

Koyunlarda Farklı Zamanlarda Uygulanan Gonadotropin Salgılayıcı Hormon'un (GnRH) Döl Verimine Etkisi Üzerinde Bir Araştırma*

M. Kemal SOYLU**
Fazıl DELİGÖZOĞLU*****

Hazım GÖKÇEN***
İbrahim DOĞAN*****

Hüseyin TÜMEN****
Binnur BİLGİN*****

ÖZET

Bu araştırmada koyunlarda GnRH'nin (Gonadotropin salgılayıcı hormon) döl verimine etkisi incelendi. 30 koyuna 12 gün ara ile 7.5 mg Luprostiol (PGF_{2α}) enjekte edildi. Koyunların hepsi östrus gösterdi ve tohumlandı. Tohumlama sırasında 3 gruba ayrılan koyunlara, tohumlamadan 6 saat önce (Gr: 1), tohumlama sırasında (Gr: 2) ve tohumlamadan 6 saat sonra (Gr: 3) 25 mcg Gonadorelin (GnRH) enjekte edildi. Koyunların tohumlanmasında 0.25 cm³'te 200x10⁶ motil spermatozoon bulunacak biçimde Glikoz-Fosfat sulandırıcısı ile sulandırılan taze sperma kullanıldı. 40 gün içinde geri dönmeyenler belirlendi ve gebelik oranı 3 grupta sırasıyla % 80, 30, 70 olarak bulundu.

-
- * Bu araştırma Koyunculuk Araş. Ens. tarafından desteklenmiştir.
** Doç. Dr.; U.Ü. Vet. F. Repro. ve Sun'i Toh. B.D. Bursa-Türkiye.
*** Prof. Dr.; U.Ü. Vet. F. Repro. ve Sun'i Toh. B.D. Bursa-Türkiye.
**** Yard. Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Repro. ve Sun'i Toh. B.D. Bursa-Türkiye.
***** Dr. Vet. Hek.; Bandırma Koyunculuk Araş. Enst. Balıkesir-Türkiye.
***** Arş. Gör.; U.Ü. Vet. F. Repro. ve Sun'i Toh. B.D. Bursa-Türkiye.

SUMMARY

An Investigation on the Effect of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), Applied Different Times, on the Fertility of Ewes

In this investigation, the effects of GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) on the fertility of ewes were studied. Thirty ewes were treated with 7.5 mg Luprostiol (PGF_{2α}) twice at twelve days intervals. All ewes showed oestrus and divided into three groups. The first, the second and the third groups were treated with 25 mcg Gonadorelin, 6 hours before (Gr: 1), during (Gr: 2) and six hours after (Gr: 3) the inseminations respectively.

Fresh semen, diluted with Glucose-Phosphate diluent (200x10⁶ motile spermatozoa/0.25 cm³), was used for inseminations. Ewes were inseminated cervically. Ewes not shown oestrus signs fourty days after inseminations were recorded and the conception rates were found as % 80, 30 and 70 for three groups respectively.

Key words: GnRH, fertility, ewes, synchronization.

GİRİŞ

Gonadotropin Salgılayıcı Hormon (GnRH) ve analogları, hipofizden FSH ve LH salgılanmasını artırır¹. Üreme mevsimindeki koyunlara 5, 10, 20 ve 50 mcg. LHRH analogu uygulanmış ve 10 mcg. verilenlerde plazma LH yoğunluğunun 0.70 ng/ml. den 84.36 ng/ml. ye yükseldiği daha yüksek dozların da farklı sonuçlara yol açmadığı, bunun yanı sıra 50 mcg. LHRH verilenlerde, daha düşük dozların uygulandığı koyunlara kıyasla FSH miktarının önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır². Anöstrusta bulunan koyunlarda GnRH uyulamalarının ovulasyonu uyurabileceği bildirilmektedir³. Ancak kimi yazarlar GnRH'nın, yüksek dozda bir kez uygulanması halinde folliküler gelişmeyi sağlamayacağını, sadece mature folliküllerde ovulasyon yapabileceğini, buna karşın GnRH'nın düşük dozlarının, bir saat ara ile ve birkaç gün süreyle uygulanması halinde hem folliküler gelişme hem de ovulasyon sağlanabileceğini, fakat bu yöntemin de pratik olmadığı için henüz kullanılmadığını öne sürmektedir⁴.

