

Pırlak koyunlarda Kisspeptinin LH profili ve reproduktif parametrelere etkileri*

Muhammed Kürşad BİRDANE, Hacı Ahmet ÇELİK

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye.

Özet: Bu çalışmada, Kisspeptin-10 (Kp-10) uygulamasının LH profili ve reproduktif parametrelere olan etkileri araştırıldı. Üreme sezonunda 60 baş pırlak koyunu 3 eşit (n=20) gruba bölündü. Tüm grupların östrus senkronizasyonu çift doz PGF₂ α yöntemi ile gerçekleştirildi. Grup 1'e, ikinci PGF₂ α enjeksiyonunu takip eden 40. saatte bir kez Kp-10 (1 μ g/kg, i.v), Grup 2'ye 40 ve 50. saat olmak üzere iki kez Kp-10 (1 μ g/kg, i.v) uygulaması gerçekleştirildi. Grup 3'e ise Kp-10 uygulaması yapılmadı, serum fizyolojik uygulandı. Tüm gruplardaki koyunlar 42-43. saatler içerisinde elde sıfat yöntemiyle çiftleştirildi. Grup 2'nin son PGF₂ α enjeksiyonunu takip eden 50,5. saat plazma LH düzeyi Grup 1 ve Grup 3'e göre daha yüksek bulundu (p=0.005). Preovulatör LH dalga başlangıcı ve LH pik zamanı tüm gruplarda benzer saatte gerçekleşti. Grup 2'nin preovulatör LH pik düzeyi grup 1 ve grup 3'e göre daha yüksek tespit edildi (p=0.030). Grup 1, 2 ve 3'te LH dalga süresi sırasıyla 18,63 \pm 7,21, 18,03 \pm 5,00 and 12,55 \pm 6,93 saat (p=0.009) olarak belirlendi. Grup 1 ve Grup 2'nin 55. saat toplam salınan LH düzeyi (LH AUC) Grup 3'e göre daha yüksek bulundu (p= 0.042). Gruplar arasında progesteron (P₄) ve östradiol (E₂) profilleri ile östrus, gebe kalma, fekondasyon ve proliferasyon oranları benzer bulundu. Sonuç olarak, Kp-10'nun LH profilini önemli derecede etkileyebildiği, ancak, reproduktif parametreler üzerinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı belirlendi.

Anahtar sözcükler: Kisspeptin 10, Pırlak koyunu, preovulatör LH, reproduktif parametre.

The effects of Kisspeptin on LH profile and reproductive parameters in Pırlak sheep

Summary: In this study, it was investigated, the effects of application of Kisspeptin-10 (Kp-10) on the luteinizing hormone (LH) profiles and reproductive parameters. Total 60 Pırlak sheep were allocated into 3 equal (n=20) groups in breeding seasons. Estrous cycles were synchronized with double PGF₂ α method. Following a second cloprostenol injection, the Group 1 was treated with human kisspeptin-10 (1 μ g/kg) once at 40th h but the Group 2 was treated with Kp-10 (1 μ g/kg) twice at 40th and 50th h. The Group 3 was not treated with Kp-10 but treated with serum physiologic. All group of ewes were mated between 42nd and 43rd hours by hand mating system. Onset of LH surge and peak time of LH occurred similar time in all groups. Group 2 plasma levels of LH at 50.5 h following last cloprostenol was found higher than Group 1 and Group 3 (p=0.005). Preovulatory LH peak concentration of Group 2 was found higher than Group 1 and Group 3 (p=0.030). Duration of LH surge was 18,63 \pm 7,21, 18,03 \pm 5,00 and 12,55 \pm 6,93 h respectively in Group 1, 2 and 3 (p=0.009). Group 1 and Group 2 of the area under the curve for LH (LH AUC) at 55 h were higher than Group 3 (p=0.042). Progesterone (P₄), estradiol (E₂) profiles and oestrus, conception, fecundity and prolificacy rates were found to be similar (p> 0.05) between the all groups. As a result, it was found that Kp-10 can be affect LH profiles but had no significant change on reproductive parameters.

Keywords: Kisspeptin 10, Pırlak sheep, preovulatory LH, reproductive parameters.

Giriş

Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ve luteinleştirici hormon (LH) reproduktif fonksiyonların devamlılığında kritik bir öneme sahiptir (10). Gonadal steroidler, GnRH ve diğer periferik sinyaller arasında bulunan hücrel ve moleküler mekanizmaların işleyişi günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır (4). Reprodüksiyon ile ilgili bu nöral sinyaller arasındaki etkileşim üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, 2003 yılında Kisspeptin (Kp) adlı peptidin GnRH sekresyonunu kontrol etmedeki rolü-

nün keşfedilmesi, reprodüksiyon ve nöroendokrinoloji alanında yeni çalışmaların önünü açmıştır (2, 5, 16).

