

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA (VETERİNER) ANA BİLİM DALI



**KOÇLARDA SEZON DIŞI MELATONİN UYGULAMASININ  
TESTİS FONKSİYONLARI, TESTİS ARTER  
HEMODİNAMİĞİ VE SPERMATOLOJİK PARAMETRELER  
İLE İLİŞKİSİ**

Doktora Tezi

**Melih AKAR**

Danışman

**Prof. Dr. Mesut ÇEVİK**

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 221O167 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN  
2023

## TEZ KABUL VE ONAYI

Melih AKAR tarafından, Prof. Dr. Mesut ÇEVİK danışmanlığında hazırlanan “KOÇLARDA SEZON DIŞI MELATONİN UYGULAMASININ TESTİS FONKSİYONLARI, TESTİS ARTER HEMODİNAMİĞİ VE SPERMATOLOJİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 7.12.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

|        | Unvanı Adı Soyadı<br>Üniversitesi<br>Ana Bilim/Ana Sanat Dalı                                       | Sonuç                                                                     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Başkan | Prof. Dr. Mesut ÇEVİK<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>Dölerme ve Suni Tohumlama Ana<br>Bilim Dalı  | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Prof. Dr. Murat GÜZEL<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı               | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Doç. Dr. Murat SELÇUK<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>Dölerme ve Suni Tohumlama Ana<br>Bilim Dalı  | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Prof. Dr. İlker SERİN<br>Adnan Menderes Üniversitesi<br>Dölerme ve Suni Tohumlama Ana<br>Bilim Dalı | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Doç. Dr. Çiğdem ÇEBİ<br>Harran Üniversitesi<br>Dölerme ve Suni Tohumlama Ana<br>Bilim Dalı          | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☒ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☐

06/11/2023  
Melih AKAR

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı :** KOÇLARDA SEZON DIŞI MELATONİN UYGULAMASININ TESTİS FONKSİYONLARI, TESTİS ARTER HEMODİNAMİĞİ VE SPERMATOLOJİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 06/11/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 9

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

06/11/2023  
Prof. Dr. Mesut Çevik

## ÖZET

### KOÇLARDA SEZON DIŞI MELATONİN UYGULAMASININ TESTİS FONKSİYONLARI, TESTİS ARTER HEMODİNAMİĞİ VE SPERMATOLOJİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

Melih AKAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Dölerme ve Suni Tohumlama (Veteriner) Ana Bilim Dalı

Doktora, Aralık/2023

Danışman: Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

Koyunlarda yıl boyunca üretim dengesinin sağlanabilmesi için mevsim dışı östrus davranışlarının indüklenerek ilkbaharda üreme faaliyetlerinin gerçekleşmesi önemlidir. Bu çalışmanın temel amacı, sezon dışı dönemdeki koçlarda eksojen melatonin uygulamasının, testisin morfolojik yapısı ve sperma kalitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve bu etkilerin testis kan akımıyla olan ilişkisini incelemektir. Ayrıca, melatonin hormonunun işlev mekanizmasında önemli bir rol oynadığı düşünülen KISS1 geni ile ilişkisinin detaylı bir şekilde incelenmesi ve bu genin metabolik mekanizmalardaki rolünün netliğinin araştırılması da bu çalışmanın amaçları arasındadır. Bu amaç için toplamda 10 adet seksüel olgunluğa ulaşmış, aynı vücut kondüsyon skoruna sahip Bafra koçlarını rastgele kontrol (n=5) ve melatonin (n=5) grubu olarak belirledikten sonra melatonin grubuna birer ay ara ile 2 kez melatonin implant (Regulin®, 18 mg melatonin) implantı uygulandı. Ölçüm ve analizler melatonin implantı uygulamasından üç hafta önceki, uygulama esnasında ve melatonin uygulaması sonrası 3 haftada 1 kez olacak şekilde toplam 6 kez (H -3., H 0., H 3., H 6., H 9. ve H 12. haftalarda) gerçekleştirildi. Bu süreçte testis morfolojik değişiklikleri ve testis hemodinamiğinin Renkli Doppler Ultrasonografi ile izlendi. Spermatolojik parametreleri, morfoloji ve plazma membran bütünlüğü değerlendirildi. Kan plazma hormon profili, total antioksidan ve total oksidan ölçümü ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi. Sperma örneklerinden total RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve qRT-PCR analizi gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) sonucu KISS1R'lerinin spermatozoonlarda bulunduğunu ortaya koydu. Koçlara uygulanan melatonin tedavisi, örnek toplama periyotlarının hiçbirinde sperma hacmini veya sperma konsantrasyonunu etkilememiştir ( $p>0,05$ ). Melatonin grubunda testis hacmi melatonin enjeksiyonundan sonraki 6., 9. ve 12. haftalarda istatistiksel olarak önem arz eden bir oranda artış gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Genel olarak, melatonin grubundaki koçlarda 3 ila 9. haftalarda Rezistif ve Pulsatil İndeksi daha düşüktü ( $p<0,05$ ), ancak çoğu spermatolojik parametre sonuçlarında iki grup arasında fark yoktu ( $p>0,05$ ). Kontrol ve melatonin KISS1R gen ifade düzeyleri arasındaki farklılıklar haftalara göre kategorize edilerek melatonin grubunda anlamlı olmayan artış gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Sonuç olarak koçlarda sezon dışı melatonin uygulaması, testiküler kan akışını ve testis hacmini önemli ölçüde değiştirmiş ve total antioksidan konsantrasyonunu arttırmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Koç, KISS1 geni, Melatonin, Sezon dışı, Spermatoloji, Testis hemodinamiği