Walker ve ark.⁵, progestagen içeren vaginal sünger kullanılarak kızgınlıkları sinkronize edilen koyunlarda, ovulasyon zamanını sinkronize etmek amacıyla sünger çıkarıldıktan sonra 24 ve 36. saatlerde 25 mcg. GnRH uygulamasının önerilemeyeceğini bildirmişlerdir. Oysa Jabbour ve Evans⁶ tarafından yapılan bir araştırmada 48 Merinos koyunu üreme mevsiminde vaginal sünger + 1200 IU PMSG verilerek sinkronize edilmiş ve koyunların bir kısmına sünger alındıktan 12 saat sonra bir kısmına da 24 saat sonra 100 mcg. GnRH damar içi yolla enjekte edilmiştir. On iki saat sonra GnRH verilen koyunlarda sünger alındıktan

sonra ovulasyon oluşuncaya kadar geçen süre ile ovulasyon yapmamış büyük follikül sayısında azalma gözlenmiştir.

Erokhin ve Deryazhentsev⁷, dondurulmuş sperma ile tohumladıkları koyunlara, tohumlamadan hemen önce 1, 2 veya 3 mcg. GnRH uygulamışlar ve üç grupta sırasıyla % 56, 45 ve 33, kontrol grubunda ise % 48 doğum oranı elde etmişlerdir. Bunun yanı sıra 1 mcg. GnRH verilip iki kez tohumlanan koyunlarda ise kuzulama oranı % 60 bulunmuştur. Kostow ve ark.⁸, üreme mevsiminde vaginal sünger + PMSG + PGF_{2α} kombinasyonu ile sinkronize ettikleri koyunlara tohumlamadan 60-100 dakika önce 0.100 mg. GnRH uygulamışlar ve bu şekilde % 85 gebelik oranı saptamışlardır.

Yutaka ve ark.⁹, anöstrus dönemindeki koyunlara dokuz gün süreyle, 60 mg. MAP içeren vaginal sünger uygulamışlar, sünger geri alındığında da 750 IU PMSG enjekte etmişlerdir. Koyunlar östrus gösterdiğinde bir kısmına serum fizyolojik, bir kısmına da 150 mcg. GnRH verilerek dokuz saat sonra taze sperma ile tohumlanmıştır. İki grupta sırasıyla % 27.8 ve 57.9 gebelik oranı sağlanmıştır. Progestagen (9-12 gün) + PMSG kombinasyonunu değişik şekillerde kullanarak kızgınlıklarını sinkronize ettikleri koyunlara, östrusun görülmesinden sonra 100 mcg. GnRH enjekte edip 6-9 saat sonra tohumlayan Yutaka ve ark.¹⁰ % 57.1-84.6, Kobayashi ve ark.¹¹ % 60.0-87.5, tohumlamaları değişik yaşlardaki koçlarla, koç katımı ile gerçekleştiren Yutaka ve ark.¹² % 53.8-58.3 arasında doğum oranı elde ettiklerini bildirmekteyler. GnRH enjeksiyonlarının vaginal sünger uzaklaştırıldıktan 24 ve 36 saat sonra yapıldığı bir araştırmada¹³, östrus ve kuzulama oranı düşük bulunmuş (% 69.4 ve 27.1) ve bu durumun çiftleşme yöntemi ve koyunların zayıf kondisyonda olmalarından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Diğer taraftan Walker ve ark.¹⁴ 60 mg. MAP + 400 IU PMSG uyguladıkları koyunlara sünger alındıktan 24 veya 36 saat sonra 100 mcg. GnRH enjekte ederek tohumlamışlar ve % 37.1 ile 65.9 gebelik oranı elde etmişlerdir. Kontrol grubunda ise bu oran % 61.9 olarak bulunmuştur. Yazarların bildirdiğine göre, sünger alındıktan 24 ve 36 saat sonra verilen 100 mcg. GnRH ovulasyon zamanını sinkronize edebilir. Özellikle 36 saat sonra verildiğinde kalitesi normal embriyo sayısı artar. Bununla birlikte, tohumlamalarda donmuş sperma kullanıldığında dölverimi önemli derecede yükselmez. Forcada Miranda ve ark.¹⁵, tohumlama sırasında uygulanan 10 ve 100 mcg. GnRH'nın fertilitiyi etkilemediğini, deneme sonuçlarının yeterince açık olmadığını ve daha ayrıntılı araştırmaların yapılmasının gerekli olduğunu savunmaktadırlar.

