</b>	%10	%20	3 dakika
<b>VS3</b>	%25	%25	30 saniye

Vitrifikasyon 0,25 ml’lik payetlerin, yüksek donma hızında sıvı azot içerisine doğrudan daldırılmasıyla sağlanmaktadır (Vajta, 2000; Sağırkaya ve Bağış, 2003, Kaymaz, 2012). Bu tekniğe alternatif olarak geliştirilen “Open Pulled Straw” (OPS) tekniğinde embriyo 1 µl kriyoprotektan solüsyonu ile birlikte payetin açık olan ucuna bırakılarak vitrifiye edilmektedir. Yapılan çalışmalarda daha iyi sonuçların alınacağı vitrifikasyon teknikleri (cryo-top, cryo-loop, cryo-lock, elektron mikroskobik grids, cryoleaf, solid surface vitrifikasyon, vitri-ingo) geliştirilmektedir (Vajta, 2000; Holtz,2005; Vajta ve Kuwayama, 2006; Amiridis ve Cseh, 2012; Kaymaz, 2012; Vajta, 2013).

Vitrifikasyon işlemi için embriyonun en uygun gelişme dönemi blastosist aşamasıdır (Holtz, 2005). Yavaş dondurma, hızlı dondurma ya da vitrifikasyon yöntemi ile embriyo dondurulurken, blastosistlerin morula aşamasındaki embriyolara göre daha fazla yaşam oranına sahip olduğu bildirilmiştir (Palasz ve Mapletoft, 1996). Eğer embriyo morula aşamasında bu teknikle dondurulacaksa blastosist aşamasına kadar kültüre edilmesi önerilmektedir (Holtz, 2005).

#### **1.4.5. Embriyoların Çözdürülmesi**

Embriyo çözme protokolü dondurma protokolüne uygun olarak seçilmelidir. Çözme işleminde dikkat edilmesi gereken nokta embriyoya zarar verecek olan kriyoprotektan maddelerin hızla embriyodan uzaklaştırılmasıdır (Kaymaz, 2012). Dondurulmuş embriyonun çözülmesi oldukça kolay ve hızlı bir işlemdir. Sıvı azottan çıkarılan payetler 5-10 sn süreyle havada ve 20-30 sn süreyle 30°C'deki su banyosunda tutulur. Çözme işlemi sadece havada yapılırsa embriyonun yaşam kalitesi azalır, sadece suda yapılırsa zona pellusida hasarı ile karşılaşılır (Youngs ve ark., 2010; Kaymaz, 2012). Çözme işleminde, kriyoprotektan madde hücre dışına çıkarken embriyonun zarar görmemesi için hücre membranını stabilize etmek amacıyla sığır serum albumin (BSA), betamerkaptoetanol ( $\beta$ ME), linoleik asit albumin (LAA) gibi membran koruyucular kullanılmaktadır (Kaymaz, 2012).

Payetteki embriyo dondurulurken payette bulunan 1M konsantrasyondaki sükröz ile temas halinde değildir. Fakat çözme işlemi sırasında temas etmeleri nedeniyle sükrözün toksik etkisine maruz kalabilir. Çözme işleminden hemen sonra petriye aktarılan embriyoların bulunduğu vasattan sükrözün uzaklaştırılması için, embriyo 0,5 ve 0,25 M'lık sükröz çözeltilerinde dilüe edilerek toksisitesi azaltılmalıdır (Sağırkaya ve Bağış, 2003; Youngs ve ark., 2010; Kaymaz, 2012).

### 1.5. Embriyo Transferi

Embriyo transferi (ET), sağlıklı ve yüksek verimli dişilerden elde edilen embriyoların taze veya dondurulup çözdürülerek uygun siklus dönemindeki dişi hayvanların uterusuna uygun teknik ve hijyenik koşullarda aktarımını ifade eder. Embriyo transferi sığırlarda genetik ilerleme için çok önemli olmasına rağmen, keçilerde çok yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bunun temel sebebi keçilerin ekonomik değerinin daha düşük olması, embriyo toplanması ve transferi ile ilgili teknikte büyük güçlüklerin olmasıdır. Farklı ET yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen bu yöntemlerde hala genel anestezi, uyarlanmış ekipman ve teknik başarıya gerek duyulmaktadır (Holtz, 2005).

Başarılı bir ET için embriyonun gelişim döneminin uygun olması ve taşıyıcı hayvanın iyi senkronize edilmesi çok önemlidir. Optimum gebelik oranına ulaşmak için senkronizasyon farkının en fazla 24 saat olması gerektiği bildirilmiştir (Ishwar ve Memon, 1996; Oppenheim ve ark., 2000; Holtz, 2005). Embriyo transferi yapılmadan önce taşıyıcı hayvanlarda fonksiyonel Cl'nin indikatörü olan plazma progesteron düzeyinin saptanması ya da Folikül sayısının ve boyutunun ultrasonografi ile ölçülmesi ve transfer zamanının buna göre belirlenmesi başarı şansını büyük ölçüde etkilemektedir (Lassala ve ark., 2004; Holtz, 2005).

Embriyolar, taşıyıcı hayvanlara laparotomik, laparoskopik ya da cerrahi olmayan (transservikal) teknik kullanılarak transfer edilebilir (Flores-Foxworth, 2007; Lehloenya, 2008). Her bir alıcıya 1-2 adet embriyo, Cl varlığına göre transfer edilmektedir. Eğer sadece bir ovaryumda birden fazla Cl varsa tek kornuya iki embriyo transfer edilebilir. Her iki ovaryumda da Cl varsa iki kornuya birer adet olacak şekilde ET gerçekleştirilir (Ishwar ve Memon, 1996; Lehloenya, 2008).

Keçilerde embriyolar genellikle ovidukta ya da kornu uteriye transfer edilir. Laparotomik transferde orta hat ensizyonu ile reproduktif organlar rahatlıkla

muayene edilebilir ve ovaryumlar Cl varlığı yönünden kontrol edilebilir. Fakat son yıllarda koyun ve keçi embriyo transferinde kolay, güvenli ve hızlı bir teknik olan laparoskopi kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntemde transfer öncesi Cl varlığı ve yapısı da değerlendirilebilmektedir (Holtz, 2005; Lehloenya, 2008).

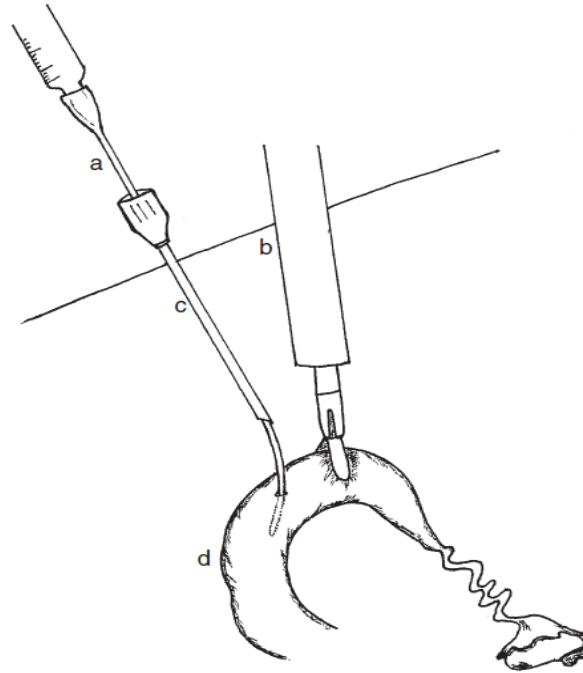
Laparoskopik yöntemde kornu uteriye transfer yapılabilmesi için laparotomik yöntemle göre daha küçük bir ensizyon yapılmaktadır ve iki yöntemde de embriyoların yaşama oranı aynıdır (Ishwar ve Memon, 1996; Cognie, 1999; Lehloenya, 2008). Keçilerde transservikal embriyo transferi de başarıyla yapılmıştır. Transservikal ve laparoskopik transferlerdeki gebelik oranları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık belirlenmemiştir. Fakat transservikal transfer metodunda Cl varlığının tespit edilmemesine bağlı olarak ortaya çıkan düşük embriyo yaşam oranı ve dolayısıyla düşük gebelik oranı nedeniyle fazla kullanım alanı bulamamıştır (Cognie, 1999; Lehloenya, 2008).

#### **1.4.5.1. Laparotomik Embriyo Transferi**

Bu yöntemde, en az 12 saat açlığı takiben genel anestezi altında yapılacak olan operasyon için hayvanlar 40 derecelik bir açıyla ve başaşağı gelecek şekilde sırt üstü yatırılır. Yapılan orta hat ensizyonu ile reproduktif organlar karın boşluğu dışına alınır ve ovaryumlar Cl varlığı yönünden muayene edilir. Erken gelişim dönemindeki embriyolar (<4 gün) fimbria aracılığıyla ovidukta kedi idrar sondası (1,3 x 130 mm), Drummond pipeti ya da pastör pipeti yardımıyla transfer edilir. Daha geç gelişim dönemindeki embriyolar (>4 gün) ise kornu uteriye iğne yardımıyla açılan bir delikten yine bir kedi idrar sondası ya da pastör pipeti yardımıyla transfer edilir (Flores-Foxworth, 2007).

### 1.4.5.2. Laparoskopik Embriyo Transferi

Bu yöntemde embriyo transferi yapılacak hayvan 40 derecelik bir açıyla ve baş aşağıya gelecek bir biçimde sırt üstü yatırılır. Transabdominal yerleştirilen Verres iğnesi yardımıyla CO<sub>2</sub> verilerek pneumoperitoneum oluşturulur. Meme bezinin yaklaşık 10 cm ön kısmında orta hatta 2-3 cm uzaklıkta 2 adet ensizyon yapılır, bu ensizyonların birinden laparoskop diğerinden ise laparoskopik yakalama forseps karın boşluğuna yerleştirilir. Korpus luteumun bulunduğu kornu uteri forseps ile tutulur. Yakalanan kornunun ventralinden yerleştirilen katater ile transfer gerçekleştirilir (Şekil 1.11). Laparoskopik transfer için bir diğer yöntemde Babcock forseps kullanımıdır. Bu forseps ile Cl'nin bulunduğu kornunun uç kısmı, linea albaya yapılan 2 cm'lik bir abdominal ensizyon ile dışarı çıkarılır ve kedi idrar sondası yardımıyla transfer gerçekleştirilir (Flores-Foxworth, 2007).



**Şekil 1.11.** Keçilerde laparoskopik embriyo transferi. a, embriyoların yer aldığı kedi idrar sondası; b, laparoskopik atravmatik yakalama forseps; c, iğne (14 gauge); d. Kornu uteri (Flores-Foxworth, 2007).

### 1.4.5.3. Transservikal Embriyo Transferi

Koyun ve keçide genital organların rektal muayene ile manüplasyonu mümkün değildir. Yine de serviksin kataterize edilmesiyle embriyo transferi yapılabilmektedir. Servikse yerleştirilen polietilen katater (Intramedic, Clay Adams) vasıtasıyla transfer yapılmaktadır. Fakat transfer sonrası serviks ve uterusu kontraksiyon indüklediği için, transfer edilen embriyonun tutunamadığı bildirilmiştir (Cognie, 1999; Flores-Foxworth, 2007; Lehloenya, 2008).

Yapılan çalışmada tiftik kalitesi yönünden dünyada ve ülkemizde önemli olan Ankara Keçisi'nin genetik özelliklerinin sonraki jenerasyonlara aktarılması ve bu genetik materyallerin korunması amacıyla aşım sezonu başında ve sonunda embriyo eldesi, embriyoların taze olarak ya da dondurulup çözdürüldükten sonra transfer edilmesi ve bu aşamalarda transferleri ile elde edilen gebelik ve canlı yavru oranları üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışması Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 04/07/2012 tarih ve 2012-14-89 sayılı etik kurul onayı (Ek-1) ile yapılmıştır ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 13B3338001 Proje numarası ile desteklenmiştir.

### 2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada hayvan materyalini sağlıklı ve fertil, 3-7 yaş aralığında, daha önce en az bir kere doğum yağı ve genital organlarında herhangi bir problem bulunmayan farklı ağırlıktaki (35-45 kg) 40 baş Ankara Keçisi keçisi ve sağlıklı ve fertil, 2-4 yaş aralığında 5 baş Ankara Keçisi tekesi oluşturdu. Çalışmada kullanılan hayvanlar Lalahan Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nden proje ile temin edilerek Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Çiftliği'ne (+40° 6' 8.4996" K,+32° 37' 18.6492" D) getirildi. Tüm hayvanlara genel klinik muayeneler (vücut ısısı, solunum ve nabız sayısı vb.) yapıldı ve kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda *Brucella spp.* yönünden incelendi ve *Brucella* yönünden negatif oldukları belirlendi. Aynı zamanda tüm hayvanlara çalışmaya başlamadan 3 hafta önce antiparaziter uygulamalar yapıldı.

Çalışma planı aşım sezonun başı ve sonunda olmak üzere 2 kez, aynı protokoller ile yapıldı (Ekim-Aralık 2013). Hayvanlar; verici grup, taze embriyo transfer grubu (Grup 1) ve vitrifikasyon transfer grubu (Grup 2) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Embriyo elde etmek amacıyla verici grupta 9 baş Ankara Keçisi keçisi ve 5 baş Ankara Keçisi tekesi kullanıldı. Taze ve vitrifikasyon transfer gruplarında ise aşım sezonunun başında (Ekim 2013) 15'er baş (Grup 1), aşım sezonunun sonunda (Aralık 2013) ise 8'er baş (Grup 2) Ankara Keçisi keçisi kullanıldı (Çizelge 2.1). Çalışmada

kullanılan bütün hayvanlara (dişiler ve erkekler) üreme sezonu öncesi yoğun besleme programı uygulandı.

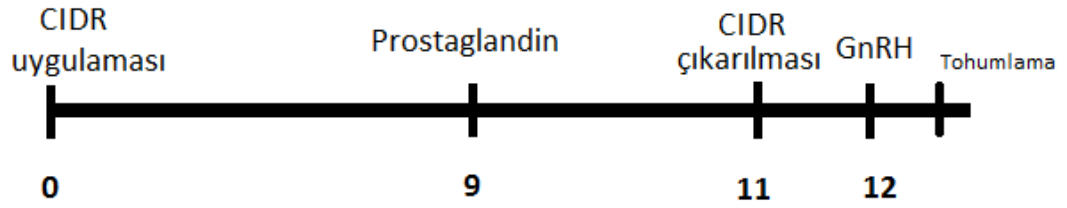
**Çizelge 2.1.** Çalışmada kullanılan Ankara Keçisi keçi ve tekelerinin gruplara göre dağılımı.