Reprodüksiyon alanında ilk olarak pubertanın kontrolünde önemi belirlenen Kisspeptin'in, hipotalamusta bulunan Kp reseptörlerine bağlanarak hipofizden LH ve follikül uyarıcı hormon (FSH) salınımına yol açtığı tespit edilmiştir (2, 3). Koyunların arkuat bölgesi ve median eminens'in GnRH nörosekretuar terminal liflerinde, kolonize halinde bulunan GnRH ve Kp hücrelerinin, hipofizer portal sisteme birlikte salınarak hipofizde bulu-

* Bu makale, "Kisspeptinin Koyunlarda Bazı Reproduktif Parametrelere Etkisi" isimli doktora tezinden üretilmiştir. 2013 yılında düzenlenen V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji kongresinde sunulmuştur.

nan GnRH/Kp reseptörlerini sinerji içerisinde uyardığı bildirilmektedir (2, 3, 5, 18). Koyunlarda Kp sistemini oluşturan kisspeptin geni, peptidi ve reseptörünün, GnRH/LH sekresyonu, pozitif ve negatif geri bildirim, mevsimsel üreme ve enerji metabolizması gibi reproduksiyonun devamlılığı için hayati fonksiyonlara sahip mekanizmalar üzerinde etkilerinin olduğu belirtilmektedir (2, 5, 16). Kisspeptinin preovulatr LH dalgasını tetikleme nedeniyle, ovulasyon senkronizasyonu gibi reproduksiyonun farklı alanlarında başarılı bir şekilde kullanılabilmesi öngörülmektedir (2). Ancak Kp'nin östrüs, gebe kalma, fekondasyon ve proliferasyon oranlarına etkileri henüz araştırılmamış olup, Kp uygulamalarının preovulatr LH profili üzerine olan etkilerini belirlemeye yönelik mevcut araştırmalar yetersizdir. Sunulan bu çalışmada; preovulatr dönemde tek veya 10 saat ara ile çift doz uygulanan Kp'nin, ovulasyon için kritik önemi bulunan LH profiline ve reproduktif parametrelere olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hayvan materyali: Bu çalışmaya Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu (AKUHAYDEK, 63-09 nolu çalışma) tarafından onay verildi. Hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan, 4-6 yaşlı 60 baş Pırlak ırkı koyun üreme sezonunda (Ekim-Kasım) kullanıldı.

Kisspeptin: Çalışmada "Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂" dizilimine sahip Kp-10 (Kisspeptin-10/Metastatin (45-54) amide human, NeoMPS/PolyPeptide; Fransa Kat. No: SC1389) kullanıldı.

Grupların oluşturulması ve senkronizasyon yöntemi: Sürü içerisinde 60 adet koyun benzer vücut ağırlığı (45 kg) ortalamasına sahip 3 eşit gruba ayrıldı. Koyunların östrüs siklusunun senkronizasyonu, 10 gün ara ile iki defa 250 µg/koyun dozunda Prostaglandin F_{2α}'nın (Estrumate,[®] Intervet/Schering-Plough) kas içi enjekte edilmesi ile gerçekleştirildi.

Kisspeptin uygulaması: Grup 1 (n=20): İkinci PGF_{2α} enjeksiyonu sonrası 40. saatte Kp-10 (1µg/kg) damar içi verildi.

Grup 2 (n=20): İkinci PGF_{2α} enjeksiyonu sonrası iki kez; 40 ve 50. saatte Kp-10 (1µg/kg) damar içi verildi.

Grup 3 (n=20): Kontrol grubunu oluşturdu. İkinci PGF_{2α} enjeksiyonu sonrası serum fizyolojik (2 ml) 40 ve 50. saatte damar içi verildi.

Kan örnekleri; antikoagulan (EDTA) içeren vakumlu tüplere toplanarak 3000 devir/dakikada 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen plazmalar 2 ml'lik saklama tüplerine aktararak -24 °C'de ölçüm gününe kadar muhafaza edildi.

Koyunlar ikinci PGF_{2α} enjeksiyonu sonrası 42-43. saatler içerisinde 16 baş koç ile elde sıfat yöntemi ile tek sefer çiftleştirildi. Koyunların gebelik kontrolleri, aşım

sonrası 30. günde ultrasonografi yardımıyla transrektal yolla belirlendi.