Yapılan bir araştırmada, koyunlara 60 mg. MAP + 1500 IU PMSG verilmiş, koyunların bir bölümüne ayrıca 120 mcg. GnRH uygulanmıştır. Koyunlara laparotomi yapılarak iki grupta sırası ile % 3.5 ve 3.8 düzeyinde korpus luteum olduğu saptanmıştır. Ancak GnRH verilenlerde ovulasyon yapmamış follikül sayısı daha az (% 0.6 ve 2.8) bulunmuştur¹⁶.

Bazı araştışıcılar, kızgınlıkları sinkronize edilen koyunlarda GnRH'nın tek enjeksiyonu yerine uzun süreli uygulamaların etkisini incelemişlerdir. Hamra ve ark.¹⁷, 14 gün Cronolone sünger uyguladıkları 16 koyunu iki gruba ayırıp, birinci grupta bulunanlara 750 IU PMSG, ikinci gruptakilere bir saat ara ile 0.25 mcg. GnRH enjekte etmişler ve enjeksiyonlara 72. saatte kadar devam etmişlerdir. PMSG verilenlerin hepsinde, oysa GnRH verilenlerin yarısında östrus, ovulasyon ve normal korpus luteum oluşumu saptamışlardır. Aynı deneme 24 koyun üzerinde yinelenmiş, östrus ve gebelik oranı GnRH verilenlerde % 75 ve % 44, PMSG verilenlerde % 100 ve % 56 olmuştur. Yine Hamra ve ark.¹⁸, 14 gün süreyle 60 mg. MAP içeren vaginal sünger uygulanan koyunlara, sünger alındıktan sonra 48 saat içinde her altı saatte bir 50 mcg. GnRH enjekte etmişlerdir. Koyunların % 77'si östrus göstermiş, ancak hiçbiri gebe kalmamış ve yazarlar GnRH uygulamalarından değişik yanıtların alınabileceğini bildirmişlerdir. Öte yandan Hamra ve Jassim¹⁹, 14 gün uygulanan vaginal süngerlerin çıkarılmasından sonra koyunlara 500 IU PMSG veya 48 saat içinde her altı saatte bir 50 mcg. GnRH enjekte etmişler ve iki grupta sırasıyla % 100 ve % 80 doğum oranı elde etmişlerdir. GnRH'nın uzun süreli ve devamlı olarak uygulandığı bu yöntemle değişik dozların denendiği bir araştırmada da 21 gün süre ile ve saatte 1000 ng. olmak üzere sürekli uygulama yapılan koyunlarda hem plazma FSH yoğunluğunun, hem de hipofizde GnRH için bulunan reseptör miktarının önemli derecede baskılandığı gözlenmiřtir²⁰.

Bu çalışmada, koyunlarda östrus sinkronizasyonu ile ortaklaşa yürütülecek sun'i tohumlama çalışmalarına altyapı oluşturacak denemelerin yapılması ve tohumlama sırasında uygulanan GnRH'nın dölverimi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Materyal olarak Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen Merinos ırkı 30 koyun ile bir koç kullanıldı. Koyunlar tesadüfi örnekleme yöntemiyle seçildi ve işletmenin normal bakım-besleme koşullarında bulunduruldu.