	<b>Verici Grup</b>	<b>Taze Embriyo Transfer Grubu</b>	<b>Vitrifikasyon Transfer Grubu</b>
<b>Aşım Sezonu Başı</b>	9 keçi 5 teke	15 keçi	15 keçi
<b>Aşım Sezonu Sonu</b>	9 keçi 5 teke	8 keçi	8 keçi

## 2.2. Metot

### 2.2.1. Senkronizasyon Protokolü

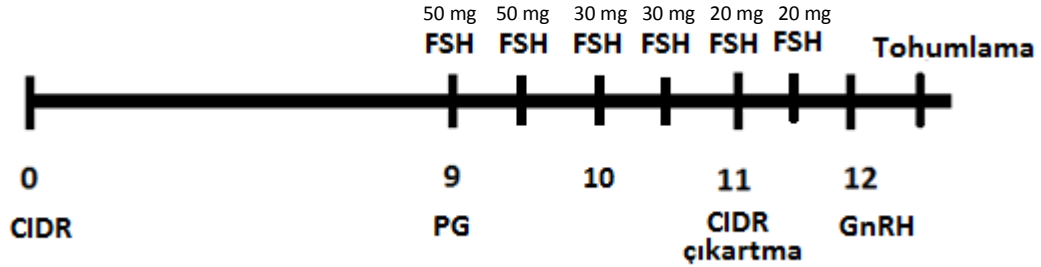
Aşım sezonunun başı ve sonunda, verici ve alıcı dişi keçilere aynı klasik senkronizasyon protokolleri uygulandı. Verici ve alıcı hayvanlara 0. gün, 0,33 gr progesteron içeren preparat (CIDR<sup>®</sup>, Eazi-Breed, Animal Health) intravaginal yolla uygulandı. Dokuzuncu gün hayvanlara kas içi 150 µg/keçi dozunda bir kez prostaglandin (Dalmazin<sup>®</sup>, Vetaş; kloprostenol) enjeksiyonu yapıldı. On birinci gün, progesteron kaynağı uzaklaştırıldı. CIDR'ın çıkarılmasından 24 saat sonra yani 12. gün kas içi yolla 10 µg/keçi dozunda bir kez GnRH analogu (Receptal<sup>®</sup>, Intervet) uygulandı ve GnRH enjeksiyonunu takip eden 6-16. saatlerde verici keçiler, fertilitesi belirlenmiş tekelerle çiftleştirildi (Şekil 2.1). Senkronizasyon başarısı ve süresi hakkında bilgi toplandı ve kayıt edildi.



**Şekil 2.1.** Uygulanan senkronizasyon protokolü.

### 2.2.2. Süperovulasyon Protokolü

Verici hayvanlara, senkronizasyon protokolü devam ederken 9. günden itibaren başlayarak 12 saat arayla, altı azalan doz halinde FSH (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health) enjekte edildi (Şekil 2.2). İlk gün 50:50 mg, ikinci gün 30:30 mg, üçüncü gün ise 20:20 mg dozlarında olmak üzere toplam 200 mg FSH kas içi enjekte edilmiştir.



**Şekil 2.2.** Uygulanan süperovulasyon protokolü.

### 2.2.3. Kullanılan Vasatlar

Çalışmada uterusun yıkanması, embriyoların toplanması ve değerlendirilmesi, kültüre edilmesi, dondurulması, çözündürülmesi ve transfer edilmesi işlemlerinde kullanılan vasatlar aşağıda formülleriyle birlikte sunulmuştur.

**Çizelge 2.2.** Kullanılan vasatlar için hazırlanan Modifiye Dulbecco's Phosphate Buffered Solution (mD-PBS)'in içeriği.

	<b>Kimyasal</b>	<b>1000 ml için (gr)</b>
PBS-A	NaCl	8,0
	KCl	0,2
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
PBS-B	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1395
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1
	Glucose	1,0
	Sodyum Pyruvate	0,036

**Çizelge 2.3.** Uterus yıkama vasatında (250 ml) kullanılan kimyasallar.

	<b>mD-PBS</b>	<b>BSA</b>	<b>Antibiyotik</b>
<b>Uterus yıkama vasatı</b>	250 ml	750 mg	250 µl

**Çizelge 2.4.** Vitrifikasyon vasatlarının hazırlanmasında (250 ml) kullanılan bazal medyumun içeriği.

	<b>mD-PBS</b>	<b>FCS*</b>	<b>Antibiyotik</b>
<b>Bazal Medyum (V)</b>	225 ml	25 ml	250 µl

\*FCS: Fötal Buzağı Serumumu

**Çizelge 2.5.** Vitrifikasyon vasatlarının hazırlanmasında (50 ml) kullanılan kimyasallar.

	<b>Bazal Medyum (V)</b>	<b>Gliserol</b>	<b>Etilen glikol</b>
<b>VS1</b>	40 ml	-	10 ml (%20)
<b>VS2</b>	35 ml	5 ml (%10)	10 ml (%20)
<b>VS3</b>	25 ml	12,5 ml (%25)	12,5 ml (%25)

**Çizelge 2.6.** Vitrifikasyon işlemi sırasında kullanılan 1 M sükrozun (50 ml) hazırlanmasında kullanılan kimyasallar.

	<b>mD-PBS</b>	<b>Sükroz</b>
<b>1 M Sükroz</b>	250 ml	17,1 gr

**Çizelge 2.7.** Çözdürme (Devitrifikasyon) vasatlarının hazırlanması için (250 ml) kullanılan bazal medyumun içeriği.

	<b>mD-PBS</b>	<b>FCS</b>	<b>Antibiyotik</b>
<b>Bazal Medyum (DV)</b>	200 ml	50 ml	250 µl

**Çizelge 2.8.** Vitrifikasyon vasatlarının hazırlanması için (50 ml) kullanılan kimyasallar.

	<b>Bazal Medyum (DV)</b>	<b>Sükroz</b>
<b>0,5 M Sükroz</b>	50 ml	8,5575 gr
<b>0,25 M Sükroz</b>	50 ml	4,2787 gr

**Çizelge 2.9.** Embriyo transferinde kullanılan transfer vasatının hazırlanması.

	<b>mD-PBS</b>	<b>FCS</b>	<b>Antibiyotik</b>
<b>Transfer Vasatı</b>	200 ml	50 ml	250 µl

#### **2.2.4. Embriyoların Cerrahi Yöntemle Elde Edilmesi**

Çiftleşme sonrası 6-6,5. (144-156. saat) günlerde embriyolar cerrahi yöntemle toplandı. Bu amaçla operasyon öncesi verici hayvanlar, operasyon esnasında oluşabilecek riskleri engellemek için 12 saat aç ve susuz bırakıldı. Hayvanlara; premedikasyon amacıyla anesteziyenin yaklaşık olarak 15 dakika önce, 0,1-1 mg/kg dozunda deri altı atropin sülfat (Atropin, Vetaş, Türkiye) enjekte edildi. Daha sonra anestezi için 0,5 mg/kg dozunda intravenöz diazepam (Diazem, Deva, Türkiye) ve 2

mg/kg dozda ketamin HCl (Alfamine, Egevet, Türkiye) verildi. Anesteziye alınan keçiler daha kolay opere edilebilmeleri için 30° eğim verilebilen laparoskopi masasına (laparoscopy cradle) yatırıldı (Şekil 2.3.1). Operasyonlar mediyan hat ensizyonu ile yapıldığı için, abdominal bölge göbek deliği hizasından meme loblarının ön kısmına kadar traş edildi. Operasyon öncesi asepsi ve antisepsi kurallarına dikkat edildi ve bu amaçla traş edilen bölge alkol ve iyot içeren antiseptik ile steril hale getirildi. Daha sonra uterus ve ovaryumların dışarıya alınması için meme loblarının kranial kısmından başlayan 5-8 cm'lik orta hat ensizyonu yapıldı (Şekil 2.3.2).



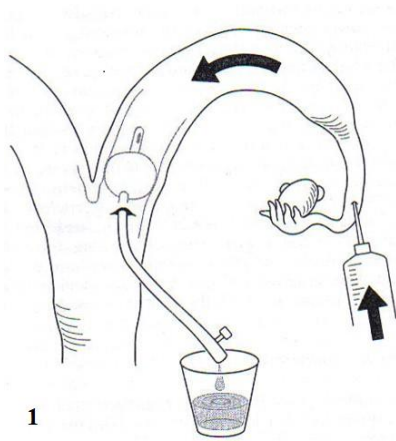
**Şekil 2.3.** Embriyoların cerrahi yöntemle elde edilmesi sırasında alınan operasyon görüntüleri. 1; farklı derecelerde eğim verilebilen laparoskopi masasına hayvanın yatırılışı, 2; operasyon için yapılan ensizyon.

Yapılan ensizyon sonrası abdominal boşlukta bulunan uterus ve ovaryumlar dışarı çıkarıldı ve uterus pensleriyle sabitlendi. İlk olarak ovaryum folikül, kist, korpus hemorajikum ya da korpus luteum varlığı yönünden muayene edildi (Şekil 2.4). Gerekli bilgiler kayıt altına alındıktan sonra uterus yıkamasına başlandı.



**Şekil 2.4.** Operasyon sırasında ovaryumların muayenesi ve süperovulasyon yanıtları (Beyaz oklar: korpus luteum).

Uterus yıkama işlemi sırasında balon kateter ve kedi idrar sondasından faydalanıldı. Bifurkasyo uteri hizasından küt olarak bir perforasyon oluşturularak buradan sağ kornu uterin alt ucuna balon kateter (Rusch® 2-Way Foley Catheter, Silicone, 2 Opposed Eyes, 10 French, 3cc Balloon, 12inch, Single Use) ve ovaryum ile kornu uterin birleştiği, oviduktun hemen altındaki bölgeden kedi idrar sondası (BUSTER® sterile cat catheter 1.3 x 130 mm 3 FG open end, w/stylet) yerleştirildi (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** Embriyoların cerrahi yöntemle elde edilmesi işlemi. 1: uterus yıkama işleminin şematize edilmiş hali 2: kornu uteriye yerleştirilen balon kateter ve ovidukta yerleştirilen sondanın görünümü.

Her bir kornu uteri yaklaşık 20 ml uterus yıkama vasatıyla yıkandı. İlk olarak vasat; sağ kornu uteriye idrar sondası tarafından verildi, balon kateterden dışarı steril bir petriye alındı (Şekil 2.6.1) ve değerlendirilmek üzere laboratuvara gönderildi. Aynı işlem sol kornu uteriye de uygulandı. Yıkama sonrası uterus üzerinde açılmış olan enzisyonlar uygun dikiş materyalleri ile kapatıldı (Şekil 2.6.2). Uterus ve ovaryum abdominal bölgeye anatomik konumuna uygun bir biçimde yerleştirildikten sonra olası yapışmaları önlemek amacıyla abdominal boşluk en az 500 ml %0,9 NaCl + Heparin ile yıkandı. Son olarak enzisyon hattı uygun dikiş materyalleri ile kapatıldı ve yara bölgesine antibiyotikli deri spreyi uygulandı. Olası gebelikleri önlemek amacıyla 150 µg/keçi dozunda PGF<sub>2</sub>α kas içi enjekte edildi ve opere edilen hayvanlara post operatif 5 gün süreyle kas içi 10 mg/kg dozda oksitetrasiklin (Primamycin, Zoetis, Türkiye) antibiyotik uygulandı.



**Şekil 2.6.** Kornu uterinin yıkanması. 1: Uterus yıkantısının petrilere toplanışı, 2: uterus üzerinde açılmış olan enzisyonların uygun dikiş materyalleri ile kapatılması.

### 2.2.5. Embriyoların Değerlendirilmesi

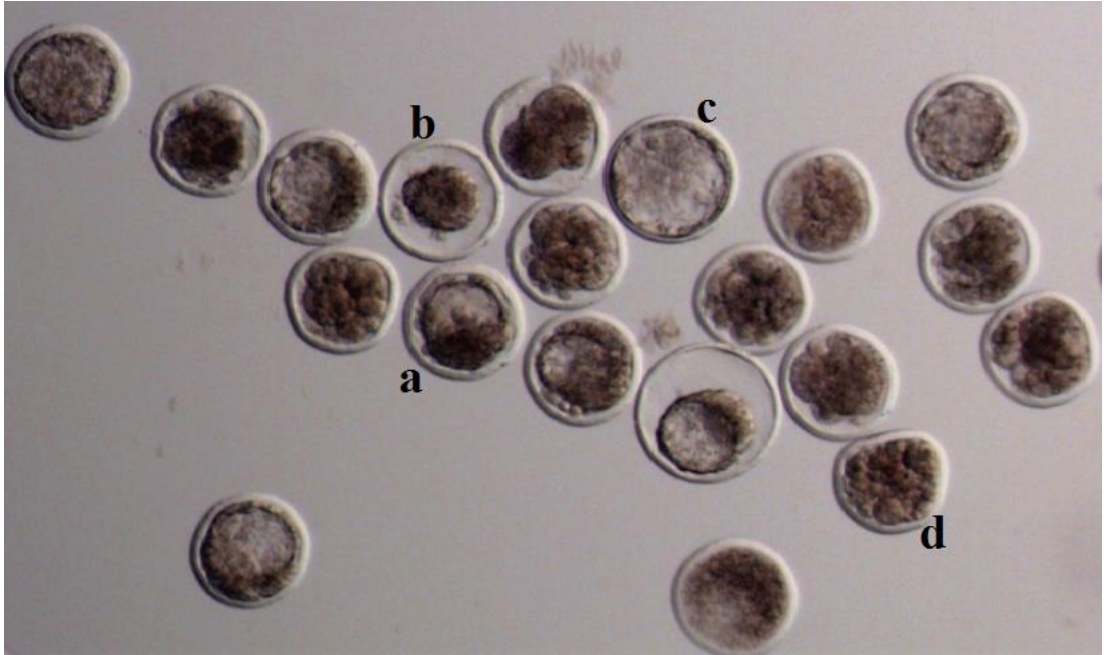
Petrilere alınan uterus yıkantıları stereo mikroskop (Leica M205C, Şekil 2.7.1) altında tarandı ve bulunan embriyolar ayrı petrilere (Şekil 2.7.2) toplandı. Bu işlem için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı İn Vitro Fertilizasyon Laboratuvarı'ndan özel ekipman Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde bulunan laboratuvara taşındı.





**Şekil 2.7.** Laboratuvarında embriyo arama işlemi. 1: Stereo mikroskop ile embriyo aranması, 2: Bulunan embriyoların toplandığı petriler.