Hormon düzeyinin belirlenmesi: Plazma LH düzeylerinin belirlenmesi için; ikinci PGF_{2α} enjeksiyonunu takip eden 24, 28, 32, 39, 40,5, 41, 44, 49, 50,5, 51, 55, 60, 64 saatlerde alınan kan örnekleri kullanıldı. Plazma LH düzeyinin belirlenmesinde; koyuna spesifik ELISA LH kiti [LH Detect[®], ReproPharm/INRA, Fransa Kat.No. 221] kullanıldı. Plazma P₄ düzeyi, her iki PGF_{2α} enjeksiyonu öncesinde ve ikinci PGF_{2α} enjeksiyonu takip eden 24, 48, 72. saatler ile 18 ve 21. günde alınan kan örneklerinde ölçüldü. Plazma P₄ düzeyinin belirlenmesi için beşeri P₄ radioimmunoassay kiti [Immunotech[®], Beckman Coulter, Fransa Kat.No: IM1188] kullanıldı. Plazma E₂ düzeyi; ikinci PGF_{2α} enjeksiyonu takip eden 24, 48, 72. saatlerde alınan kan örneklerinde belirlendi. Plazma E₂ düzeyinin belirlenmesinde beşeri E₂ radioimmunoassay kiti [Immunotech[®], Beckman Coulter, Fransa Kat.No: A21854] kullanıldı.

İstatistiksel hesaplamalar: İstatistik analizlerde ANOVA testi kullanıldı. Grup içi farkın önemini belirlemede Tukey, gruplar arası farkın önemini belirlemede Duncan testinden faydalandı. Bazal LH düzeyinde % 10' luk bir artış preovulatr dalganın başlangıç (PO_LH-İlk) ve bitişinin (PO_LH-Son) belirlenmesindeki hedef değer olarak kullanıldı (12). Gruplar arasındaki dolaşımda belirtilen saate kadar salınan LH (LH AUC) düzeyinin tespiti WinNonlin[®] programı yardımı ile logaritmik linear trapezoidal kurala göre bilgisayar ortamında gerçekleştirildi.

Bulgular

Grupların LH düzeyleri: Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 50,5 (p=0,005) ve 51. saat (p=0,014) LH düzeyleri arasında istatistiksel önem bulundu (Tablo 1). Tüm gruplarda bazal LH düzeyi 0.54±0.06 ng/ml olarak belirlendi. Grup 1'de 1, Grup 2'de 2 ve Grup 3'de 4 koyunda 64. saate kadar LH artışı tespit edilemedi. Çiftleşme saatinde östrusta olmayan koyunlardan Grup 1'de 2, Grup 2'de 1 ve Grup 3'de 3 koyunda LH artışı 55. saat ve sonrasında gerçekleştiği belirlendi.

Grupların LH AUC (Area Under Curve, toplam salınan LH düzeyi) düzeyleri: Gruplar arasında 24, 28 ve 32. saat LH AUC düzeyleri belirlenemedi. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 LH AUC düzeyleri arasında 55. saatte (p=0,042) istatistiksel önem bulundu (Tablo 1).

Grupların preovulatr LH profili: Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün, preovulatr LH artışının bitiş zamanı (PO_LH-Son), preovulatr LH dalga süresi (PO_LH-Süre) ve preovulatr LH pik düzeyi (PO_LH-Pik-ng) bulgularında gruplar arasında istatistiksel önem bulundu (Tablo 2). Grup 1 ve 2'de Kp-10 uygulama saati öncesinde LH piki ve dalgası gerçekleşmiş koyunlarda, uygulama sonrasında belirgin bir LH artışı tespit edilemedi. Gruplar arasında 41 - 51. saatte Grup 1'de 12, Grup 2'de 16 ve Grup 3'de 8 koyunda LH piki tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 1. LH ve LH AUC (Area Under Curve) düzeyleri.
Table 1. LH and LH AUC (Area Under Curve) levels.

saat h	Grupların ikinci PGF _{2α} enjeksiyonunu takip eden saatlerde (h) LH düzeyleri (ng/ml) LH levels (ng/ml) in the Groups after time (h) of second PGF _{2α} treatment				Grupların ikinci PGF _{2α} enjeksiyonunu takip eden saatlerde (h) toplam salınan LH (LH AUC) düzeyleri (ng/ml). Total release of LH (LH AUC) levels (ng/ml) in the Groups after time (h) of second PGF _{2α} treatment.			
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p
39	2,98±7,67 (0,48-32,4)	1,99±5,90 (0,48-26,3)	3,11±8,17 (0,6-34,8)	0,874	13,13±33,76 (0-112)	4,79±20,88 (0-91)	9,03±28,37 (0-119)	0,657
40,5	3,95±8,69 (0,6-39,1)	2,90±6,23 (0,6-28)	2,63±5,17 (0,48-19,6)	0,820	16,44±40,80 (0,5-148)	7,45±26,81 (0,5-118)	12,18±33,86 (1-141)	0,719
49	7,88±11,01 (0,48-40,1)	9,27±11,55 (0,6-59)	6,21±14,82 (0,6-61,8)	0,754	73,34±78,61 (0-285)	90,43±104,51 (1-435)	58,79±82,17 (1-267)	0,551
50,5	9,15±11,44 ^{ab} (0,48-34,6)	22,06±28,90 ^a (0,6-84,2)	2,27±3,12 ^b (0,48-11,7)	0,005**	81,30±80,72 (1-286)	109,21±111,31 (0-444)	62,34±87,38 (0,5-280)	0,309
51	9,37±10,72 ^{ab} (0,6-31,2)	14,05±16,26 ^a (0,48-51,6)	2,80±3,93 ^b (0,6-13,8)	0,014*	90,03±81,59 (1-286)	125,99±118,10 (1-449)	64,24±88,54 (0-284)	0,154
55	8,85±13,09 (0,48-42,3)	7,96±10,02 (0,6-36,8)	7,72±10,42 (0,48-35)	0,823	126,58±79,96 ^{ab} (1-286)	168,05±132,91 ^a (1-469)	83,05±82,89 ^b (1-288)	0,042*
64	1,60±4,45 (0,48-20,5)	0,66±0,21 (0,48-1,5)	0,93±1,13 (0,6-5,5)	0,534	164,68±87,23 (1-330)	200,94±141,65 (1-497)	115,71±91,49 (1-288)	0,063