## ABSTRACT

### ASSOCIATION OF MELATONIN ADMINISTRATION WITH TESTICULAR FUNCTION, TESTICULAR ARTERY HEMODYNAMICS, AND SPERMATOLOGIC PARAMETERS IN RAMS IN THE OUT-OF-SEASON

Melih AKAR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Reproduction and Artificial Insemination

Ph.D., December/2023

Supervisor: Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

Off-season estrous behaviors must be induced in ewes, and reproductive activities take place in the spring to maintain the balance of production throughout the year. The study aimed to investigate the correlation between exogenous melatonin administration in non-breeding season rams and its effects on testicular morphometric measurements, spermatological parameters, and testicular hemodynamics. Additionally, the study aimed to elucidate the relationship between melatonin and the KISS1 gene, which is believed to play a role in the functional mechanism of melatonin, and to explore the clarity of metabolic mechanisms associated with this gene. For this purpose, 10 sexually mature with equal body condition score Bafra rams were randomly assigned to the control group (n=5) and the melatonin group (n=5). A melatonin implant (Regulin® 16 mg melatonin) was administered twice to the melatonin group. Measurements and analyses were performed six times: once in the week before, once during, and once three weeks after melatonin implantation (W -3, W 0, W 3, W 6, W 9 ve W 12). Testicular morphometric changes and testicular hemodynamics were monitored by color Doppler ultrasonography during this period. Spermatologic parameters, morphology, and plasma membrane integrity were evaluated. The ELISA method determined blood plasma hormone profiles, total antioxidant, and total oxidant measurements. Total RNA isolation, cDNA extraction, and Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis were performed on semen samples. qRT-PCR results revealed the presence of KISS1Rs in spermatozoa. Melatonin treatment of rams did not affect semen volume or semen concentration during any of the sample collection periods ( $p>0,05$ ). In the melatonin group, testicular volume significantly increased, and this increase was statistically significant at 6, 9, and 12 weeks after melatonin injection ( $p<0,05$ ). The melatonin group showed lower resistance and pulsatility indexes than another group at Weeks 3 to 9, with statistically significant differences ( $p<0,05$ ). However, there were no significant differences ( $p>0,05$ ) between the two groups in most semen quality parameters. Differences in KISS1R gene expression levels between the control and melatonin groups were categorized by weeks, and a statistically non-significant increase was observed in the melatonin group ( $p>0,05$ ). In conclusion, melatonin administration significantly altered testicular blood flow and testis volume, and increased total antioxidant concentrations in out-of-season rams.

**Keywords:** Ram, KISS1 gene, Melatonin, Out of season, Spermatology, Testicular hemodynamics

## ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

‘Koçlarda Sezon Dışı Melatonin Uygulamasının Testis Fonksiyonları, Testis Arter Hemodinamiği ve Spermatolojik Parametreler ile İlişkisi’ adlı doktora tez çalışmamda melatonin hormonunun erkek üreme sistemi üzerinde çeşitli etkinlikleri değerlendirildi.