Koyunlara östrusun uyarılması ve sinkronize edilmesi amacıyla 12 gün ara ile iki kez olmak üzere 7.5 mg. Luproliol (PGF_{2 α}) kas içi yolla enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan sonra sabah ve akşam her gün östrus araması yapıldı.

Östrus gösteren koyunlar tohumlama sırasında üç gruba ayrıldı. Birinci gruptakilere tohumlamadan altı saat önce, ikinci gruptakilere tohumlama sırasında, üçüncü gruptakilere tohumlandıktan altı saat sonra 25 mcg. Gonadorelin (GnRH) enjekte edildi.

Tohumlamalar için aynı koçtan sun'i vajen ile ardarda iki kez alınan sperma kullanıldı. Sperma, muayenesi yapıldıktan sonra 0.25 cm³'te 200x10⁶ motil

spermatozoon bulunacak biçimde Glukoz-Fosfat sulandırıcısı ile sulandırıldı. Koyunlar, sulandırılan sperma ile hiç bekletilmeden servikal yolla bir kez tohumlandılar. Tohumlamayı izleyen 40 gün içinde geri dönmeyen koyunlar saptandı ve gebelik oranları belirlendi.

BULGULAR

Yapılan iki PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 60 saat içinde koyunların hepsi östrus gösterdi (% 100). Tohumlamadan altı saat önce, tohumlama sırasında ve tohumlamadan altı saat sonra GnRH enjekte edilen ve herbirinde 10'ar koyun bulunan 1., 2. ve 3. gruplarda sırasıyla 8, 3 ve 7 koyun gebe kaldı. Araştırmada elde edilen sonuçlar Tablo: I'de gösterilmiştir.

Tablo: I
Araştırmada Kullanılan
Koyunlarda GnRH Enjeksiyonuyla Elde Edilen Sonuçlar

Grup No:	GnRH enjeksiyon zamanı	Koyun sayısı	Östrus gösteren koyun sayısı	Östrus oranı (%)	Gebe kalan koyun sayısı	Gebelik oranı (%)
1	Tohumlamadan 6 saat önce	10	10	100	8	80
2	Tohumlama sırasında	10	10	100	3	30
3	Tohumlamadan 6 saat sonra	10	10	100	7	70

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan araştırmada, tohumlamadan altı saat önce ve tohumlamadan altı saat sonra GnRH verilen koyunlarda % 80 ve 70 gebelik oranı saptanmıştır. Yutaka ve ark.¹⁰, tohumlamadan 6-9 saat önce GnRH enjekte ettikleri koyunlarda % 57.1-84.6 arasında, Kobayashi ve ark.¹¹ da % 60.0-87.5 arasında değişen ve araştırma sonuçları ile benzerlik gösteren dölverimi sonuçları elde etmişlerdir. Yaptıkları araştırmalarda Yutaka ve ark.⁹ % 57.9, Walker ve ark.¹⁴ % 65, Yutaka ve ark.¹² da % 53.8-58.3 gibi araştırma bulgularını destekler nitelikte dölverimi sonuçları aldıklarını bildirmektedirler. Öte yandan Hamra ve Jassim¹⁹, sık enjeksiyon yöntemi ile aynı sonucu elde etmiştir (% 80). Buna karşın aynı yöntemi izleyen Hamra ve ark.¹⁷ % 44 gibi araştırma bulgularından daha düşük sonuçlar elde etmişlerdir.

Yapılan çalışmada, tohumlama ile aynı anda GnRH verilen koyunlarda % 30 gebelik oranı saptanmıştır. Aynı yöntemin kullanıldığı çalışmaların sınırlı sayı-

da olması nedeniyle araştırma bulgularını yeterince karşılaştırma olanağı bulunamadı.