(Mean±Std Dev) * (p<0,05) ** (p<0,01)

Tablo 2. LH profili: Preovulatr LH artışı başlangıç saati (PO_LH-İlk), Preovulatr LH pik saati (PO_LH-Pik), Preovulatr LH artışının bitiş saati (PO_LH-Son), Preovulatr LH dalga uzunluğu (PO_LH-Süre) (saat), Preovulatr LH pik düzeyi (ng/ml) (PO_LH-Pik-ng).

Table 2. LH profiles: Onset of preovulatory LH surge (PO_LH-İlk), Timinig of preovulatory LH peak surge (PO_LH-Pik), Ending of preovulatory LH surge (PO_LH-Son), Length of preovulatory surge (PO_LH-Süre) (hour), Levels of peak (ng/ml) (PO_LH-Pik-ng).

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p
PO_LH-İlk	39,48±6,80	41,08±4,69	37,87±8,56	0,361
PO_LH-Pik	48,28±7,25	48,74±4,55	47,70±8,94	0,912
PO_LH-Son	57,75±7,55 ^{ab}	59,11±5,23 ^a	50,21±14,80 ^b	0,017**
PO_LH-Süre	18,63±7,21 ^a	18,03±5,00 ^a	12,55±6,93 ^b	0,009**
PO_LH-Pik-ng	24,68±11,69 ^{ab}	38,45±27,51 ^a	21,11±17,97 ^b	0,030*

(Mean±Std Dev) * (p<0,05) ** (p<0,01)

Tablo 3. Saat aralığı (h) ve tespit edilen LH pik sayısı.

Table 3. Time frame (h) and detected number of LH peak.

(h)	Grup 1	Grup 2	Grup 3
24-39	3	1	2
41-51	12(%60)	16 (%80)	8 (%40)
50,5-51	2	9	0
55-64	4	1	6
24-64	19(%95)	18 (%90)	16 (%80)

Grupların P₄ ve E₂ düzeyleri: Çalışmada; Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 24, 48 ve 72. saatler ile 18 ve 21. gün P₄ düzeyleri arasında herhangi bir istatistiki önem belirlenmemiştir (Tablo 4). Tüm gruplarda 2. PGF_{2α} uygulaması sonrasındaki 24. saatte P₄ düzeyinin düştüğü, 48. saatte bazal düzeye indiği, 72. saatte ise tekrar yükselişe geçtiği belirlendi. Tüm gruplarda gebe kalan koyunların 18 ve 21. gün P₄ düzeyi 3 ng/ml'nin üzerinde tespit edildi. Gebe olmayan koyunların P₄ düzeyi ortalaması ise

18. günde 2,2 ng/ml iken 21. günde 0,9 ng/ml olarak bulundu. Çalışmada; Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 24, 48 ve 72. saat E₂ düzeyleri arasında istatistiki önem belirlenmemiştir. Östradiol düzeyinin tüm gruplarda 48. saate kadar yükseldiği, 48. saatten sonra da azaldığı belirlendi (Tablo 4).

Grupların reproduktif parametreleri: Gruplarda östrus, gebe kalma, kuzulama, fecondasyon, proliferasyon oranları ile gebelik süreleri arasında herhangi bir

Tablo 4. Birinci (-10g P₄) ve ikinci (0g P₄) PGF_{2α} uygulama günü, ikinci PGF_{2α} uygulama sonrası 24, 48 ve 72. saat, 18 ve 21. günlerde P₄ (ng/ml) ile İkinci PGF_{2α} uygulama sonrası 24, 48 ve 72. saat E₂ (pg/ml) düzeyleri.