Doktora eğitimim boyunca bilgi hazinemi dolduran ve her bir kelimenin değerini öğretip öğrenmeme vesile olan değerli hocalarıma içten teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitim sürecim boyunca bana danışmanlık yapan sayın hocam Prof. Dr. Mesut ÇEVİK'e derin bir minnettarlık duygusuyla şükranlarımı sunarım. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Doç. Dr. Murat SELÇUK, Doç. Dr. Alper KOÇYİĞİT ve Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL'a, doktora yolculuğumda sağladıkları destek, paylaştıkları bilgi ve bana yön gösterdikleri için içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez izleme komitemde bulunan Veterinerlik İç Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Murat GÜZEL'e teşekkür ederim. Tez çalışmamda yer alan Renkli Doppler Ultrason kullanımında tüm bilgi ve emeğini sunan İç Hastalıkları Anabilim Dalındaki Dr. Araş. Gör. Çağatay ESİN'e teşekkür ederim. Aynı şekilde, tezimin biyokimyasal ve genetik analizlerinde yardımcı olan Öğr. Gör. Eda UĞURTAY ve Doktora Öğrencisi Cansu CAN'a da şükranlarımı sunarım. Hem akademik hem de laboratuvar çalışmalarımda samimiyetle yanımda olan, fedakarlıkla desteklerini esirgemeyen asistan arkadaşlarım Dr. Araş. Gör. Burcu ESİN ve Araş. Gör. Cumali KAYA'ya en içten teşekkürlerimi iletmek isterim. Ayrıca, çalışmalarına destek veren tüm meslektaşlarıma ve yardımcı olan fakülte öğrencilerine de derin minnettarlığımı ifade etmek isterim. “Koçlarda Sezon Dışı Melatonin Uygulamasının Testis Fonksiyonları, Testis Arter Hemodinamiği ve Spermatolojik Parametreler ile KISS1 Gen Düzeyinin İlişkisinin Belirlenmesi” başlıklı, 221O167 no'lu proje numarası ile destekleyen TÜBİTAK Proje Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımın her aşamasında desteklerini benden esirgemeyen, sevgi ve anlayışla her zaman yanımda olan değerli ailem, annem ve babam İlknur&Hasan AKAR'a, abim Samet AKAR'a ve sevgili kız kardeşim Sinem AKAR'a en derin minnettarlığım ile teşekkür ederim.

Melih AKAR

## İÇİNDEKİLER

|                                                                            |      |
|----------------------------------------------------------------------------|------|
| TEZ KABUL VE ONAYI .....                                                   | i    |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI .....                                       | ii   |
| TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI .....                                 | ii   |
| ÖZET .....                                                                 | iii  |
| ABSTRACT .....                                                             | iv   |
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....                                                    | v    |
| İÇİNDEKİLER.....                                                           | vi   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                              | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                      | x    |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                      | xi   |
| 1. GİRİŞ .....                                                             | 1    |
| 2. KÜÇÜK RUMİNANLARDA ÜREME FİZYOLOJİSİ .....                              | 4    |
| 3. KOÇLARDA ÜREME KAPASİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ .....                    | 7    |
| 3.1. Anamnez Alma .....                                                    | 8    |
| 3.2. Sürüdeki “Koyun: Koç” Oranı ve Çiftleşme Davranışları .....           | 8    |
| 3.3. Genel Klinik Muayene .....                                            | 9    |
| 3.4. Genital Organlarının Fiziksel ve Klinik Muayenesi.....                | 10   |
| 3.5. Genital Organlarının Ultrasonografik Muayenesi .....                  | 11   |
| 3.6. Libido Değerlendirmesi.....                                           | 15   |
| 4. KOÇLARDA ÜREMENİN DENETLENMESİ.....                                     | 16   |
| 4.1. Doğal Üreme .....                                                     | 16   |
| 4.2. Suni Tohumlama .....                                                  | 17   |
| 4.3. Üreme Sezonu Planlaması.....                                          | 17   |
| 4.4. Fotoperiyot .....                                                     | 18   |
| 5. ÜREME KAPASİTESİNİN ARTIRILMASINDA ETKİLİ FAKTÖRLER. ....               | 19   |
| 5.1. Stres Yönetimi .....                                                  | 19   |
| 5.2. Beslenme Manipülasyonları .....                                       | 19   |
| 5.3. Uygun Genetik Karakterlerin/Bireylerin Seçimi.....                    | 20   |
| 5.4. Spermanın Uygun Koşullarda Muhafazası.....                            | 21   |
| 5.5. Melatonin Etki Mekanizması ve Melatonin Uygulamaları .....            | 22   |
| 5.5.1. Melatonin Reseptörlerinin Lokalizasyonu.....                        | 23   |
| 5.5.2. Melatoninin Salgılanma Mekanizması .....                            | 23   |
| 5.5.3. Melatoninin Etki Mekanizması.....                                   | 24   |
| 5.5.4. Melatonin ve Kisspeptin İlişkisi .....                              | 25   |
| 6. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                | 29   |
| 6.1. Materyal.....                                                         | 29   |
| 6.2. Yöntem .....                                                          | 29   |
| 6.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve Melatonin Uygulaması.....       | 29   |
| 6.2.2. Testis Morfometrik Ölçümleri .....                                  | 31   |
| 6.2.3. Testis Arter Hemodinamiğinin Renkli Doppler USG ile Ölçülmesi ..... | 32   |
| 6.3. Kan Örneklerinin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler .....           | 35   |
| 6.3.1. Melatonin Seviyesinin Ölçümü .....                                  | 35   |
| 6.3.2. Testosteron Seviyesinin Ölçümü .....                                | 36   |
| 6.3.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 Seviyesinin Ölçümü.....            | 36   |
| 6.4. Koçlardan Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi.....                | 36   |
| 6.4.1. Spermatozoa Motilitesi ve Yoğunluğunun Değerlendirilmesi .....      | 38   |
| 6.4.2. Morfolojik Muayene .....                                            | 39   |
| 6.4.3. Canlılık Testi .....                                                | 39   |