Kostow ve ark.⁸'nin elde ettiği % 85, Erokhin ve Deryazhentsev⁷'in 1 ve 2 mcg'lık GnRH uyulamaları ile belirlendiği % 56 ve 45 düzeyindeki dölverimi sonuçları araştırma bulgularından daha yüksektir. Oysa 3 mcg. GnRH verilen koyunlarda saptadıkları % 33 doğum oranı ise araştırmada elde edilen % 30 gebelik oranını destekler niteliktedir. Öte yandan Yutaka ve ark.¹³ % 27.1, Walker ve ark.¹⁴ da % 37.1 gibi araştırma bulguları ile benzerlik gösteren nitelikte dölverimi elde etmişlerdir. Ancak adı geçen çalışmalarda GnRH enjeksiyonu vaginal süngerlerin alınmasından 24 saat sonra yapılmış ve tohumlama ile ilişkisi açıklanmamıştır.

Elde edilen sonuçların izleyebildiğimiz literatür verileri ile farklı olması, GnRH'nın değişik dozlarda kullanılmasından, enjeksiyonların farklı zamanlarda yapılmasından, tohumlama yöntemlerinin aynı olmamasından kaynaklanmış olabilir. Araştırmalarda kullanılan koyunların ırk, yaş, kondisyon, mevsim (üreme mevsiminin veya anöstrus dönemi) ve bakım-besleme koşulları bakımından ayrıcalık taşımaları olasıdır ki bu da değişken sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir.

Yapılan araştırmada tohumlama sırasında GnRH verilen ve ikinci grubu oluşturan koyunlarda saptanan dölverimi birinci ve üçüncü gruptakilerden daha düşük olmuştur. Bu durumun kızgınlıkların yeterince izlenememesinden ve hatalı kızgınlık tespitinden kaynaklanması olasıdır.

Sonuç olarak; her ne kadar GnRH'nın plazma LH düzeyini artırdığı ve ovulasyonu sinkronize ettiği bildirilmekte ise de¹⁴, değişken sonuçların alınabileceğini öne süren yazarların elde ettiği verilere¹⁸ ve yapılan araştırma sonuçlarına dayanarak koyunlarda tohumlama sırasında enjekte edilen GnRH'nın dölverimini olumlu yönde etkileyip etkilemeyeceğinin henüz açık bir şekilde söylenemeyeceği kanısına varıldı. En başta GnRH'nın dozu ve uygulama zamanı olmak üzere; daha başka yönlerinin de ayrıntılı bir şekilde çok sayıda hayvan üzerinde denemesi olumlu bir çaba olacaktır.

KAYNAKLAR

1. CARRUTHERS, T.D.: Principles of Hormone Therapy in Theriogenology, alınmıştır "Current Therapy in Theriogenology 2", Ed. Morrow, A.D., 3-13, W.B. Saunders Company, Philadelphia (1986).
2. PICHA, J., JELINEK, P., PICOVA, D.: LH-RH superanalogue (D-Tle⁶-Pro-NH-Et⁹) LH-RH: 6. Gonadotropin concentration in the blood plasma of dioestrous and anoestrous ewes after administration of various doses of LH-RH superanalogue. Anim. Breed. Abstr., 59: 1805 (1991).