Table 4. P₄ (ng/ml) levels of first (-10g P₄) and second (0g P₄) PGF_{2α}, 24, 48, 72 hours (s), 18, 21 days (g) after second PGF₂ treatment and E₂ (pg/ml) levels of 24, 48, 72 hours after second PGF₂ treatment.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p
-10gP ₄	2,03±1,39 (0,3-5,4)	1,65±1,49 (0,1-5,8)	1,87±1,99 (0,1-8,9)	0,475
0g P ₄	2,64±1,21 (0,8-5,3)	2,77±0,86 (1,1-6,7)	2,61±1,33 (0,3-6,9)	0,416
24s P ₄	0,44±0,19 (0,1-0,8)	0,46±0,22 (0,1-1)	0,42±0,24 (0,21-2,6)	0,597
48s P ₄	0,36±0,19 (0,2-1)	0,32±0,16 (0,1-0,7)	0,39±0,25 (0,1-3,1)	0,325
72s P ₄	0,60±0,29 (0,2-1,19)	0,64±0,37 (0,1-1,63)	0,70±0,71 (0,1-3,4)	0,823
18g P ₄	3,39±1,93 (0,2-6,4)	3,89±2,31 (0,7-8,8)	3,45±2,76 (0,21-10,6)	0,590
21g P ₄	2,87±2,40 (0,2-7,3)	3,55±3,59 (0,2-9,8)	3,26±4,10 (0,2-14,6)	0,606
24s E ₂	23,16±10,20 (13,4-57,2)	29,14±9,77 (16,4-58)	30,50±13,11 (14,4-58)	0,094
48s E ₂	47,64±14,05 (14,4-69)	49,15±18,37 (19,8-87)	45,44±16,44 (18-79,4)	0,472
72s E ₂	36,81±14,83 (19,8-66)	38,04±12,64 (21,2-62,2)	39,33±17,52 (17-76,1)	0,870

Tablo 5. Östrus, gebe kalma, kuzulama, fekondasyon ve proliferasyon oranları.

Table 5. Oestrus, pregnancy, parturition, fecundity and prolificacy rates.

Reproduktif Parametreler	Grup1 (n=20)	Grup2 (n=20)	Grup3 (n=20)
Östrus oranı (%)	85(17/20)	80(16/20)	80(16/20)
Gebe kalma oranı (%)	52.94(9/17)	50(8/16)	50(8/16)
Kuzulama oranı(%)	100(9/9)	100(8/8)	100(8/8)
Fekondasyon oranı	0.65(11/17)	0.69(11/16)	0.63(10/16)
Prolifikasyon oranı	1.22(11/9)	1.38(11/8)	1.25(10/8)

istatistiki önem belirlenmemiştir (Tablo 5). Koç altında durmayan Grup 1'de 3, Grup 2'de 4 ve Grup 3'de 4 koyunun östrüste olmadıkları anlaşıldı. Gebe kalan koyunlardan Grup 1'de 2, Grup 2'de 3 ve Grup 3'de 2 koyun ikiz kuzuladı, diğer koyunlar ise tek kuzuladı ve gruplar arasında istatistiki bir önem bulunmadı.

Tartışma ve Sonuç

Kisspeptin 10'nun GnRH nöronlarında bulunan Kp reseptörlerine bağlanarak LH salınımına yol açtığı pek çok türde belirlenmiştir. Sunulan çalışmada kullanılan Kp-10, insana özgü bir decapeptid yapısına sahip olmasına rağmen koyun başta olmak üzere pek çok hayvan türünde LH salınımına yol açtığı bildirilmiştir. İntravenöz yolla, koyunda 0.54-0.65 µg/kg, keçide 1µg/kg ve düvede 4.76 µg/kg dozunda uygulanan insan Kp-10, LH artışına yol açmıştır (11). Farklı memeli türlerinde Kp nöronlarının merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerine lokalize olmaları nedeniyle hipotalamus başta olmak üzere Kp reseptörü dağılımlarında bölgesel farklılıklar

bulunmaktadır (5, 16, 18). Bu nedenle, türler arasında LH artışı için gerekli Kp dozu değişebilmektedir (11). Sunulan araştırma ile benzer şekilde senkronize edilen ve uygulama sonu 40. saatte, benzer dozda (50 µg/koyun) Kp uygulaması yapılan bir çalışmada (18), uygulamayı takip eden 30 dk'da LH düzeyi 1ng/ml'nin üzerinde, 60 dk'da 1ng/ml'nin altında, 180. dk'da ise bazal düzeyde bulunmuştur. Bu çalışmada ise hem Kp-10 uygulanan gruplarda hem de kontrol grubunda 39, 40 ve 40,5 saatte tespit edilen LH düzeyi belirtilen çalışmaya göre daha yüksek bulunmuştur. Bu yüksekliğin ana sebebi preovulatör LH dalga artışının Pırlak ırkı koyunda daha erken başlaması olabilir. Kp uygulamasının preovulatör LH dalga başlangıcına yakın bir zamanda daha etkili olduğu bulgusuna (18) ulaşılmış olmasına rağmen preovulatör LH pikine yakın bir saatte uygulanan Kp-10'un etkisini araştırılan çalışma bulunmamaktadır. Sunulan çalışmada Grup 2'de, preovulatör LH pikine yakın bir saatte uygulanan Kp-10'nun, 50,5. saatte LH'ın ani bir pik yapmasına veya 49. saatte yüksek olan LH düzeyinin daha da