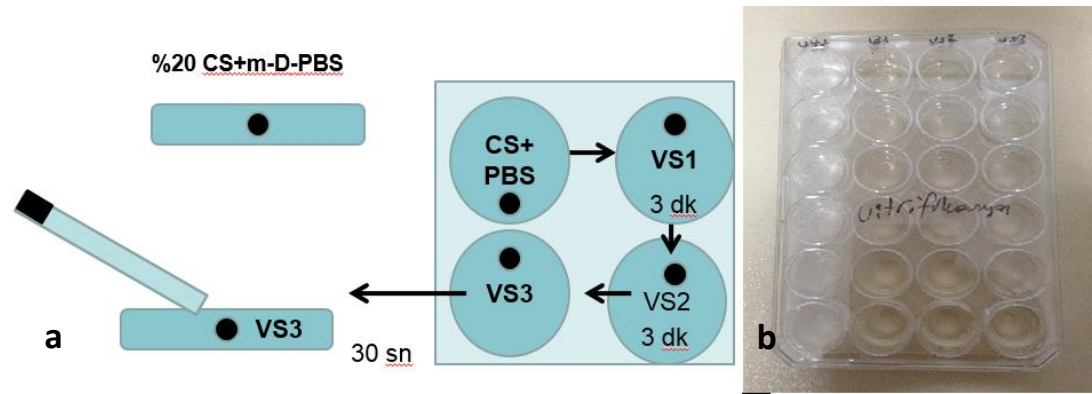
Bulunan embriyolar (Şekil 2.8) IETS tarafından belirlenen kriterlere uygun olarak değerlendirildi (Robertson ve Nelson, 2010). Bu kriterlere göre transfer edilebilir ve/veya dondurulabilir kalitede olan embriyolar (Erken Blastosist, Blastosist, Expanded Blastosist, Aşama 5-6-7, Kod 1) transfer edilene ya da dondurulana kadar uygun kültür ortamında bekletildi.



**Şekil 2.8.** Toplanan embriyoların bir kısmının görüntüsü. a: blastosist, b: kompaktlaşmış morula, c: expanded blastosist, d: Morula.

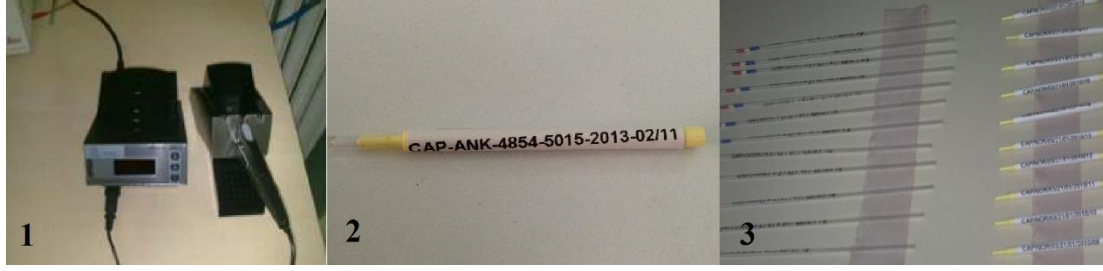
### 2.2.6. Embriyoların Dondurulması

Dondurulabilir nitelikte olan blastosistler arama vasatından alınarak %20 FCS+mD-PBS içeren embriyo kültür solüsyonuna aktarıldı. Embriyo, vitrifikasyon solüsyonu VS-1' e aktarıldı ve burada 3 dakika süreyle bekletildi. Embriyo 3. dakikanın sonunda VS-2'ye alınarak 3 dakika süreyle bu solüsyonun içerisinde bekletildi ve son olarak VS-3'e aktarıldıktan sonra 30 saniye içerisinde payete çekildi (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9.** Vitrifikasyon işleminin şematize edilmiş hali (a) ve bu işlemde kullanılan 24 gözlü petri kabı (b).

Payetin açık olan kısmı ısı işlemi ile kapatıldı (Ersa DIGITAL 2000 A, Şekil 2.10.1), kimlik bilgileri (Tür-İrk-Baba Kulak No-Anne Kulak No-Yıl-Dönem-Numara) payet üzerine yazılarak (Şekil 2.10.2-3) sıvı azota alındı ve vitrifikasyon işlemi tamamlandı. Son aşama olan VS-3 bölümünde 30 saniyelik sürenin aşılmasına özen gösterildi ve donmuş olan payetler çözdürülene kadar sıvı azot içerisinde alındı ve transfere uygun olarak senkronize edilen keçilere uygun protokolle çözdürülüp transfer edilene kadar saklandı.



**Şekil 2.10.** Payet kapatma makinesi ve payetler. 1: payet kapatma işlemi sırasında kullanılan cihaz 2: kimlik bilgileri üzerine yazılmış olan payet tıkaçı, 3: vitrifiye edilmiş olan embriyoların saklanacağı payet ve tıkaçlar.

Dondurulacak olan embriyoların dışarıda kalma süresini azaltmak ve zaman kazanmak amacıyla farklı bir dondurma çizelgesi oluşturuldu (Çizelge 2.10). Vitrifikasyon işleminde bir embriyonun dondurma işlemi yaklaşık 7 dk sürmektedir. Yeni oluşturulan çizelge ile 8 dk'da 3 embriyo dondurulabilmektedir.

**Çizelge 2.10.** Vitrifikasyon işlemi sırasında kullanılan zaman çizelgesi.

Dakika	Embriyo	Yapılan İşlem
0	1. Embriyo	
1	2. Embriyo	Embriyo VS1'e alınarak ekilibre edildi.
2	3. Embriyo	
3	1. Embriyo	
4	2. Embriyo	Embriyo VS2'ye alınarak ekilibre edildi.
5	3. Embriyo	
6	1. Embriyo	
7	2. Embriyo	Embriyo VS3'e alınarak ekilibre edildi ve donduruldu.
8	3. Embriyo	

### 2.2.7. Embriyoların Çözdürülmesi

Bütün işlemler stereo mikroskop altında yapıldı. Sıvı azot tankında en az 24 saat korunan payetler; likit nitrojenden çıkartılıp 10 saniye süreyle havada ve 20 sn süreyle 30 °C'lik su banyosunda tutularak çözdürüldü. Payetteki embriyo 35 mm'lik petriye

alındı. Embriyo içerdiği toksik orandaki sukrozdan arındırılmak üzere önce içerisinde mD-PBS + 0.5 M Sukroz+ %20 FCS içeren petriye aktarılarak 5 dakika süreyle burada yıkandı. Daha sonra daha az konsantrasyondaki mD-PBS + 0.25 M Sukroz + %20 FCS solüsyonunda 5 dakika süreyle yıkanarak bekletildi. Son aşamada, mD-PBS + %20 FCS solüsyonunda 5 dakika süreyle daha ekilibre edildi. Devitrifikasyon sonrası embriyolar, mikroskop altında değerlendirilerek transfer vasatına alındı. Keçilere transfer etmek amacıyla da embriyolar payetlere çekildi.

### **2.2.8. Embriyoların Transferi**

Taze transfer edilen embriyolar senkronize edilen dişilere laparotomik olarak transfer edildi. Proje kapsamında embriyo transfer etmeye elverişli bir endoskop elde edilemediği için transfer laparoskopik yöntemle yapılamadı.

Operasyon öncesi alıcı hayvanlar, operasyon esnasında oluşabilecek riskleri engellemek için 12 saat aç ve susuz bırakıldı. Hayvanlara; premedikasyon amacıyla anesteziden yaklaşık olarak 15 dakika önce, 0,1-1 mg/kg dozunda deri altı atropin sülfat (Atropin, Vetaş, Türkiye) enjekte edildi. Daha sonra anestezi için 0,5 mg/kg dozunda damar içi diazepam (Diazem, Deva, Türkiye) ve 2 mg/kg dozda ketamin HCl (Alfamine, Egevet, Türkiye) uygulandı. Anesteziye alınan keçiler daha kolay opere edilebilmeleri için 30° eğim verilebilen laparoskopi masasına (laparoscopy cradle) yatırıldı. Operasyonlar mediyan hat ensizyonu ile yapıldığı için, abdominal bölge göbek deliği hizasından meme loblarının ön kısmına kadar traş edildi. Operasyon öncesi asepsi ve antisepsi kurallarına dikkat edildi ve bu amaçla traş edilen bölge alkol ve iyot içeren antiseptik ile steril hale getirildi. Daha sonra uterus ve ovaryumların dışarıya alınması için meme loblarının kranial kısmından başlayan 3-5 cm'lik orta hat ensizyonu yapıldı. Yapılan ensizyon sonrası abdominal boşlukta bulunan uterus ve ovaryumlar dışarı çıkarıldı. İlk olarak ovaryum folikül, kist, korpus hemorajikum ya da korpus luteum varlığı yönünden muayene edildi ve

bu veriler kayıt altına alındı. Her bir alıcıya 1-2 adet embriyo Cl varlığına göre transfer edildi. Sadece bir ovaryumda birden fazla Cl bulunan keçilere tek kornuya iki embriyo, her iki ovaryumda da Cl bulunan keçilere iki kornuya birer adet olacak şekilde kornu uterilere transfer yapıldı. Bu işlem sırasında 16 gauge'lık kanül kullanılarak kornu uteriye küçük bir ensizyon açıldı ve payet içerisinde uygun transfer vasatında bulunan taze yada dondurulup çözdürülmüş olan embriyolar transfer edildi (Şekil 2.11). Daha sonra uterus ve ovaryum abdominal bölgeye anatomik konumuna uygun bir biçimde yerleştirildikten sonra olası yapışmaları önlemek amacıyla abdominal boşluk en az 500 ml %0,9 NaCl + Heparin ile yıkandı. Son olarak ensizyon hattı uygun dikiş materyalleri ile kapatıldı ve yara bölgesine antibiyotikli deri spreyi uygulandı. Opere edilen hayvanlara post operatif 5 gün süreyle kas içi 15 mg/kg dozda amoksisilin trihidrat (Vilamoks, Vilsan, Türkiye) antibiyotik uygulandı.



**Şekil 2.11.** Embriyoların transfer edilişi.

Transfer sonrası 25-30. günlerde kan progesteron ölçümlerinin yapılması ile birlikte transrektal USG ile gebelikler kontrol edildi ve gebelik boyunca 30, 60 ve 90. günlerde USG ile gebeliğin devamı kontrol edildi. Gebelikleri devam eden keçilerin doğumları takip edildi. Doğum sonrası yavruların sağlık durumları, vücut ölçüleri ve yaşam kaliteleri değerlendirilip kayıt altına alındı.

### 2.3. İstatistiksel Analizler

Her bir uygulama için embriyoların eldesindeki başarı durumlarının istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde ki kare ve fischer exact testlerinden yararlanıldı. Aşım sezon başı ve sonunda aynı hayvanlardan alınan embriyoların kaliteleri yönünden karşılaştırılmasında McNemar testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile değerlendirildi. Tablolardaki nitel değişkenlere ait veriler yüzdeler şeklinde, nicel değişkenlere ait veriler ise "Aritmetik Ortalama ( $\bar{X}$ )  $\pm$  Standart Sapma ( $S_x$ )" şeklinde verildi. İstatistiksel hesaplamalar için SPSS® (Version 14.01, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programından yararlanıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Senkronizasyon Bulguları

Çalışmada; aşım sezonunun başında ve sonunda verici hayvan olarak 9 baş Ankara Keçisi keçisi kullanıldı. Aşım sezonunun başı ve sonunda senkronizasyon protokolü uygulanan verici keçilerde her iki grupta östrus yanıtı %100 olarak belirlendi. Aşım sezonunun başında CIDR'in uzaklaştırılmasından itibaren 23,7±2,5 saat sonra, aşım sezonunun sonunda ise 30,1±4,4 saat sonra östrusların başladığı saptandı. Aşım sezonunun başında ve sonunda östrus süreleri sırasıyla 25,3±5,0 ve 17,1±2,8 saat olarak bulundu. Östrus süreleri boyunca keçilerin ortalama çiftleşme sayıları ise aşım sezonunun başında 6,7±3,9; aşım sezonunun sonunda ise 6±1,8 çiftleşme olarak belirlendi (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** Senkronizasyon protokolü uygulanan verici keçilerde alınan yanıtlar.

Sezon	Hayvan sayısı (n)	Östrus Yanıtı (%)	Östrus Başlama Zamanı (saat)*	Östrus süresi*	Çiftleşme sayısı (ort.)*
Aşım sezonu başı	9	100	23,7±2,5	25,3±5,0	6,7±3,9
Aşım sezonu sonu	9	100	30,1±4,4	17,1±2,8	6±1,8

\* Aritmetik ortalama ± Standart Sapma

#### 3.2. Süperovulasyon bulguları

Aşım sezonunun başında kullanılan 9 baş keçinin tamamında (%100), aşım sezonunun sonunda ise 9 keçinin 8'inde (%88,8) ovaryum yanıtı (süperovulasyon) elde edildi. Aşım sezonunun başında; toplam CL sayısı 153 ve ortalama CL sayısı ise 17±4,9 adet olarak bulundu. Aşım sezonunun sonunda ise toplam CL sayısı 104 ve ortalama CL sayısı ise 11,5±8,6 adet olarak belirlendi. Aşım sezonunun başında keçilerin sol ve sağ ovaryumlarında ortalama CL sayıları sırasıyla 7,8±2,5 ve 9,1±2,7 adet olarak bulundu.

Aşım sezonu sonunda ise sol ve sağ ovaryumdaki ortalama CL sayısı sırasıyla  $4,5\pm 3,2$  ve  $7\pm 5,7$  adet olarak belirlendi (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Süperovulasyon protokolü uygulanan verici keçilerde alınan ovaryum yanıtları.

Sezon	Hayvan sayısı (n)	Ovaryum Yanıtı (%)	Toplam CL sayısı	Ortalama CL Sayısı*	Ort. CL Sayısı*	
					Sol	Sağ
Aşım sezonu başı	9	100	153	$17\pm 4,9$	$7,8\pm 2,5$	$9,1\pm 2,7$
Aşım sezonu sonu	9	88,8	104	$11,5\pm 8,6$	$4,5\pm 3,2$	$7\pm 5,7$

\* Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart Sapma

### 3.3. Embriyo Eldesi Bulguları

Aşım sezonunun başında toplam 153 adet CL'ye karşılık 103 adet embriyo elde edildi. Keçi başına ortalama embriyo sayısı ise  $11,4\pm 3,9$  adet olarak belirlendi ve embriyo elde etme oranları %67,32 olarak bulundu. Aşım sezonu sonunda ise toplam 104 adet CL belirlendi ve 63 adet embriyo elde edildi. Keçi başına ortalama embriyo sayısı  $7\pm 6,4$  adet olarak bulundu ve embriyo elde etme oranı ise %60,57 olarak belirlendi (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Verici keçilerden toplanan embriyoların değerlendirilmesi.