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.4.1. Plazma Membran Bütünlüğünün Tespiti (Hipo-Osmotik Swelling Test) | 40        |
| 6.5. Antioksidan Profilin Değerlendirilmesi .....                       | 41        |
| 6.6. KISS1 Gen İfade Düzeylerinin Analizi .....                         | 42        |
| 6.6.1. Spermadan Total RNA İzolasyonu ve Konsantrasyon Tayini.....      | 42        |
| 6.6.2. Total RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi .....                       | 42        |
| 6.6.3. qRT-PCR analizi.....                                             | 43        |
| 6.7. İstatiksel Analiz.....                                             | 45        |
| <b>7. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>                                     | <b>47</b> |
| 7.1. Testis Hacmi.....                                                  | 48        |
| 7.2. Testis Hemodinamiği.....                                           | 49        |
| 7.3. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi .....               | 53        |
| 7.4. Biyokimyasal Analizler .....                                       | 57        |
| 7.5. KISS1 Geni İfade Düzeyi Sonuçları.....                             | 62        |
| <b>8. SONUÇ .....</b>                                                   | <b>66</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                   | <b>67</b> |
| <b>EKLER.....</b>                                                       | <b>79</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                    | <b>83</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|         |                                                     |
|---------|-----------------------------------------------------|
| ABP:    | Androjen Bağlayıcı Protein                          |
| ABTS:   | 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) |
| ALH:    | Lateral Kafa Değişirme                              |
| ARC:    | Arkuat Çekirdek                                     |
| AVPV:   | Anteroventral Periventriküler Çekirdek              |
| BCF:    | Çapraz Geçiş Frekans Ritmi                          |
| CASA:   | Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı            |
| cDNA:   | Tamamlayıcı DNA                                     |
| CODD:   | Bulaşıcı Küçükbaş Digital Dermatitis                |
| DNA:    | Deoksiribo Nükleik Asit                             |
| dNTP:   | DNA Nükleotid Bazları                               |
| EDV:    | Diyastol Sonu Hızı                                  |
| FSH:    | Folikül Uyarıcı Hormon                              |
| GnIH:   | Gonadotropin İnhibitör Hormon                       |
| GnRH:   | Gonadotropin Salgılayan Hormon                      |
| GPR:    | G Proteinlerine Bağlı Özel Reseptör                 |
| HIOMT:  | Hidroksiindol-O-Metiltransferaz                     |
| HPG:    | Hipotalamus-Hipofiz-Gonad                           |
| HRP:    | Horseradish Peroksidaz                              |
| IA:     | İntra-Testiküler Arter                              |
| IGF-1:  | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1                    |
| IHH:    | İdiyopatik Hipogonadotropik Hipogonadizm            |
| KISS1R: | Kisspeptin Reseptörü                                |
| Kp:     | Kisspeptin                                          |
| LH:     | Luteinleştirici Hormon                              |
| MLT:    | Melatonin                                           |
| mRNA:   | Mesajcı Ribonükleik asid                            |
| MT1:    | Melatonerjik Tip 1                                  |
| MT2:    | Melatonerjik Tip 2                                  |
| MT3:    | Melatonerjik Tip 3                                  |
| MTA:    | Marjinal Testiküler Arter                           |