artmasına yol açtığı belirlendi. Bu uygulama ile Grup 2'de 50,5. saatte tespit edilen LH düzeyi Grup 3'e göre 10 kat daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bulunan bu sonucun, pik zamanına yakın bir saatte gonadotropoların GnRH'a olan duyarlılığın en üst düzeyde olmasına veya farklı bir mekanizma ile Kp'nin hipofizden direkt olarak LH salımına yol açmasına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Caraty ve ark. (3), progesteron ile senkronize edilen koyunlarda, senkronizasyon bitimini takip eden 30. saatte, intra-venöz yolla 8 saat (0.48 µmol/saat) süreli 3.84 µmol Kp uygulamasının, 32. saatte LH düzeyinde artışa yol açtığı ve 40. saate kadar koyunların tamamında LH pikinin gerçekleştiğini, kontrol grubunda ise LH pikinin daha geç (44-60 saat) başladığını ve 64. saate kadar tespit edilen LH pik oranını % 55,5 olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise gruplar arasında 64. saate kadar tespit edilen LH pik oranı, Grup 1'de % 95, Grup 2'de % 90 ve Grup 3'te % 80 olarak belirlendi. Grup 3'te tespit edilen bu oranın Caraty ve ark. (3)'ün kontrol grubuna göre daha yüksek olmasının nedeni, başta ırk ve senkronizasyon farklılığına bağlı olarak Grup 3'ün preovulatör LH pikinin 64. saate kadar büyük oranda tamamlanması olabilir. Grup 2'de 41-51. saatler arasında belirlenen LH pik oranının diğer gruplara göre daha yüksek olması, preovulatör LH dalga artışı ve bu artışı takip eden 10. saatte uygulanan Kp-10'un, LH pik dağılımını 10 saatlik bir zaman dilimi içerisinde senkronize ettiğini göstermektedir. Bu bulgu Caraty ve ark. (3)'ün yaptıkları çalışma ile kısmi uyum gösterse de, araştırmacıların aralıksız ve daha yüksek dozda Kp-10 uygulaması, çalışmamıza göre çok daha kısa sürede LH pikine yol açmıştır.

Sunulan çalışmada Grup 1 ve 2'ye uygulanan Kp-10, gruplarda hem LH dalga süresinde uzamaya, hem de LH pik düzeyinde artışa yol açarak salınan toplam LH miktarını arttırmış ve bu nedenle kontrol grubuna kıyasla LH AUC değerinde artışa yol açmıştır. Preovulatör LH pik saatine yakın uygulanan Kp-10, hipotalamustaki GnRH nöronlarını tetiklemiş, GnRH'ın gonadotropolar üzerindeki uyarıcı gücünü arttırmış ve zaten bu dönemde yüksek olan GnRH ile birlikte gonadotrop hücrelerini etkileyerek LH pik düzeyini arttırmış olabilir. Hipofizin uyarılma derecesi ve süresi, depo tarzında salınan LH miktarı, LH'nin pik düzeyine çıkış ve bazal düzeye inme hızı, LH dalga süresini etkileyebilmektedir (4, 10). Grup 1 ve 2'de LH dalga süresinin Grup 3'e göre daha uzun olması, 40. saatte uygulanan Kp-10'un, GnRH hücrelerini etkilemesine veya bazal LH düzeyini yükseltmesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Hipofizin GnRH'a cevap verme yeteneğinin, preovulatör LH dalgasının başladığı saatlerde daha çok arttığı belirtilmiştir (4, 10, 18). Östrus başlangıcından ve preovulatör LH pikinden önce uygulanan GnRH'ın preovulatör LH artışını destekleyebileceği ancak uygulanan GnRH'ın, LH piki kendiliğinden gerçekleşmiş ise LH artışı için önemli bir etkisinin olmayacağı vurgulanmıştır (8, 15). Bunun nedeni olarak; preovulatör LH salınımının-

daki artış ile birlikte dalga süresince gonadotropolarla pulsatil LH salınımı ve LH miktarını etkileyen sekretuar granül sayısı, depolanan LH düzeyi ve GnRH reseptör sayısının azalması kabul edilmektedir (3, 4, 10). Sunulan çalışmada Grup 1 ve 2'de, Kp-10 uygulama saati öncesinde LH piki ve dalgası gerçekleşmiş koyunlarda, uygulama sonrasında belirgin bir LH artışının tespit edilememesinin nedeni olarak depolanan LH'nin azalması ileri sürülebilir.