Sezon	Hayvan sayısı (n)	Toplam CL Sayısı	Toplam Embriyo Sayısı	Ort. Embriyo Sayısı*	Embriyo Elde Edilme Oranı (%)
Aşım sezonu başı	9	153	103	$11,4\pm 3,9$	67,32
Aşım sezon sonu	9	104	63	$7\pm 6,4$	60,57

\* Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart Sapma



Yapılan uterus yıkamaları sonrası aşım sezonunun başında toplam 153 adet CL belirlenen keçilerden 108 adet hücre elde edildi. Bu hücrelerin 103 adedi embriyo ve 5 tanesi ise UFO olarak belirlendi ve toplam fertilizasyon oranı %95,37 (103/108) olarak hesaplandı. Keçi başına ortalama bulunan hücre sayısı  $12\pm 3,4$ , embriyo sayısı  $11,4\pm 3,9$ ; fertilize olmamış oosit sayısı  $0,55\pm 1,7$  ve fertilizasyon oranı ise %95 olarak belirlendi. Aşım sezonu sonunda ise toplam 104 adet CL belirlenen keçilerden 72 adet hücre elde edildi. Bu hücrelerin 63 adedi embriyo ve 9 tanesi ise UFO olarak belirlendi ve toplam fertilizasyon oranı ise %87,5 (63/72) olarak hesaplandı. Keçi başına ortalama bulunan hücre sayısı  $8\pm 6,9$ , embriyo sayısı  $7\pm 6,4$ , UFO sayısı  $1\pm 1,6$  ve fertilizasyon oranı ise %87,5 olarak belirlendi (Çizelge 3.4.).

**Çizelge 3.4.** Verici keçilerden toplanan hücrelerin değerlendirilmesi.

Sezon	Hayvan sayısı (n)		Bulunan Hücre Sayısı	Embriyo Sayısı	Fertilize olmamış oosit sayısı	Fertilizasyon oranı (%)
Aşım sezonu başı	9	Top.	108	103	5	95,37
		Ort.*	$12\pm 3,4$	$11,4\pm 3,9$	$0,55\pm 1,7$	95
Aşım sezonu sonu	9	Top.	72	63	9	87,5
		Ort.*	$8\pm 6,9$	$7\pm 6,4$	$1\pm 1,6$	87,5

\* Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart Sapma

Aşım sezonunun başında elde edilen 103 adet embriyodan 67 (%65,04) adedi transfer edilebilir/dondurulabilir embriyo olarak belirlendi. Transfer edilebilir/dondurulabilir embriyoların 49 adedi ExpBl ve 18 adedi ise Bl idi. Transfer edilemeyen veya dondurulamayacak olan embriyoların ise 27 adedi HedBl ve 9 adedi ise DejBl olarak belirlendi. Ortalama Transfer edilebilir/dondurulabilir ExpBl embriyo sayısı  $5,4\pm 4,0$  ve Bl embriyo sayısı  $2\pm 2,4$  olarak belirlendi. Transfer edilemeyen veya dondurulamayan embriyoların ise ortalama  $3\pm 2,5$  adedi HedBl ve  $3\pm 2,5$  adedi ise DejBl'di (Çizelge 3.5).

Aşım sezonunun sonunda elde edilen 63 adet embriyodan 42 (%66,67) adedi transfer edilebilir/dondurulabilir embriyo olarak belirlendi. Transfer edilebilir/dondurulabilir embriyoların 15 adedi ExpBl ve 27 adedi ise Bl'di. Transfer edilemeyen veya dondurulamayacak olan embriyoların ise 14 adedi HedBl ve 7 adedi ise DejBl olarak belirlendi. Ortalama Transfer edilebilir/dondurulabilir ExpBl embriyo sayısı  $1,7\pm 1,7$  ve Bl embriyo sayısı  $3\pm 4,6$  olarak belirlendi. Transfer edilemeyen veya dondurulamayan embriyoların ise ortalama  $1,6\pm 2,6$  adedi Hed Bl ve  $0,7\pm 2,0$  adedi ise DejBl'di (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** Verici keçilerden toplanan embriyoların kalitesinin değerlendirilmesi.

Sezon <sup>a</sup>	Embriyo sayısı	Transfer Edilebilir Embriyo Sayısı			HedBl	DejBl
		ExpBl.	Bl			
<b>Aşım sezonu başı</b>	Top.	103	49	18	27	9
	Ort.*	11,4	$5,4\pm 4,0$	$2\pm 2,4$	$3\pm 2,5$	$3\pm 2,5$
<b>Aşım sezonu sonu</b>	Top.	63	15	27	14	7
	Ort.*	7	$1,7\pm 1,7$	$3\pm 4,6$	$1,6\pm 2,6$	$0,7\pm 2,0$

<sup>a</sup> p= 0,572, \* Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart Sapma

ExpBl: Expanded Blastosist, Bl: Blastosist, HedBl; Hatced Blastosist, DejBl: Dejenere Blastosist.

### 3.4. Embriyo Transfer Bulguları

Aşım sezonunun başında elde edilen transfer edilebilir/dondurulabilir 67 adet embriyodan 28 adedi 15 alıcıya taze olarak, 17 adedi ise yine 15 alıcıya dondurulup çözdürüldükten sonra transfer edildi. Aşım sezonunun sonunda ise elde edilen transfer edilebilir/dondurulabilir 42 adet embriyodan 18 adedi 8 baş alıcıya taze olarak, 16 adedi ise 8 baş alıcıya donmuş çözdürülmüş olarak transfer edildi (Çizelge 3.6).

**Çizelge 3.6.** Yapılan embriyo transferi sayıları.

Sezon	Embriyo Sayısı (n)	Transfer edilebilir/dondurulabilir embriyo (%)	Taze Transfer	Donmuş Çözdürülmüş Transfer
Aşım sezonu başı	103	67 (65,04)	28	17
Aşım sezonu sonu	63	42 (66,6)	18	16

### 3.5. Alıcı dişilerin senkronizasyon bulguları

Aşım sezonu başında 15'er baş Ankara Keçisi keçisi taze ve donmuş çözdürülmüş transfer için alıcı olarak kullanıldı. Taze transfer için senkronizasyon protokolü uygulanan keçilerden 13'ünde (%86,6) östrus yanıtı alındı ve 12'sinde ise (%80) ovaryum yanıtı elde edildi. Senkronizasyon protokolü keçilerde toplam 20 adet CL ve ortalama  $1,3\pm 0,7$  adet CL bulundu. Çalışmada donmuş çözdürülmüş transfer uygulanacak olan keçilerde, senkronizasyon protokolü sonrası 14'ünde (%93,3) östrus yanıtı elde edildi ve 14'ünde (%93,3) ovaryum yanıtı belirlendi. Toplamda 16 adet CL bulundu ve ortalama  $1,06\pm 0,2$  adet CL elde edildi.

Aşım sezonu sonunda ise taze ve dondurulup çözdürülmüş olarak transfer yapılacak 8'er baş Ankara Keçisi keçisi alıcı olarak kullanıldı. Senkronizasyon protokolü sonrası taze transfer yapılacak olan grupta 8 adet keçinin tümünde (%100) östrus yanıtı alındı ve 7 (%87,5)'sinde ise ovaryum yanıtı elde edildi. Toplamda 12 adet ve ortalama  $1,5\pm 0,9$  adet CL belirlendi. Dondurulup çözdürülmüş transfer grubunda ise 8 adet keçiye östrus yanıtı belirlendi ve 8 adedinde ovaryum yanıtı belirlendi. Toplamda 8 adet ve ortalama  $1\pm 0$  adet CL belirlendi (Çizelge 3.7).

**Çizelge 3.7.** Senkronizasyon protokolü uygulanan alıcı keçilerde elde edilen yanıtlar.

Sezon	Hayvan sayısı (n)	Östrus Yanıtı (%)	Ovaryum yanıtı (%)	CL Sayısı	Ort. CL Sayısı*	
Aşım sezonu başı	Taze	15	13 (86,6)	12 (80)	20	1,3±0,7
	Donmuş	15	14 (93,3)	14 (93,3)	16	1,06±0,2
Aşım sezonu sonu	Taze	8	8 (100)	7 (87,5)	12	1,5±0,9
	Donmuş	8	8 (100)	8 (100)	8	1±0

\* Aritmetik ortalama ± Standart Sapma

### 3.6. Embriyo Transfer Sonuçları

Çalışmada aşım sezonunun başında yapılan transferlerle 15 alıcıya toplam 28 adet taze embriyo transfer edildi. Bu transfer sonucunda 7 (%46,6) alıcıda gebelik saptandı ve gebe alıcılardan 10 canlı oğlak elde edildi. Aynı dönemde 15 adet alıcıya 17 adet donmuş embriyo transfer edildi. Transfer sonrası 30. günde 3 (%20) alıcıda gebelik saptandı ancak canlı oğlak elde edilemedi.

Aşım sezonunun sonunda ise 8 alıcıya 18 taze embriyo transfer edildi, 3 (%37,5) gebelikten 5 canlı oğlak elde edildi. Aynı dönemde transfer edilen donmuş embriyolardan transfer sonrası 30. günde 3 alıcıda (%37,5) gebelik saptandı ancak canlı oğlak elde edilemedi (Çizelge 3.8).

**Çizelge 3.8.** Transfer sonrası gebelik ve oğlak sayıları.

Sezon	Transfer	Alıcı Sayısı	Embriyo Sayısı	Gebelik (%)	Oğlak Sayısı
Aşım sezonu başı <sup>a</sup>	Taze	15	28	7 (46,6)	10
	Donmuş	15	17	0	0
Aşım sezonu sonu <sup>b</sup>	Taze	8	18	3 (37,5)	5
	Donmuş	8	16	0	0

<sup>a</sup> p=0,007; <sup>b</sup> p=0,046

Aşım sezonunun başında ve sonunda hem taze transfer hem de donmuş çözdürülmüş transfer yapılan gruplarda transfer sonrası 30, 60 ve 90. günlerde ultrasonografi muayeneleri yapıldı. Aşım sezonunun başında taze transfer yapılan 15 keçide sırasıyla 30, 60 ve 90. günlerde belirlenen gebelik sayıları 11 (%73,3), 8 (%53,3) ve 7 (%46,6)'dir. Donmuş çözdürülmüş transfer yapılan 15 keçide sırasıyla 30, 60 ve 90. günlerde belirlenen gebelik sayıları ise 3 (%20), 1 (%6,6) ve 0 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.9).

**Çizelge 3.9.** Transfer sonrası ultrasonografi muayeneleri ile aşım sezonu başında belirlenen gebelik sayıları.

Sezon	Transfer	Alıcı Sayısı	Gebelik Günü		
			30. gün <sup>a</sup>	60. gün <sup>b</sup>	90. gün <sup>c</sup>
Aşım sezonu başı	Taze	15	11	8	7
	Donmuş	15	3	1	0

<sup>a</sup> p=0,003; <sup>b</sup> p=0,014; <sup>c</sup> p=0,006

Aşım sezonunun sonunda ise taze transfer yapılan 8 keçide transfer sonrası aynı zaman aralığında yapılan muayeneler sonrası sırasıyla gebelik sayıları 8 (%100), 3 (%37,5) ve 3 (%37,5)'dür. Aşım sezonunun sonunda ise donmuş çözdürülüp transfer yapılan 8 keçide transfer sonrası sırasıyla gebelik sayıları 3 (%37,5), 0 ve 0 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.10).

**Çizelge 3.10.** Transfer sonrası ultrasonografi muayeneleri ile aşım sezonu sonunda belirlenen gebelik sayıları.

Sezon	Transfer	Alıcı Sayısı	Gebelik Günü		
			30. gün <sup>a</sup>	60. gün <sup>b</sup>	90. gün <sup>c</sup>
Aşım sezonu sonu	Taze	8	8	3	3
	Donmuş	8	3	0	0

<sup>a</sup> p=0,026; <sup>b</sup> p=0,02; <sup>c</sup> p=0,02

Aşım sezonun başında taze transfer olarak 15 keçiye, toplam 28 embriyo transfer edilmiş ve bu transfer işlemi sonrası 7 keçinin gebeliği doğum sürecine kadar devam etmiştir. Yedi keçiden 3'ü ikiz olmak üzere 10 adet sağlıklı oğlak elde edilmiş ve embriyoların yaşam oranı ise %35,7 (10/28) olarak belirlenmiştir. Donmuş çözdürülmüş transfer uygulanan grupta ise alıcılara verilen 17 embriyodan doğum sürecine kadar hiçbiri ulaşamamıştır. Aşım sezonu sonunda ise 8 keçiye toplam 18 embriyo taze transfer edilmiş ve bu transfer işlemi sonrası 3 adet keçinin gebeliği doğum sürecine kadar devam etmiştir. Üç keçiden 2 tanesi ikiz olmak üzere 5 sağlıklı oğlak elde edilmiş ve embriyoların yaşam oranı %27,7 (8/18) olarak belirlenmiştir. Aşım sezonu sonunda donmuş çözdürülmüş transfer yapılan grupta da oğlak elde edilememiştir (Çizelge 3.11).

**Çizelge 3.11.** Transfer sonrası elde edilen oğlak sayıları ve embriyo yaşam oranları.

Sezon	Transfer	Alıcı Sayısı (Embriyo)	Oğlak Sayısı	Embriyo Yaşam Oranı (%)
<b>Aşım sezonu başı</b>	Taze	15 (28)	10	35,7
	Donmuş	15 (17)	0	0
<b>Aşım sezonu sonu</b>	Taze	8 (18)	5	27,7
	Donmuş	8 (16)	0	0



**Şekil 3.1.** Çalışma sonucunda elde edilen oğlaklar.

#### 4. TARTIŞMA

Son yıllarda dünyada, MOET; çiftlik hayvanlarının yetiştirilmesi ve reproduksiyon çalışmalarında önemli roller üstlenmiştir ve yararlı sonuçlar elde etmeyi sağlamıştır. Bu yöntem ayrıca genetik olarak üstün özelliklere sahip sürülerin oluşturulması ve bu gen kaynaklarının korunması amacıyla da uygun dondurma prosedürlerinin gelişmesine olanak sağlamıştır. Uluslararası anlamda ise bu uygulama hem hayvan ıslahında ilerlemeyi ve ıslah süresini kısaltmayı hem de embriyo transferi ve pazarlamasını artırmayı amaçlamaktadır (Lehloenya, 2008).

Multiple ovulasyon (süperovulasyon) ve embriyo transferi; çoğunlukla genetik iyileştirmeler, hayvan sağlığı koruma programları, nesli tükenmekte olan türlerin korunması ve ilgili teknolojilerin desteklenmesi yönünde etki göstermektedir. Multiple ovulasyon ve embriyo transferi programının başarısını; aşım sezonu, yaş, beslenme, yönetim, stres, gonadotropin kalitesi ve uygulama protokolü gibi birçok faktör etkilemektedir (Menchaca ve ark., 2010).