3. PINEDA, M.H.: Reproductive Patterns of Sheep and Goat, alınmıştır "Veterinary Endocrinology and Reproduction" Ed. McDonald, L.E., Fourth Edition, 428-447, Lea and Febiger, Philadelphia (1989).
4. BRITT, J.H.: Induction and Synchronization of Ovulation. Alınmıştır "Reproduction in Farm Animals" Ed. Hafez, E.S.E., 5th Edition, 507-516, Lea and Febiger, Philadelphia (1987).
5. WALTER, S.K., LAMPE, R.J., HEART, T.M., MATTHEWS, C.D., SEAMARK, R.F.: Embryo wastage in the ewe following induction of ovulation with synthetic gonadotrophin releasing hormone (GnRH). *Anim. Breed. Abstr.*, 59: 4879 (1991).
6. JABBOUR, H.N., EVANS, G.: Ovarian and endocrine responses of Merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. *Animal Reproduction Science*, 24 (3-4) 259-270 (1991).
7. EROKHIN, A.S., DERYAZHENTSEV, V.I.: The use of surfagon in inseminating ewes. *Anim. Breed. Abstr.*, 59: 6840 (1991).
8. KOSTOV, L., DIMITROV, V. and BONEV, G.: Ovaries reactivity in lactating sheep during oestral and anoestral season. *Proceedings of the II International Symposium on Farm Animal Endocrinology*, Smolenice Castle, Czechoslovakia, March 1989, 153-158 (1989).
9. FUKUI, Y., TAKENAKA, S., DOMEKI, I., ONO, H.: Effects of GnRH and anti-PMSG injections on fertility in ewes pre-treated MAP sponge and PMSG during the non-breeding season. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 30, 108-116 (1984).
10. FUKUI, Y., TETSUKA, M., AKAIKE, M., MACHIYAMA, K., ONO, H.: Effects of Types of Vaginal Sponge Impregnated with Progestogen on Estrus Induction and Lambing Rate in Seasonally Anestrous Ewes. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33 (4), 181-187 (1987).
11. KOBAYASHI, M., FUKUI, Y., TETSUKA, M., ONO, H.: Effects of times of PMSG injection and ram introduction on estrus incidence and lambing rate in ewes treated during the non-breeding season. *Japan J. Anim. Reprod.*, 32(1), 32-35 (1986).
12. FUKUI, Y., KOBAYASHI, M., ONO, H.: Effects of injection time of pregnant mare's serum gonadotropin and individual rams on fertility of ewes in a trial of out-of-season breeding. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 31, 16-24 (1985).
13. FUKUI, Y., KOBAYASHI, M., KOJIMA, M., ONO, H.: Effects of time of PMSG and fixed-time GnRH injections on estrus incidence and fertility in physiologically different ewes pre-treated with progestagen-impregnated vaginal sponge during the non-breeding season. *Theriogenology*, 24(6), 631-641 (1985).

14. WALKER, S.K., SMITH, D.H., ANCEL, P., SEAMARK, R.F.: Time of ovulation in the South Australian Merino ewe following synchronization of estrus. 2. Efficacy of GnRH treatment and its relevance to insemination programs utilizing frozen-thawed semen. *Theriogenology* (31), 3, 555-564 (1989).
15. FORCADA MIRANDA, F., SIERRA ALFRANCA, I., SANUDA ASTIZ, C.: Utilization de GnRH en el control del ciclo sexual en ovejas de raza rasa aragonesa (Abstr.) *Separatum de Archivos de Zootecnia*, Vol: 37, No: 137, 51-60 (1988).
16. STANCIC, R., VULIC, I.D., MARIC, Z.: Stimulation of superovulation in ewes infused with gonadotropin releasing hormone or injected with pregnant mare's serum gonadotropin. *Anim. Breed. Abstr.*, 59: 7615 (1991).
17. STANCIC, R., VULIC, I.D., MARIC, Z.: Stimulation of superovulation in ewes by different combinations of PMSG, GnRH and HCG. *Anim. Breed. Abstr.*, 59: 4873 (1991).
18. HAMRA, A.H., WHEATON, J.E., MARCEK, J.M.: Fertility of anestrus ewes infused with gonadotropin releasing hormone or injected with pregnant mare's serum gonadotropin. *Anim. Breed. Abstr.*, 59: 7615 (1991).
19. HAMRA, A.H., AL-JALIL, Z.F., AL-HITI, S.M., ALKASS, J.E.: Fertility in ewe lambs pretreated with progestagen intravaginal sponges and injected with HCG or GnRH. *Anim. Breed. Abstr.*, 57: 280 (1989).
20. HAMRA, A.H. and JASSIM, M.M.: Reproductive performance of Awassi ewes treated with HMG, HCG, PMSG and GnRH. 11th International congress on animal reproduction and artificial insemination, University College Dublin, Ireland, June 26-30, 435-437 (1988).
21. KHALID, M., HARESIGN, W., HUNTER, M.G., McLEOD, B.J.: Pituitary responses of seasonally anoestrous ewes to long-term continuous infusion of low doses of GnRH. *British Society of Anim. Prod.* 49: 95-102 (1989).