Sunulan çalışmada tespit edilen LH profili, bazı çalışmalar (6, 12, 17, 20) ile farklılık göstermektedir. Bunun ana nedeni olarak senkronizasyon yönteminin; follikül gelişimini, GnRH/LH salınımını ve E₂ düzeyinin yükseliş süresini etkilemesi olabilir. Preovulatör dönemde P₄ düzeyi düşüş hızının, hipofiz hücrelerinde GnRH'a olan duyarlılığı değiştirerek LH profilini etkilemesi (4, 10, 12) yapılan çalışmalar arasında elde edilen farklı LH dalga başlangıç ve pik saati bulgularının nedeni olabilir. Bununla beraber folliküler dönemde hipotalamus ve hipofizin, dolaşımdaki E₂ düzeyine cevap verme yeteneği ve uyarılma süresinin ırka bağlı olarak değiştiğinin tespit edilmesi (1), sunulan çalışma ile diğer çalışmalarda kullanılan ırkların farklı olması, LH dalga başlangıç saati başta olmak üzere preovulatör LH profilinde farklı bulguların elde edilmesinin nedeni olarak düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda ırk, senkronizasyon yöntemi, PGF_{2α} analogu ve dozu, yaş gibi faktörlerin östrus, gebelik, proliferasyon, fekondasyon ve kuzulama oranlarını etkilediği belirtilmektedir (6, 9, 12, 13, 19). Gruplarda tespit edilen östrus oranları, bazı araştırmacıların elde ettikleri oranlar ile farklılık (19) veya benzerlik (9) göstermektedir. Bu farklılığın ana nedeni olarak gruplardaki koyunların sadece 42-43. saatler içerisinde çiftleştirilmesi ve östrus oranının sadece bu saatte tespit edilmesi olabilir. Östrus takip uzunluğu arttıkça östrusa gelen koyun sayısındaki artışa ve koç etkisine bağlı olarak östrus oranının artması bazı çalışmalarda (19) tespit edilen yüksek östrus oranının sebebi olabilir. Çalışmada kullanılan yüksek doz PGF_{2α}'nın, hızlı luteal regrasyona yol açarak çiftleşme saatinde östrus oranını yükselttiği ve bu nedenle daha uzun östrus takibi gerçekleştiren araştırma (9) ile benzer östrus oranı bulgusuna sahip olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada koyunlar sadece bir kez çiftleştirilerek koçlar en kısa sürede uzaklaştırılmıştır. Gebelik, fekondasyon ve proliferasyon oranları yüksek olan çalışmalarda ise (9, 19) östrus boyunca koyunların çiftleşmesi veya belli aralıklarla iki kez suni tohumlama yapılmasının reproduktif parametreleri yükselttiği düşünülmektedir. Uygun saat ve sayıda uygulanmayan GnRH, LH salınım sıklığını, GnRH reseptör sayısını ve hipofiz hücrelerinin GnRH'a olan duyarlılığını değiştirdiği belirtilmektedir (8, 15). Bu nedenle çalışmalarda GnRH'ın gebe kalma oranını artırması (7), azaltması (15) veya değiştirmemesi (14, 19) uygulanan GnRH'ın preovulatör LH dalgasının başlangıcına, ortasına ve bitiş dönemlerine denk gelmesinden kaynaklanabilir. Ovulasyon ve CL'un formasyonu

için LH pik düzeyinin yüksek veya düşük olmasından ziyade, preovulatr LH dalga uzunluğunun önemli olduğu belirtilmektedir (1, 8, 10, 15). Sunulan araştırmada, Kp uygulanan gruplarda preovulatr LH dalga süresinin kontrol grubuna göre 6 saat kadar daha uzun olmasına rağmen reproduktif parametreler arasında herhangi bir istatiki fark belirlenmemiştir. Grup 3'te ovulasyon için yeterli uzunlukta (12 saat) LH artışının oluşması, benzer reproduktif parametrelerin nedeni olabilir. Caraty ve ark. (3), Kp-10 uygulamasını takip eden 5. gününde, Kp-10 grubu ile kontrol grupları arasında benzer sayıda korpus luteumu tespit etmesi, senkronizasyon sonu uygulanan Kp-10'nun, ovulasyon oranı veya ikizlik oranı üzerinde çarpıcı bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Sunulan bu araştırmada da hem gruplar arasında LH dalga artışı ve pikinin benzer saatte gerçekleşmesi hem de tüm gruplarda 48. saatte belirlenen bazal P₄ düzeyinin 72. saatte yükselişe geçmesi, gruplar arasında ovulasyon özelliklerinin benzer olduğunu göstermektedir. Bu nedenle araştırmada kullanılan koyunlarda ovulasyon ertelenmesi gibi fertilitiyi olumsuz etkileyen durumlar ile karşılaşmadığı ya da kontrol grubunda ovulasyon gecikmesi olsa bile spermanın fertilizasyon saati içerisinde canlılığını koruması, gruplar arasında benzer fertilitite parametrelerine yol açmış olabilir.