Koyun ve keçilerde, multiple ovulasyon ve embriyo transferi; hem verici hem de alıcı hayvanlarda östrusun senkronizasyonu, donör hayvanlarda senkronizasyonun son günlerinde gonadotropinler aracılığıyla süperovulasyon, çiftleştirmeyi takip eden 6-7. günlerde genellikle cerrahi operasyon ile uterusların yıkanması, embriyoların toplanması ve değerlendirilmesi gibi aşamaları kapsamaktadır. Embriyoların değerlendirilmesinden sonra ise taze veya dondurulup çözdürüldükten sonra embriyolar transfer edilerek koyun ve keçilerde bu yöntemin etkinliği değerlendirilmektedir (Lehloenya, 2008). Sunulan çalışmada da benzer protokoller aşım sezonu başında ve sonunda kullanılarak etkinliği değerlendirilmiştir.

Keçilerde; aşım sezonunda, aşım sezonuna geçişte ve anöstrus döneminde yapılan senkronizasyon uygulamalarında FGA ve MAP içeren vaginal süngerler yaygın



olarak kullanılmaktadır (Flores-Foxworth, 2007; Abecia ve ark., 2012; Uçar ve Özyurtlu, 2012). Motlomelo ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada FGA (%96,7) veya MAP (%93,1) ile elde edilen östrus senkronizasyon yanıtlarında önemli bir fark olmadığı belirtilmiştir. CIDR, FGA ve MAP'ın karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise benzer şekilde senkronizasyon oranlarında (%100, %100, %100) farklılık belirlenmemiştir (Romano, 2004). Sunulan çalışmada aşım sezonu başı ve sonunda CIDR kullanılarak yapılan senkronizasyon çalışmasında her iki grupta da araştırmacıların bulgularına benzer şekilde % 100 oranında senkronizasyon yanıtı alınmıştır.

Pampukidou ve ark. (2011), çiftleşme sezonunda yapmış oldukları çalışmada; yerli ırk keçilerde PMSG ve FSH'nin süperovulasyon ve embriyo transferinde etkinliğini araştırmışlardır. Süperovulasyon amacıyla FSH uygulanan grupta senkronizasyon yanıtı %100 ve progesteron kaynağının uzaklaştırılmasından itibaren östrusun başlamasına kadar geçen süre  $29,3 \pm 3,2$  saat ve östrus süresi ise  $24,2 \pm 3,4$  saat olarak belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada; süperovulasyon uygulanan keçilerin tamamında (%100) senkronizasyon yanıtı elde edilmiştir. Azalan dozlar şeklinde 200 mg/keçi dozunda FSH uygulanan hayvanlarda progesteron kaynağının uzaklaştırılmasından sonra östrusların başlama zamanı  $33,0 \pm 1$  saat ve östrus sürelerinin ise  $26 \pm 0,9$  saat olduğu bildirilmiştir (Lehloenya ve Greyling, 2010).

Boer ırkı keçilerde, sezonun etkilerinin süperovulasyon üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise senkronizasyon için CIDR ve süperovulasyon için 12 saat ara ile toplamda 200 mg/keçi olacak şekilde azalan dozlarda domuz hipofiz ekstraktı FSH uygulanmıştır. Aşım sezonunda senkronizasyon yanıtı %100, östrusların başlama zamanı  $24,9 \pm 4,8$  saat ve östrus süreleri  $24,0 \pm 5,7$  saat olarak belirlenmiştir. Aşım sezonu dışında ise östrus yanıtı %100, östrusların başlama zamanı  $30,5 \pm 9,1$  saat ve östrus süresi  $18,2 \pm 3,7$  saat olarak bildirilmiştir (Lehloenya, 2008).

Yapılan çalışmada da senkronizasyon sonrası; keçilerde aşım sezonunun başında, CIDR'ın uzaklaştırılmasından itibaren östrusların başlama zamanı  $23,7\pm 2,5$  saat ve östrus süreleri  $25,3\pm 5$  saat olarak belirlenmiştir. Aşım sezonunun sonunda ise östrusların başlama zamanı ve östrus süreleri sırasıyla  $30,1\pm 4,4$  saat ve  $17,6\pm 2,8$  saat olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar bildirilen araştırma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Aynı zamanda Lehloenya (2008), sezonun östrus başlama zamanı ve süresi üzerine etkili olduğunu fakat östrus yanıtını etkilemediğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışma sonuçlarında da aşım sezonunun başı ve sonunun östrus yanıtının etkilenmediği saptanmıştır.

Greyling ve ark. (2002) da yapmış oldukları çalışmada; iki farklı ırk keçide süperovulasyon ve embriyo transferini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında senkronizasyon sonu östrus gösterme süreleri sırasıyla 1. ve 2. grupta  $42,0\pm 18,0$  saat ve  $33,5\pm 5,2$  saat olarak bildirilmiştir. Östrus süreleri ise 1. grupta  $38,0\pm 17,0$  saat ve 2. grupta ise  $40,5\pm 12,2$  saat olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, sunulan çalışma sonuçları ile farklılık göstermektedir. Bu farklılığın nedeni olarak ise keçilerde; yaş, ırk, beslenme durumu, sezon ve keçinin fizyolojik durumu gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebileceği düşünülmüştür. Aynı çalışmada süperovulasyonu uyarmak amacıyla FSH kullanılmış ve süperovulasyona yanıtın 1. grupta bulunan keçilerde %50 ve 2. grupta ise %87,5 olarak belirlenmiştir. Bir östrusta keçi başına ortalama CL sayısı 1. grupta 18, 2. grupta ise 15 olarak bulunmuştur. Embriyo elde edilme oranları ise sırasıyla 1. ve 2. grupta; %94 ve 80 olarak bildirilmiştir .

Lima-Verde ve ark. (2003), 20 adet Saanen Keçisi ile yapmış oldukları çalışmada, FSH uygulamasından sonra keçilerin %65'inde süperovulasyon yanıtı aldıklarını ve ortalama ovulasyon sayısının ise  $11,5\pm 6,6$  adet olarak bulduklarını açıklamışlardır.

Selvaraju ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışmada 10 adet keçinin 8'inde (%80) FSH uygulaması sonrası süperovulasyon yanıtı elde etmişler ve ortalama CL sayıları  $8,30 \pm 1,75$  adet olarak bildirmişlerdir.

Sanchez-Davila ve ark. (2014) 3 farklı dozda FSH uygulamasının süperovulasyon ve embriyo kalitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bölünmüş azalan dozlar şeklinde toplam 80, 145 ve 215 mg FSH uygulanan keçilerde ortalama CL sayıları sırasıyla  $4,0 \pm 1,5$ ,  $13,4 \pm 3,7$  ve  $11,6 \pm 2,6$  olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda 80 mg FSH uygulanan keçilerde ovule olmamış folikül sayısının daha yüksek ve ortalama CL sayısının ise diğer 2 gruba göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

FSH ve PMSG ile yapılan süperovulasyon uygulamalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada; FSH uygulamasına alınan süperovulasyon yanıtının ( $77,8 \pm 2,7$ ), PMSG uygulamasına alınan yanıtın ( $14,3 \pm 2,2$ ) önemli oranda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Hu ve ark., 2010). Yapılan başka bir çalışmada ise FSH-P'nin kullanılması ile süperovulasyon yanıtı %87,5 olarak bulunmuştur (Greyling ve ark., 2002). Sunulan çalışmada ise aşım sezonu başında (%100) ve aşım sezonu sonu (%100) elde edilen süperovulasyon yanıtları çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Bu oranlar göz önüne alındığında, keçilerde süperovulasyon için FSH'nin başarılı olduğu ve güvenli bir şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Lehloenya (2008) aşım sezonu ve aşım sezonu dışında FSH ile yaptıkları süperovulasyon uygulamalarında sırasıyla %88,8 ve %100 yanıt elde etmişlerdir. Ortalama CL sayıları ise aşım sezonunda  $17,5 \pm 6,3$  adet ve aşım sezonu dışında ise  $21,3 \pm 5,9$  adet bulunmuştur. Sağ ve sol ovaryumlarındaki ortalama CL sayılarına bakıldığında aşım sezonunda sırasıyla  $9,8 \pm 2,7$  ve  $7,8 \pm 4,2$  adet olarak belirlenmiştir. Aşım sezonu dışında ise sağ ve sol ovaryumda ortalama CL sayıları ise sırasıyla  $12,3 \pm 2,8$  ve  $9,0 \pm 3,4$  adet bulunmuştur. Sunulan çalışmada ise uygulamalar aşım sezonu başı ve sonunda yapılmıştır. Aşım sezonu başında elde edilen süperovulasyon

(%100) oranı yüksek bulunmuş ancak aşım sezonu sonu bulguları (%88,8) paralellik göstermiştir. CL sayıları ise araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Ağaoğlu ve ark. (2014), bazı yerli ırk keçilerde yapmış oldukları çalışmada tekrarlayan süperovulasyon ve cerrahi uygulamaların embriyo üretimi üzerine etkilerinin araştırmışlardır. Ankara Keçileri'nde 1., 2. ve 3. uygulamalar sonucunda sırasıyla ortalama CL sayıları  $8,21 \pm 5,2$ ;  $8,85 \pm 5,3$  ve  $8,0 \pm 6,96$  adet olarak bildirilmiştir.

Chang ve ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada belli aralıklarla tekrarlanan süperovulasyon uygulamaları sonrasında süperovulasyon yanıtı ve transfer edilebilir embriyo oranlarında ikinci uygulamada önemli bir fark gözlemlenmemesine rağmen, üçüncü uygulamada oranların düştüğünü belirtmişlerdir.

Lehloenya ve ark. (2009), belirli bir süre sonra tekrarlanan süperovulasyon çalışmalarında fertilizasyon oranının ilk uterus yıkanmasında %99,4 iken, ikinci yıkamada %50 olduğunu ve transfer edilebilir embriyo sayısında fertilizasyon oranındaki azalmaya paralel şekilde düştüğünü bildirmişlerdir.

Süperovulasyonun başarısı; ırk, yaş, genel kondüsyon, uygulanan hormon, uygulama şekli, iklim, besleme ve çevresel koşullardan etkilenmektedir (Mapletoft ve ark., 2002). Yapılan çalışmada da aşım sezonu başında %100 ve aşım sezonu sonunda %88,8 oranında süperovulasyon yanıtı elde edilmiştir. Süperovulasyon uygulamalarında elde edilecek cevabın tahmin edilememesi, hayvanlar arasında farklılık göstermesi ve birden fazla faktörden etkilenmesi nedeniyle embriyo transfer çalışmalarında da başarıyı etkileyen en önemli faktör olduğu, sunulan çalışma sonuçlarına göre de düşünülmektedir.

Geleneksel senkronizasyon yöntemiyle, sıfır gün senkronizasyon protokolünün karşılaştırıldığı bir çalışmada fertilizasyon oranı aşım sezonu içindeki keçilerde geleneksel yöntemde %77 iken, sıfır gün protokolünde ise %83 olarak

bildirilmiştir. Bu uygulamaların sezon dışında yapılması sonucunda ise fertilizasyon oranlarının sırasıyla %76 ve %80 olduğu belirtilmiştir (Menchaca ve ark., 2007).

Sunulan tez çalışmasında kullanılan geleneksel süperovulasyon protokolünde aşım sezonu başında fertilizasyon oranı %95,3, aşım sezonu sonunda ise %87,5 olarak bulundu. Elde edilen bu oranlar, Menchaca ve ark. (2007)'nin elde ettiği oranlarla karşılaştırıldığında sezon başında ciddi farklılıkları ortaya çıktığı görüldü. Ancak çalışmamızda elde edilen sezon başı ve sonu oranlarının ortalamasının alındığında araştırmacının bulguların ile benzerlik olduğu saptanmıştır. Süperovulasyon yanıtı yüksek olan hayvanlarda fertilizasyon şekillenen oosit sayısının düşebileceği, spermanın ovidukta ulaşma süresinin farklılaşması ve ovulasyonların geniş bir süreye yayılma ihtimali (Cognie, 1999) değerlendirildiğinde fertilizasyon oranının da düşebileceği düşünüldü.

Keçilerde in vivo üretilen embriyolar; süperovulasyon uygulaması yapılan hayvanların doğal aşım ya da suni tohumlamayı izleyen 6-8. günler arası uterus kornularının uygun vasatlar yardımıyla yıkanmasıyla elde edilir. Keçilerde uterus yıkaması laparotomik, laparoskopik ya da transservikal yöntemlerle yapılabilmektedir (Paramio, 2010; Paramio ve Izquierdo, 2014). Uygulanan yöntemler ile embriyo elde etme oranı %50-80 arasında değişmektedir (Flores-Foxworth, 2007).

Lehloenya ve Greyling (2010) 'in aşım sezonunda yaptıkları çalışmada laparotomi ile embriyo elde etme oranını %57-69 olarak bulmuşlardır. Yapılan başka bir çalışmada ise bu oran %71,9 olarak tespit edilmiştir (Gonzales-Bulnes ve ark., 2002). Greyling ve ark. (2002) MOET uygulamasında laparotomi işlemi sonrası embriyo elde etme oranını %80-94 olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise laparotomi uygulaması sonrası elde edilen embriyo oranları aşım sezonu başında %67,32 ve aşım sezonu sonunda %60,57 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu oranlar Lehloenya ve Greyling (2010)'in bildirdikleri değerler arasındadır. Gonzales-Bulnes ve ark (2002) ve Greyling ve ark. (2002) çalışmalarında bildirdikleri oranlardan düşük

bulunmuştur. Bu düşünün nedeni cerrahi yöntemle yapılan embriyo toplama işlemleri sırasında ortaya çıkan vericilerin bireysel farklılıkları ve operasyon şartlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Greyling ve ark. (2002), Boer ve Indigenous ırkı keçilerde süperovulasyon uygulaması sonrası embriyoları laparotomik yolla elde etmişlerdir. Boer ırkı keçilerden elde edilen embriyolarda transfer edilebilir / dondurulabilir embriyo oranının %97 iken Indigenous ırkı keçilerde bu oranın %64 olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada aşım sezonu başında cerrahi yöntemle elde edilen 103 adet embriyodan 67 (%65,04) adedi; aşım sezonu sonunda ise elde edilen 63 adet embriyodan 42 (%66,67) adedi transfer edilebilir / dondurulabilir embriyo olarak bulunmuştur.

Vitrifikasyon uygulamaları için embriyonun en uygun gelişme döneminin blastosist aşaması olduğu bildirilmiştir (Holtz, 2005). İn vivo üretilmiş embriyolarda dondurma sonrası yaşama oranlarının, embriyonun gününden çok embriyonun gelişim aşaması ile bağlantılı olduğu bildirilmektedir. Yavaş dondurma, hızlı dondurma ya da vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan embriyoların yaşama oranlarında; blastosistlerin, morulalara göre daha iyi olduğu ifade edilmektedir (Palasz ve Mapletoft, 1996).

Gibbons ve ark. (2011), etilen glikol ve gliserol kullanarak vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan morula ve blastosist aşamasındaki embriyoları çözündürme sonrası değerlendirmişlerdir. Çözündürme sonrası transfer edilebilir morula oranının %80, elde edilen gebelik oranının %0; blastosist oranının %100, gebelik oranının ise %63,6 olarak belirtmişlerdir.

Embriyoların transfer sonrası başarı oranlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, Boer ırkı keçilere blastosist aşamasındaki embriyolar taze olarak, etilen glikol ile yavaş dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülerek ya da DMSO ve etilen glikol

kullanılarak vitrifikasyonla dondurulup çözdürülerek transfer edilmiştir. Elde edilen gebelik oranları sırasıyla %85,7; %50; %37,5 ve embriyo yaşama oranları sırasıyla %35,7; %25; %31,3 olarak bildirilmiştir (Lehloenya ve Greyling, 2010).

İki farklı keçi ırkında (Boer ve Indigenus) yapılan çalışmada taze embriyolar laparoskopik olarak transfer edilmiş ve transfer sonrası 5. haftada gebelik oranlarının Boer ırkı keçilerde %60; Indigenus ırkı keçilerde ise %67 olarak bildirmişlerdir (Greyling ve ark., 2002).

Pampukidou ve ark. (2011) yapmış oldukları çalışmada ise verici keçilerin süperovulasyon protokolünde FSH ya da PMSG kullanmış ve bu iki gruptan elde edilen embriyoları farklı alıcılara laparotomik olarak transfer etmişlerdir. FSH ile süperovulasyon yapılan keçilerden elde edilen embriyolar transfer edildiğinde %61,1; PMSG ile süperovulasyon yapılan keçilerden elde edilen embriyolar transfer edildiğinde ise %22,2'lik bir gebelik oranı bulmuşlardır. PMSG kullanımı sonrası ortaya çıkan düşük oranının nedeninin kromozom anomalileri ya da polispermik fertilizasyondan kaynaklanabileceğini ve FSH kullanımı sonrası elde edilen embriyolarda embriyo yaşam oranının artırdığını belirtmişlerdir.

Shin ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada keçilerde laparotomik ve laparoskopik embriyo transferi sonrası gebelik oranlarını karşılaştırmışlardır. Transfer sonrası 30. günde laparotomik transfer sonrası gebelik oranı %26,8 iken, laparoskopik transferde bu oranın %46,1 olduğunu bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada ise taze ve dondurulmuş çözdürülmüş embriyoların laparotomik transferi sonrası elde edilen gebelik oranları ise sırasıyla; aşım sezonu başında transferin 30. gününde %73,3; %20, transferin 90. gününde ise %46,6; %0, aşım sezonu sonunda ise transferin 30. gününde %100; %37,5, transferin 90. gününde ise %37,5; %0 olarak bulunmuştur.

Sunulan çalışmada taze embriyo ile yapılan laparotomik transfer bulguları literatür verileriyle karşılaştırıldığında, gebelik oranları; Greyling ve ark. (2002), Shin ve ark. (2008), Lehloenya ve Greyling (2010) ve Pampukidou ve ark. (2011)'nin elde ettikleri bulgulardan önemli oranda yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda aynı yöntemle transfer sonucunda 90. günde gebelik oranları ve canlı yavru oranları, diğer bir deyişle embriyo yaşama oranları da gerek aşım sezonu başında gerekse aşım sezonu sonunda belirtilen gelişme oranlarından yüksek bulunmuştur. Bu yüksekliğin nedeninin transfer sonrası alıcı hayvanların bireysel özelliklerine, bakım, besleme ve yönetim farklılıklarına bağlı olarak ortaya çıkabileceği düşünülmüştür. Ancak, çalışmamızda vitrifikasyon yöntemi ile dondurulup çözdürüldükten sonra transfer edilen embriyolardan, aşım sezonu başında ve sonunda elde edilen gebelik, canlı yavru ve embriyo yaşama oranları araştırmacıların bildirdikleri oranlardan düşük bulunmuştur. Bu oran düşüklüğüne farklı dondurma yönteminin kullanılmasının neden olabileceği kanısına varılmıştır.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada Ankara Keçisi'nin genetik özelliklerinin sonraki jenerasyonlara aktarılması ve bu genetik materyallerin korunması amacıyla embriyo eldesi, embriyoların taze olarak ya da dondurulup çözdürüldükten sonra transfer edilmesi ve bu aşamalarda transferleri ile elde edilen gebelik ve canlı yavru oranları üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

CIDR ile yapılan senkronizasyon ve FSH ile yapılan süperovulasyon yöntemi ile, embriyo transferi için ovaryumlardan etkili cevap alınabildiği için önerilebilir bir yöntem olduğu ve Ankara Keçileri'nde başarılı sonuçları vermesi nedeniyle kullanılması uygundur.

Aşım sezonu başında ve sonunda yapılan uygulamalarda gerek senkronizasyon gerekse süperovulasyon çalışmaları sonuçlarında belirgin bir farkın olmaması nedeniyle bu uygulamaların Ankara Keçileri'nde aşım sezonu boyunca başarılı bir şekilde benzer sonuçlar alınması nedeniyle uygulanması tavsiye edilebilir.

Embriyo transfer uygulamalarının cerrahi yöntemle yapılması nedeniyle gebelik ve canlı yavru oranlarında elde edilen düşük oranların, literatür verileri dikkate alındığında laparoskopik yöntemlerin uygulanması ile artırılabilir ve bu yöntem kullanılarak daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Dondurulup çözdürülerek transfer edilen embriyolarla elde edilen canlı yavru oranlarının düşük olmasının nedeninin yapılan çalışma sonucuna göre dondurma yöntemine bağlı olduğu düşünüldüğü için daha sonraki çalışmalarda farklı dondurma yöntemleri kullanılmalıdır.

Sonuç olarak, süperovulasyon ve taze embriyo transferinin (MOET) Ankara Keçileri'nin ve ülkemiz keçi ırklarının sayılarının artırılması ve saf kan gen kaynaklarının korunmasında başarıyla kullanılabileceği ve uygulamaların önerilebileceği kanısına varılmıştır.

## ÖZET

### Ankara Keçilerinde Embriyo Transfer Uygulamaları

Bu çalışmanın amaçları, Ankara Keçileri'nde aşım sezonu başı (Ekim 2013; Grup 1) ve aşım sezonu sonunda (Aralık 2013; Grup 2) yapılan süperovulasyon protokolüne bağlı olarak embriyo elde etme oranını karşılaştırmak ve taze olarak ya da dondurulup-çözdürüldükten sonra transfer edilen embriyoların canlılığını ve hayatta kalma oranını değerlendirmektir. Bu amaçla, 5 Ankara Keçisi tekesi ile çiftleştirilen 9 Ankara Keçisi keçisi verici ve 30 Ankara Keçisi keçisi ise alıcı olarak kullanıldı. Çalışma Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun etik kurul onayı ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde gerçekleştirildi.

Verici keçilere geleneksel senkronizasyon ve süperovulasyon protokolleri uygulandı ve fertil tekelerle çiftleştirildi. Geleneksel süperovulasyon protokolünde 11 gün süreyle 0.33 gr progesteron içeren preparat (CIDR® , Eazi-Breed, Animal Health) intravaginal yolla uygulandı ve bunu takip eden 9. günden başlayarak altı kez azalan doz halinde FSH (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, 200 mg) kas içi enjekte edildi. Protokolde FSH uygulaması ile birlikte bir kez prostaglandin (Dalmazin®, Vetaş; 150 µg kloprostenol), progesteron kaynağını uzaklaştırdıktan 24 saat sonra ise bir kez GnRH analogu (Receptal®, Intervet; 8,4 µg) uygulandı ve GnRH enjeksiyonunu takip eden 6-16. saatlerde keçiler fertilitesi belirlenmiş tekelerle çiftleştirildi. Çiftleşme sonrası 156. saatte in vivo üretilen embriyolar cerrahi yöntemle toplandı ve stereo mikroskop altında bulunan embriyolar IETS (Uluslararası Embriyo Transfer Topluluğu) tarafından belirtilen kriterlere uygun olarak değerlendirildi. Sezon başında yapılan uygulamada 9 keçiden 49 Expanded Blastosist (ExpBl), 18 Blastosist (Bl), 27 Hatched Blastosist (HtcBl), 9 Dejenere Embriyo ve 5 fertilize olmamış oosit (UFO) olmak üzere toplam 108 adet hücre; sezon sonunda ise aynı keçilerden 15 ExpBl, 27 Bl, 14 HtcBl, 7 Dejenere Embriyo ve 8 UFO olmak üzere toplam 71 hücre elde edildi. Taze ya da dondurulup çözdürülmüş embriyolar cerrahi yöntemle transfer edildi. Grup 1'de taze / dondurulmuş çözdürülmüş embriyolar sırasıyla 15 / 15 keçiyeye ve Grup 2'de ise taze / dondurulmuş çözdürülmüş embriyolar sırasıyla 8 / 8 keçiyeye transfer edildi. Her bir alıcının ovaryumundaki korpus luteum varlığına bağlı olarak bir ya da iki embriyo ipsilateral olarak transfer edildi. Transferin 30. gününde, keçiler transrektal ultrasonografi ile muayene edildi, taze / dondurulup çözdürülmüş transfer edilmiş embriyo için gebelik oranları sırasıyla grup 1'de %73,3 / %20 ve grup 2'de %100 / %37,5 olarak belirlendi. Transferin 90. gününde, keçiler tekrar transrektal ultrasonografi ile muayene edildi, taze / dondurulup çözdürülmüş transfer edilmiş embriyo için gebelik oranları sırasıyla grup 1'de %46,6 / %0 ve grup 2'de %37,5 / %0 olarak belirlendi.

Sezon başında ve sezon sonunda elde edilen toplam embriyo sayısı SPSS® (Version 14.01, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programından yararlanılarak ve minimum %5 hata payı ile değerlendirildi. Değişkenlere ait tanımlayıcı ölçüler, "aritmetik ortalama ± standart sapma" şeklinde hesaplandı. Önemlilik testlerine geçilmeden önce veriler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilk ile varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. Zaman içerisinde yapılan ölçümler arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılığın incelenmesinde paired sample t test kullanıldı. Yapılan analizler sonrası Ankara Keçileri'nde sezon başında elde edilen embriyo sayısı ile sezon sonunda elde edilen

embriyo sayısı arasındaki fark, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmasıyla birlikte transfer edilebilir/dondurulabilir embriyo kalitesinde değişikliğe rastlanmadı ( $p<0,05$ ).

Sonuç olarak, Ankara Keçileri'nde hem sezon başında hem de sezon sonunda süperovulasyon protokolleriyle embriyo toplanabileceği, fakat toplanan embriyo sayısında bir azalma olabileceği ve bunun sadece mevsimsel faktörlere bağlı olmadığı aynı zamanda ve daha önceki süperovulasyon protokollerine bağlı olabileceği sonucuna varıldı. Taze embriyoların transferine bağlı olarak elde edilen gebelik oranları tatmin ediciydi fakat gebe olarak belirlenen keçilerin hepsi doğurmadığı için alıcıların doğum oranında azalamaya neden oldu. Dondurulup çözdürülen embriyoların transferine bağlı olarak elde edilen başarı oranları genel olarak düşüktü ve tatmin edici değildi. Kriyoprezervasyon tekniklerinin ve Ankara Keçiler'inde embriyo yaşam oranlarının geliştirilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerektiği kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler;** Ankara Keçisi, Aşım Sezonu, Embriyo Transferi, Senkronizasyon, Süperovulasyon.

## SUMMARY

### Embryo Transfer In Angora Goats

The aims of this study were to compare the embryo recovery rate in Angora Goats based on application timing; at the beginning (October 2013; Group 1) and end (December 2013; Group 2) of the breeding season and to evaluate the viability and survivability of fresh or vitrified-thawed embryos when transferred. For this purpose, nine Angora Goats, mated with five fertile Angora Goat Bucks, were used as donors and thirty Angora Goats were used as recipients. The study performed at the Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Education and Research Farm according to the Ankara University Animal Experimentation Ethics Committee ethical approval.

Donor goats were synchronized and superovulated with traditional protocol and were mated with fertile bucks. In traditional superovulation protocol; 0.33 gr progesterone containing device (CIDR<sup>®</sup>, Eazi-Breed, Animal Health) were applied intravaginally for 11 days, and FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Animal Health, 200 mg) was injected intramuscularly as six decreasing doses subsequent 9th day. In the protocol, one dose prostaglandin (Dalmazin<sup>®</sup>, Vetaş; 150 µg kloprostenol) was injected with FSH injection and one dose GnRH analog (Receptal<sup>®</sup>, Intervet; 8,4 µg) 24 hour after removing the progesterone containing device. Then goats were mated with fertile bucks 6-16 hours later following the GnRH injection. At the 156. hour of the mating, embryos were collected surgically and evaluated under a stereo microscope according to the criteria of the IETS (Internatioanl Embryo Transfer Society).

At the beginning of the breeding season (Group 1), a total of 108 cells (49 Expanded Blastosist (ExpBI), 18 Blastosist (BI), 27 Hatched Blastosist (HtcBI), 9 Degenerate Embryo and 5 unfertilised oocyte (UFO) were collected. On the other hand at the end of the breeding season (Group 2) 71 cells (15 Expanded Blastosist (ExpBI), 27 Blastosist (BI), 14 Hatched Blastosist (HtcBI), 7 Degenerate Embryo and 8 Unfertilised oocyte (UFO) were collected in total from nine goats. Fresh or vitrified-thawed embryos were transferred surgically to synchronized recipients. In Group 1 fresh / thawed embryos were transferred to 15 / 15 goats and in group 2, fresh / thawed embryos were transferred to 8 / 8 goats, respectively. Each recipient received one or two embryos ipsilateral to the ovary containing one or more corpora lutea. On the 30<sup>th</sup> day of the transfer, goats were examined by transrectal ultrasonography, pregnancy rates of fresh / thawed embryos were 73.3% / 20% for group 1 and 100% / 37.5% for group 2. On the 90<sup>th</sup> day of the transfer, goats were examined again by ultrasonography, pregnancy rates were 46,6% / 0% for group 1 and 37,5%/0% for group 2, respectively.