Sonuç olarak; ikinci PGF₂ α enjeksiyonunu takip eden 40 ve 50. saatlerde uygulanan Kp-10'nun, GnRH nöronlarını tetiklediği ve zaten bu dönemde yüksek olan GnRH ile birlikte gonadotrop hücrelerini etkileyerek LH salınımına yol açtığı düşünülmektedir. Çalışmada Kp'nin uygulama dozu ve yönteminin; LH pik ng/ml düzeyini yükselttiği, salınan LH miktarını arttırdığı ve LH pik saatini belirli bir zaman içerisine topladığı belirlendi. Araştırmada Kp'nin reproduktif parametreler üzerinde bir etkisi tespit edilemedi. Ovulasyon ertelenmesi, gecikmesi veya ovulasyon saati oldukça dağınık olan sürülerde Kp-10'un ovulasyonları senkronize ederek, özellikle sabit zamanlı suni tohumlama çalışmalarında reproduktif parametreleri yükseltebileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. **Ben Said S, Lomet D, Chesneau D, et al.** (2007): *Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep.* Biol Reprod, **76**, 673-680.
2. **Caraty A, Franceschini I** (2008): *Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: Potential applications for better control of fertility in females.* Reprod Domest Anim, **43**, 172-178.
3. **Caraty A, Smith JT, Lomet D, et al.** (2007): *Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes.* Endocrinology, **148**, 5258-5267.
4. **Christian CA, Moenter SM** (2010): *The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges.* Endocr Rev, **31**, 544-77.
5. **Clarke IJ** (2011): *Control of GnRH secretion: One step back.* Front Neuroendocrinol, **32**, 367-375.
6. **Contreras-Solis I, Vasquez B, Diaz T, et al.** (2009): *Ovarian and endocrine responses in tropical sheep treated*

with reduced doses of cloprostenol. Anim Reprod Sci, **114**, 384-92.

7. **De Rensis F, Valentini R, Gorrieri F, et al.** (2008): *Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season.* Theriogenology, **69**, 1077-1082.
8. **Fields SD, Perry BL, Perry GA** (2009): *Effects of GnRH treatment on initiation of pulses of LH, LH release, and subsequent concentrations of progesterone.* Domest Anim Endocrinol, **37**, 189-195.
9. **Gonzalez-Bulnes A, Veiga-Lopez A, Garcia P, et al.** (2005): *Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep.* Theriogenology, **63**, 2523-2534.
10. **Goodman R, Inskoop EK** (2006): *Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep.* pp. 2389-2447. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, USA.
11. **Hashizume T, Saito H, Sawada T, et al.** (2010): *Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats.* Anim Reprod Sci, **118**, 37-41.
12. **Letelier CA, Contreras-Solis I, Garcia-Fernández RA, et al.** (2011): *Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep.* Anim Reprod Sci, **126**, 61-69.
13. **Olivera-muzante J, Gil J, Fierro S, et al.** (2011): *Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep.* Theriogenology, **76**, 1501-1507.
14. **Paksoy Z, Kalkan C** (2010): *The effects of GnRH and hCG used during and after artificial insemination on blood serum progesterone levels and pregnancy rate in cows.* Kafkas Univ Vet Fak Derg, **16**, 371-375.
15. **Perry GA, Perry BI** (2009): *GnRH treatment at artificial insemination in beef cattle fails to increase plasma progesterone concentrations or pregnancy rates.* Theriogenology, **71**, 775-779.
16. **Roa J, Tena-Sempere M** (2007): *KISS-1 system and reproduction: Comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals.* Gen Comp Endocrinol, **153**, 132-40.
17. **Salem IB, Rekik M, Gonzalez-Bulnes A, et al.** (2010): *Differences in preovulatory follicle dynamics and timing of preovulatory LH surge affect fertility of maiden sheep reared in semi-arid extensive conditions.* Anim Reprod Sci, **117**, 60-66.
18. **Smith JT, Li Q, Yap KS, et al.** (2011): *Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence.* Endocrinology, **152**, 1001-1012.
19. **Türk G, Gür S, Sönmez M, et al.** (2008): *Effect of exogenous GnRH at the time of artificial insemination on reproductive performance of awassi ewes synchronized with progestagen-PMSG-PGF₂ alpha combination.* Reprod Domest Anim, **43**, 308-313.
20. **Yıldız S, Saatci M, Uzun, M, et al.** (2003): *Effects of ram introduction after the second prostaglandin f₂ alpha injection on day 11 on the LH surge characteristics in fat-tailed ewes.* Reprod Domest Anim, **38**, 54-57.

Geliş tarihi: 06.04.2015 /Kabul tarihi: 10.11.2015

Yazışma Adresi:

Muhammed Kürşad Birdane
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı
03200, Afyonkarahisar, Türkiye.
e-mail: mkbirdane@aku.edu.tr