The total number of collected embryos at the beginning and end of the breeding season were analyzed using SPSS<sup>®</sup> (Version 14.01, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and for all comparisons, differences were considered with a minimum of %5 significance level. Descriptive statistics of all data were calculated and shown as 'mean ± standard error of

mean'. Paired sample t test was used to evaluate the significant differences of means among the groups, after testing normality using Shapiro Wilk test and homogeneity of variances using Levene test as parametric test assumptions. After statistical analyses, the numbers of collected embryos at the beginning and at the end of the breeding season were compared. There was no difference in freezable/transferable embryo quality and this difference was found to be statistically significant ( $p < 0,05$ ).

As a result, embryos could be collected after superovulation protocols in Angora Goats both at beginning and end of the breeding season, however there might be a decrease in numbers of collected embryos and the reasons for this might not be only the seasonal factors but also the previous superovulation protocols. The pregnancy rate following transfer of fresh embryos was satisfactory but not all does confirmed pregnant kidded - hence reducing the number of recipients kidding. The pregnancy rate following transfer of vitrified-thawed embryos was generally low and unsatisfactory. Further research is warranted in improving the cryopreservation techniques and thus the embryo survival rate of Angora Goat embryos.

**Keywords:** Angora Goat, Breeding Season, Embryo Transfer, Superovulation, Synchronization.

## KAYNAKLAR

- ABEBE, G. (2008). Reproduction in Sheep and Goats. In: *Sheep and Goat Production Handbook for Ethiopia*, Eds: A. Yami, R.C. Merkel (1. Baskı). Ethiopia Sheep and Goat Productivity Improvement Program (ESGPIP), Oklahama, USA.
- ABECIA, J.A., FORCADA, F., GONZÁLEZ-BULNES, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci.*, **130**(3-4): 173-179.
- AGAOĞLU, A.R., KARAKAŞ, K., KAYMAZ, M. (2014). In vivo embryo production in some native goat breeds in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, **38**: 238-244.
- AKYOL, N. (2001). Sığır embriyo transferinde hormon kullanımı. *Lalahan Hay. Araş. Enst. Derg.*, **41**(1): 95-104.
- AKYOL, N., KIZIL, S.H., TUNCER, P.B. (2004). İneklerde süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmaları. *Lalahan Hay. Araş. Enst. Derg.*, **44**(1): 1-5.
- ALAÇAM, E. (2007). Üremenin Kontrolü. In: *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*, Ed: E. Alaçam (6. Baskı). Ankara: Medisan.
- AMIRIDIS, G.S., CSEH, S. (2012). Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.*, **130**: 152-161.
- ANKARA TARIM İL MÜDÜRLÜĞÜ. (2002). Tarih boyunca Ankara'nın Simgesi Ankara Keçisi. *Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Ankara İl Müdürlüğü, Tarım İl Müdürlüğü Yayınları*, Yayın No: 10, Ankara.
- ARIKAN, M.S., ARAL, Y. (2013). Ankara Keçisi Yetiştiriciliği ve Tiftik Üretiminde Mevcut Durum, Sorunlar ve Çözüm Önerileri. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **10**(3): 201-213.
- BALDASSARRE, H., KARATZAS, C.N. (2004). Advanced assisted reproduction Technologies (ART) in goats. *Anim. Reprod. Sci.*, **83**: 255-266.
- BAŞTAN, A., KÜPLÜLÜ, Ş. (1995). Akkaraman Irkı Koyunlarda Melatonin ve Progestagen Uygulamalarının Reprodüktif Performans Üzerine Etkileri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **42**: 263-270.
- BOWEN, R. A. (2003). Embryo Transfer In Domestic Animals. In: *Mcdonald's Veterinary Endocrinology And Reproduction* Eds: M.H. Pineda, M.P. Dooley (5. Baskı). Blackwell, USA.

- CANOOĞLU, E., SARIBAY, K. (2012). Üreme Kanalının Morfolojisi ve Üreme Fizyolojisi. In: *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji*, Ed: A. Semacan, M. Kaymaz, M. Findık, A. Rışvanlı, A. Köker. Malatya: Medipres, p.: 521-548.
- CHANG, Z., FAN, X., LUO, M., WU, Z., TAN, J. (2006). Factors Affecting Superovulation and Embryo Transfer in Boer Goats. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, **19**(3): 341-346.
- COGNIE, Y. (1999). State of the ART in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, **51**: 105-116.
- CSEH, S., CORSELLI, J., NEHLSN-CANNARELLA, S.L., BAILEY, L.L., SZALAY, A.A. (1997). The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology*, **48**(1): 43-50.
- ÇEVİK, M., YURDAYDIN, N. (1998). Evcil hayvanlarda fotoperiyodizm ve dölverimine etkisi. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, **38**: 69-78.
- ÇOLPAN, İ. (2006). Keçi Besleme. In: *Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları*, Ed: A. Ergün, Ş.D. Tuncer, İ. Çolpan, S. Yalçın, G. Yıldız, M.K. Küçükersan, S. Küçükersan, A. Şehu (Geliştirilmiş 3. Baskı). Ankara: Pozitif, p: 347-370.
- EDMONDSON, M.A., ROBERTS, J.F., BAIRD, A.N., BYCHAWSKI, S., PUGH, D.G. (2012). Theriogenology of sheep and goats. In: *Sheep and Goat Medicine*, Eds: D.G. Pugh, A.N. Baird (2. Baskı). Missouri: Elsevier Saunders.
- FATET, A., PELLICER-RUBIO, M.T., LEOEUF, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Anim. Reprod. Sci.*, **124**(3-4): 211-219.
- FIENI, F., BECKERS, J.P., BUGGIN, M., BRUYAS, J.F., PERRIN, J., DAUBIE, M., TAINTURIER, D., (1995). Evaluation of cryopreservation techniques for goat embryos. *Reprod. Nutr. Dev.*, **35**: 367-373.
- FLORES-FOXWORTH, G. (2007). Reproductive Biotechnologies in the Goat. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Ed: R.S. Youngquist (1. Baskı) W. B. Saunders Company. p.: 560-567.
- GIBBONS, A., CUETO, M.I., PEREYRA BONNET, F., (2011). A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Ruminant Res.*, **95**: 61-64.
- GONZALEZ-BULNES, A., GARCIA-GARCIA, R.M., SANTIAGO-MORENO, J., LOPEZ-SEBASTIAN, A., COCERO, M.J. (2002). Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, **58**(8): 1607-1614.
- GORDON, I. (1997). *Reproduction in Sheep and Goats*. (1. Baskı). USA: CAB International Publishing.



- GORDON, I. (2003). Laboratory Production of Cattle Embryos. (2. Baskı). USA: CABI Publishing.
- GORDON, I. (2004). Reproductive Technologies in Farm Animals. (1. Baskı). USA: CABI Publishing.
- GREYLING, J.P. (2000). Reproduction traits in the Boer goat doe. *Small Ruminant Res.*, **36**(2): 171-177.
- GREYLING, J.P.C., van der NEST, M., SCHWALBACH, L.M.J., MULLER, T. (2002). Superovulation and embryo transfer in South African Boer and Indigenous feral goats. *Small Ruminant Res.*, **43**(1): 45-51.
- HOLTZ, W. (2005). Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Ruminant Res.*, **60**: 95-110.
- HOLTZ, W., PEREIRA, R.J.T.A., SUYADI, WANG, X.L., PADILLA, G., SOHNREY, B., (2000). Collection of goat embryos via transcervical route. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Goats*, Tours, France, 15-21 May, p.: 490-491.
- HU, J., BAO, J., MA, X., LI, W., LEI, A., YANG, C., GAO, Z., WANG, H. (2010). FSH is superior to eCG for promoting ovarian response in Chinese Bamei gilts. *Anim. Reprod. Sci.*, **122**(3-4): 313-316.
- ISHWAR, A.K., MEMON, M.A. (1996). Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Res.*, **19**: 35-43.
- JAINUDEEN, M.R., WAHID, H., HAFEZ, E.S.E. (2000). Sheep and goats. In: *Reproduction and Farm Animals* (7. Baskı) Ed.: A. Wolters, Philadelphia: Kluwer Company, p.: 172-181.
- KALKAN, C., HOROZ, H. (2007). Pubertas ve Seksüel Sikluslar. In: *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite* (6. Baskı), Ed.: E. Alaçam, Ankara: Medisan, p.: 23-40.
- KAYMAZ, M. (2012). Yardımcı Üreme Teknikleri. In: *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji* Ed: A. Semacan, M. Kaymaz, M. Fındık, A. Rışvanlı, A. Köker. Malatya: Medipres, p.: 695-811.
- KRUSE, S. (2012). Vitrification of in vitro- and in vivo- produced bovine embryos for direct transfer. PhD thesis, Colorado State University, Fort Collins, Colorado.
- LASSALA, A., HERNÁNDEZ-CERÓN, J., RODRIGUEZ-MALTOS, R., GUTIERREZ, C.G. (2004). The influence of the corpus luteum on ovarian follicular dynamics during estrous synchronization in goats. *Anim. Reprod. Sci.*, **84**: 369-375.
- LE GAL, F., BA, G., VALLET, J.C., LEBOEUF, B., (1993). In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. *Theriogenology*, **40**: 771-777.

- LEHLOENYA, K.C. (2008). Multiple ovulation and embryo transfer in goats. PhD thesis, University of the Free State, Bloemfontein, Republic of South Africa.
- LEHLOENYA, K.C., GREYLING, J.P.C. (2010). The ovarian response and embryo recovery rate in Boer goat does following different superovulation protocols, during the breeding season. *Small Ruminant Res.*, **88**: 38-43.
- LEHLOENYA, K.C., GREYLING, J.P.C., GROBLER, S. (2009). Can repeated superovulation and embryo recovery in Boer goats limit donor participation in a MOET programme?. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, **39** (Supp.1): 193-197.
- LI, R., CAMERON, W.N., BATT, P.A., TOUNSON, A.O., (1990). Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod. Fertil. Dev.*, **2**: 345-350.
- LIMA-VERDE, J.B., LOPES JUNIOR, E.S., TEIXEIRA, D.I.A., PAULA, N.R.O., MEDEIROS, A.A., RONDINA, D., FREITAS, V.J.F. (2003). Transcervical embryo recovery in Saanen goats. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, **33**(2): 127-131.
- MAPLETOFT, R.J., STEWARD, K.B., ADAMS, G.P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, **42**(6):601-611.
- MARTINEZ, A.G., VALCARCEL, A., FURNUS, C.C., de MATOS, D.G., IORIO, G., de IAS HERAS, M.A. (2006). Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Ruminant Res.*, **63**: 288-296.
- MENCHACA, A., MILLER, V., SALVERAGLIO, V., RUBIANES, E. (2007). Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the shortterm protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim. Reprod. Sci.* **102**: 76-87.
- MENCHACA, A., VILARIÑO, M., CRISPO, M., de CASTRO, T., RUBIANES, E. (2010). New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fertil Dev.*, **22**(1): 113-118.
- MOTLOMELO, K.C., GREYLING, J.P.C., SCHWALBACH, L.M.J. (2002). Synchronization of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. *Small Ruminant Res.*, **45**: 45-49.
- MUKAIDA, T., KASAI, M. (2004). Cryobiology: Slow Freezing Vitrification of Embryos. In: *A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo*, Ed: D.K. Gardner, M. Lane, A.J. Watson (1. Baski) Oxford University Press.
- NOWSHARI, M.A., HOLTZ, W., (1995). In vitro culture of goat morulae to blastocysts before freezing. *Theriogenology*, **44**: 983-988.
- OPPENHEIM, S.M., MOYER, A.L., BONDURANT, R.H., ROWE, J.D., ANDERSON, G.B. (2000). Successful pregnancy in goats carrying their genetically identical conceptus. *Theriogenology*, **54**: 629-639.

- ÖZYURTLU, N., BADEMKIRAN, S. (2010). Koyunlarda Östrus Senkronizasyonu ve Östrusu Uyarma Yöntemleri. *Dicle Üniv Vet Fak Derg* **1**(1): 17-22.
- PALASZ, A.T., MAPLETOFT, R.J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.*, **14**(2): 127-149.
- PAMPUKIDOU, A., ALIFAKIOTISL, T., AVDIL, M., IVANOVI, R. (2011). Superovulation and embryo transfer in goats by using PMSG or FSH. *J. Agric. Sci. Technol.*, **3**(2): 94-97.
- PARAMIO, M.T. (2010). In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Ruminant Res.*, **89**: 144-148.
- PARAMIO, M.T., IZQUIERDO, D. (2014). Assisted reproduction technologies in goats. *Small Ruminant Res.*, **121**: 21-26.
- PERRY, G. (2014). IETS 2013 Statistics and Data Retrieval Committee Report. *Embryo Transfer Newsletter*. **31**(4): 24-46.
- PULS-KLEINGELD, M., NOWSHARI, M.A., HOLTZ, W., (1992). Cryopreservation of goat embryos by the one-step or three-step equilibration procedure. In: *Recent Advances in Goat Production*. Ed: R.R. Lokeshwar. New Delhi: Nutan Printers, p.: 1388-1391.
- PUTRO, P. (2011). Freezing of Bovine Embryos. Erişim Tarihi: 04.11.2014 Erişim adresi: [<http://prabowoputro.com/freezing-of-bovine-embryos.html>].
- ROBERTSON, I., NELSON, R. (2010). Certification and identification of the embryo. In: *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)*, Ed: D.A. Stringfellow, S.M. Seidel (3. Baskı). Savoy, IL, USA: IETS.
- ROMANO, J.E. (2004). Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. *Small Ruminant Res.*, **55**: 15-19.
- SAĞIRKAYA, H., BAĞIŞ, H. (2003). Memeli Embriyolarının Kriyoprezervasyonu. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.*, **22**: 127-135.
- SÁNCHEZ-DÁVILA, F., LEDEZMA-TORRES, R.A., PADILLA-RIVAS, G., DEL BOSQUE-GONZÁLEZ, A.S., GONZÁLEZ GÓMEZ, A., BERNAL-BARRAGÁN, H. (2014). Effect of three pFSH doses on superovulation and embryo quality in goats during two breeding seasons in north-eastern Mexico. *Reprod Domest Anim.*, **49**(4):e40-e43.
- SELVARAJU, S., AGARWAL, S.K., KARCHE, S.D., MAJUMDAR, A.C. (2003). Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology*, **59**: 1459-1468.

- SEVİNÇ, A., TEKİN, N., YURDAYDIN, N., KALE, N. (1985). Çifteler Harası Tiftik Tekelerinin Başlıca Spermatolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. *Doğa Bilim Derg.*, **9** (3): 265-273.
- SHIN, S.T., JANG, S.K., YANG, H.S., LEE, O.K., SHIM, Y.H., CHOI, W.I., LEE, D.S., LEE, G.S., CHO, J.K., LEE, Y.W. (2008). Laparoscopy vs. laparotomy for embryo transfer to produce transgenic goats (*Capra hircus*). *J. Vet. Sci.*, **9**(1): 103-107.
- ŞAHİN, G. (2013). Türkiye’de Ankara Keçisi (*Capra Hircus Ancryrensis*) Yetiştiriciliğinin Dünü Bugünü Ve Yarını. *Celal Bayar University Journal of Social Sciences*, **11** (2): 338-352.
- TAŞDEMİR, U., AĞAOĞLU, A.R., KAYMAZ, M., KARAKAŞ, K. (2011). Ovarian Response and Embryo Yield of Angora and Kilis Goats Given The Day 0 Protocol for Superovulation in The Non-Breeding Season. *Trop. Anim. Health Prod.*, **43**(5): 1035-1038.
- TEKELİ, T. (2007). Embriyo Nakli. In: *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*, Ed: E. Alaçam (6. Baskı). Ankara: Medisan.
- TUİK. (2014). Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2013. Erişim adresi: [[http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1002](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002)]. Erişim Tarihi: 10/08/2014.
- UÇAR, M., ÖZYURTLU, N. (2012). Üremenin Denetlenmesi. In: *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji*, Ed: A. Semacan, M. Kaymaz, M. Fındık, A. Rişvanlı, A. Köker. Malatya: Medipres, p.: 549-565.
- VAJTA, G. (2000). Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, **60**: 357-364.
- VAJTA, G. (2013). Vitrification in human and domestic animal embryology: work in progress. *Reprod. Fertil. Dev.*, **25**(5): 719-727.
- VAJTA, G., KUWAYAMA, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, **65**(1): 236-244.
- WHITLEY, N.C., JACKSON, D.J. (2004). An update on estrus synchronization in goats: a minor species. *J. Anim. Sci.*, **82**: E270-276.
- YILMAZ, B. (1999). Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. (1. Baskı). Ankara: Feryal Matbaacılık.
- YELLON, S.M., FOSTER, D.L., LONGO, L.D., SUTTIE, J.M. (1992). Ontogeny of the pineal melatonin rhythm and implications for reproductive development in domestic ruminants. *Anim. Reprod. Sci.*, **30**: 91-112.

YOUNGS, C.R., LEIBO, S.P., GODKE R.A. (2010). Embryo cryopreservation in domestic mammalian livestock species. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, **5**: 060.

## EKLER



T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

## HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :04/07/2012  
TOPLANTI NO :2012-14  
DOSYA NO :2012-61  
KARAR NO :2012-14-89

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.İ.Hakkı İzgür'ün araştırma yürütücüsü olduğu, Prof.Dr.İ.Hakkı İzgür ve Vet.Hek.Kübra Karakaş'ın ortak çalışmaları olan "Ankara Keçilerinde Embriyo Transferi Uygulamaları" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre;

Uygun bulunarak onaylanmasına,

Düzeltilmesine,

oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatih CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 - 50 Faks: 0 (312) 212 60 49

Ek-1. Etik Kurul onay belgesi

## ÖZGEÇMİŞ

### I – Bireysel Bilgiler

Adı : Kübra  
Soyadı : Karakaş  
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara / 20.06.1985  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Durumu : Bekâr  
İletişim Adresi ve Telefonu : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı  
0 312 0317 03 15 / 4508

### II – Eğitimi

2009 – 2015 : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı  
Doktora Programı  
2003 – 2009 : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
1999 – 2003 : Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi (YDA)  
1991 – 1999 : Ankara Etlik İlköğretim Okulu  
Yabancı Dil : İngilizce

### III – Ünvanları

2012 Araştırma Görevlisi  
2009 Veteriner Hekim

### IV – Üye Olduğu Kuruluşlar

International Embryo Transfer Society (IETS)  
Türk Veteriner Jinekoloji Derneği  
Veteriner Hekimler Derneği

## V – Bilimsel Yayınlar

### Uluslararası hakemli (SCI-expanded, SCCL, AHCI kapsamındaki) dergilerde yayımlanan makaleler

**KARAKAS K**, ALKAN H, ONUR G, OZEN D, KAYMAZ M, IZGUR H. (2014). Evaluation of embryo recovery rate and embryo transfer in angora goats. *Reproduction, Fertility and Development* 27(1) 168.

ALCIGIR ME, **KARAKAS K**, KANCA H, ALKAN H, VURAL SA, TUNC AS. (2014). A case of ovarian remnant syndrome with cystic papillary hyperplasia in a queen: Clinicopathological evaluation and expressions of oestrogen and progesteron receptors, uroplakins and transforming growth factor-1. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.*, 4(10): 526-531.

AGAOGLU AR, **KARAKAS K**, KAYMAZ M. (2014). In vivo embryo production in some native goat breeds in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 38: 238-244.

KAUTZ E, GRAM A, ASLAN S, AY SS, SELCUK M, KANCA H, KOLDAS E, AKAL E, **KARAKAS K**, FINDIK M, BOOS A, KOWALEWSKI MP. (2014). Expression of genes involved in the embryo-maternal interaction in the early pregnant canine uterus. *Reproduction*, 147 (5): 703-717.

CENGİZ M, KANCA H, SALAR S, BASTAN A, KUCUKASLAN I, ALKAN H, **KARAKAS K**, YUKSEL O. (2014). Endometrial echotexture parameters in saanen goats during estrus and early pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 146 (1-2): 27-33.

KANCA H, **KARAKAS K**, DALGIC A, SALAR S, IZGUR H. (2014). Vaginal cytology after induction of ovulation in the queen: a comparison between postestrus and diestrus. *Australian Veterinary Journal*, 92(3): 65-70.

KAYMAZ M, AGAOGLU AR, **KARAKAS K**, YAGCI IP, AGAOGLU OK, TASDEMİR U. (2012). Effects Of Repeated Superovulation On Embryo Yields in Some Turkish Native Goat Breeds. *Reproduction Fertility and Development*, 25(1):268.

KANCA H, **KARAKAS K**, BAYRAKTAROGLU AG, SENEL OO. (2012). Ovariohysterectomy in a domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 307-310.



KANCA H, **KARAKAS K**, YAGCI IP, BASARAN T. (2012). Evaluation of once daily dose of phenylpropanolamine in the treatment of urethral sphincter mechanism incompetence in spayed bitches. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 59, 203-210.

AGAOGLU AR, KAYMAZ M, AGAOGLU OK, **KARAKAS K**, YAGCI IP, TASDEMİR U. (2012). Effect of Different Gonadotropin Preparation on Ovulatory Response and Embryo Yield in Karayaka Ewes. Kafkas Univ Vet Fak Derg 18 (5): 861-864.

KANCA H, **KARAKAS K**. (2012). Effectiveness of Aglepristone at Lower-Than-Standard Doses in Prevention of Pregnancy in Mismatched Bitches. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 18 (3): 517-521.

OZALP GR, ZIK B, BASTAN A, PEKER S, OZDEMİR-SALCI ES, BASTAN I, DARBAZ I, SALAR S, **KARAKAS K**. (2012) Vincristine Modulates The Expression Of Ki67 And Apoptosis In Naturally Occurring Canine Transmissible Venereal Tumor (TVT). Biotechnic & Histochemistry, 87(5): 325-330.

TASDEMİR U, AGAOGLU AR, KAYMAZ M, **KARAKAS K**. (2011). Ovarian Response And Embryo Yield Of Angora And Kilis Goats Given The Day 0 Protocol For Superovulation In The Non-Breeding Season. Trop Anim Health Prod. 43(5):1035-1038.

#### **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler**

DARBAZ I, **KARAKAS K**, AGAOGLU AR, ALKAN E, ALCIGIR E, KISMALI G. (2011). Malign Melanoma in Norduz Goat: Case Report.15th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) 15-17 september 2011, Antalya-Turkey. Reproduction in Domestic Animals Vol 46(3):97.

AGAOGLU AR, KAYMAZ M, **KARAKAS K**, DARBAZ I, SARI G, ALKAN E, AGAOGLU OK, TASDEMİR U. (2011). Effects of different superovulation and synchronization protocols on the ovarian response and embryo yield in angora goats. 15th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) 15-17 september 2011, Antalya-Turkey. Reproduction in Domestic Animals Vol 46(3):79.

KANCA H, **KARAKAS K**, SALAR S (2011). Vaginal cytology in queens after induction of ovulation: a comparison between post-estrus and diestrus. 17th FECAVA Eurocongress 6th TSAVA Congress, September 7-10, 2011, Istanbul-Turkey.

CENGİZ M, KANCA H, SALAR S, BASTAN A, KUCUKASLAN I, ALKAN H, **KARAKAS K**, YUKSEL O (2013). Endometrial Echotexture Parameters in Saanen Goats during Estrus and Early Pregnancy. 38th Joint Conference On Veterinary and Human Reproductive Medicine, Reproductive Biology, 13 (Supp. 2), p.36.

KAUTZ E, GRAM A, ASLAN S, AY SS, SELCUK M, KANCA H, KOLDAS E, AKAL E, **KARAKAS K**, FINDIK M, BOOS A, KOWALEWSKI MP. (2014). Embryo-maternal interaction during the process of decidualization in the early pregnant canine uterus. 47th Annual Conference for Physiology and Pathology of Reproduction / 39th Joint Veterinarian-Human-Medicine Congress, 27-28 February 2014, Giessen, Germany. Reproduction In Domestic Animals Vol 1 (SI): 27-27.

#### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler**

**KARAKAS K**, BAYRAKTAROĞLU AG, SENEL OO, KANCA H (2010). Bir evcil gelincikte (*Mustela putorius furo*) ovaryohisterektomi operasyonu. IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 4-7 Kasım 2010, Belek/ANTALYA.

TASDEMİR U, AGAOĞLU AR, KAYMAZ M, **KARAKAS K**, BUCAK MN (2010). Anöstrus döneminde Ankara ve Kilis keçilerinde Day 0 protokolünün etkinliğinin karşılaştırılması. IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 4-7 Kasım 2010, Belek/ANTALYA.

CANATAN HE, **KARAKAS K**, BULUT G, CENGİZ M (2010). Bir güvercinde yumurta takılma olgusuna operatif yaklaşım. IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 4-7 Kasım 2010, Belek/ANTALYA.

CANATAN HE, SARI G, POLAT M, KANCA H, SALAR S, **KARAKAS K**, BASTAN A, COLAKOĞLU EC. (2012). Bir köpekte fetal maserasyon ve fetal kemiklerin vaginal retensiyonu olgusu. 7. Küçük Hayvan Veteriner Hekimleri Derneği (KHVHD) Kongresi, 9-10 Kasım 2012, İSTANBUL.

BASTAN A, SEL T, **KARAKAS K**, SALAR S, BASTAN I, ALKAN H, EFEDAYI S, SEKER D, KANCA H. (2013). Ovaryektomi ve Ovaryohisterektomi Yapılan Köpeklerde serum Seruloplazmin ve Paraoksonaz Düzeylerinin Karşılaştırılması. V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, P: 54-55.

ANADOL E, YAR SAGLAM AS, GULTIKEN N, **KARAKAS K**, ALCIGIR E, ALKAN H, KANCA H. (2013). Köpek Meme Tümörlerinde COX-2, INOS ve VEGF Ekspresyonu. V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, P: 60-61.

KANCA H, ALCIGIR E, ALKAN H, **KARAKAS K**, ONUR G. (2013). Bir Kedide Parsiyel Mol Hidatiforma Bağlı Gebelik Kaybı. V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, P: 74-75.

KANCA H, **KARAKAS K**, ALKAN H, TEZ G. (2013). Kedilerde Orta Dönem Gebeliklerin Sonlandırılmasında Aglepriston ve Aglepriston- Prostaglandin F2 $\alpha$  Kombinasyonunun Karşılaştırılması. V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, P: 106-107.

ONUR G, **KARAKAS K**, ALKAN H, KOC BT, OGUZOGLU TB, KANCA H. (2013). Üçüz Gebe Bir Keçide Sınır Hastalığı (Border Disease) Nedeniyle İki Fötüsün Maserasyonuna Bağlı Güç Doğum Olgusu. V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, P: 202-203.

KAYMAZ M, AGAOGLU AR, **KARAKAS K**, YAGCI IP, TASDEMİR U. (2013). Tekrarlayan süperovulasyon uygulamaları kullanılarak bazı yerli keçi ırklarında in vivo embriyo üretimi. V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, P: 232-233.

**KARAKAS K**, ALKAN, H., ONUR, G., ÖZEN, D., KAYMAZ, M., İZGÜR, H. (2014). Ankara Keçilerinde Klasik Süperovulasyon Uygulamasının Embriyo Eldesi Üzerine Etkileri. Uluslararası Katılımlı Küçükbaş Hayvancılık Kongresi, Konya, P: 248-249.

## **VI – Bilimsel Etkinlikleri**

### **Projeler**

Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının In Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-I (Proje no: 106G005) , Bursiyer, 777472 TL, TÜBİTAK, 2007-2012.

Ankara Keçilerinde Embriyo Transfer Uygulamaları (Proje no:13B3338001), Yardımcı Araştırmacı, 76371 TL, BAP, 2013-Devam etmektedir.

## **Aktiviteler**

Uygulamalı Ovosit Mikromanüplasyonu ve Mikroenjeksiyon (ICSI-SUZI) Kursu, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 4-5 Nisan 2009.

IV. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi /Uluslararası Katılımlı), Antalya, 4- 7 Kasım 2010.

Memeli Hayvanlarda In Vitro Embriyo Üretimi ve Nükleer Transfer, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisiliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, 28 Mart-01 Nisan 2011.

Süt İneklerinde Reprodüktif Sürü Sağlığı Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 25 Nisan 2011.

Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (ANKÜSEM) ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kursu (Kursiyer), ANKÜSEM, 26 Aralık 2011-06 Ocak 2012.

39<sup>th</sup> Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Hannover, Almanya, 19-22 Ocak 2013.

V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Antalya, 31 Ekim-3 Kasım 2013.

Uluslararası Katılımlı Küçükbaş Hayvancılık Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Konya, 16-18 Ekim 2014.

41<sup>st</sup> Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Versailles, Fransa, 10-13 Ocak 2015.

## **Verdiği Seminerler**

1. GnRH Analog, Agonist ve Antagonistlerinin Veteriner Reprodüktif Alanda Kullanımı: 1.Ruminant ve Equide.
2. GnRH Analog, Agonist ve Antagonistlerinin Veteriner Reprodüktif Alanda Kullanımı: 2. Kedi ve Köpekler.