|         |                                            |
|---------|--------------------------------------------|
| MV:     | Maedi-Visna                                |
| NA:     | Noradrenerjik                              |
| NAT:    | N-asetilserotonine                         |
| OH:     | Hidroksil Radikali                         |
| Pg:     | Pikogram                                   |
| PI:     | Pulsatil İndeksi                           |
| POA:    | Preoptik Alan                              |
| PRL:    | Prolaktin                                  |
| PSV:    | En Yüksek Sistolik Hızı                    |
| PUFA:   | Çoklu Doymamış Yağ Asiti                   |
| PVN:    | Paraventriküler Çekirdek                   |
| RH:     | Retino-Hipotalamik                         |
| RI:     | Rezistif İndeks                            |
| ROS:    | Reaktif Oksijen Türleri                    |
| RT-PCR: | Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| SCN:    | Suprakiazmatik Çekirdek                    |
| STA:    | Supra-Testiküler Arter                     |
| TAS:    | Toplam Antioksidan Durumu                  |
| TBF:    | Testis Kan Akışı                           |
| TOS:    | Toplam Oksidan Durumu                      |
| USG:    | Ultrasonografi                             |
| VAP:    | Ortalama Yol Hızı                          |
| VCL:    | Eğrisel Hız                                |
| VSL:    | Düz Çizgisel Hız                           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Üreme mevsimi boyunca üreme aktivitesindeki değişimler .....                                  | 4  |
| Şekil 3.1. Testisin vaskülarizasyonu .....                                                               | 12 |
| Şekil 3.2. Üç farklı konumda testiküler arter ve prob oryantasyonu .....                                 | 13 |
| Şekil 5.1. Melatonin sentezindeki ana kontrol mekanizmalarının diyagramı .....                           | 24 |
| Şekil 5.2. KISS1'in testiste olası etkileşim mekanizması .....                                           | 27 |
| Şekil 6.1. Çalışma grubumuzu oluşturan Bafra ırkı koçları.....                                           | 30 |
| Şekil 6.2. Melatonin implant uygulaması .....                                                            | 30 |
| Şekil 6.3. Melatonin uygulaması ve çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizlerin zaman çizelgesi ..... | 31 |
| Şekil 6.4. Testis hacminin hesaplanması için gerekli ölçümlerin alınması.....                            | 32 |
| Şekil 6.5. Renkli Doppler Ultrasonografi cihazının kullanımı .....                                       | 33 |
| Şekil 6.6. Renkli Doppler Ultrasonografi cihazının kullanımı ile değerlendirmenin yapılması .....        | 34 |
| Şekil 6.7. Vena jugularisten kan örneklerinin toplanması .....                                           | 35 |
| Şekil 6.8. Sperma örneklerinin toplanması öncesi hazırlık.....                                           | 37 |
| Şekil 6.9. Sperma örneklerinin toplanması .....                                                          | 38 |
| Şekil 6.10. SpermBlue® ile boyanmış koç spermasının morfolojisi .....                                    | 39 |
| Şekil 6.11. Eosin-Nigrosin boyama ile spermatozoon canlılığının tespiti .....                            | 40 |
| Şekil 6.12. Hipo-Ozmotik şişme testi (HOST) .....                                                        | 41 |
| Şekil 6.13. Sperm Örneklerinden Total RNA İzolasyonu, cDNA Eldesi ve qRT-PCR Analizi.....                | 43 |
| Şekil 7.1. Haftalık olarak testis hacmindeki değişiklikler.....                                          | 48 |
| Şekil 7.2. PI ve RI değerlerine ilişkin hesaplama formülasyonları.....                                   | 50 |
| Şekil 7.3. Haftalara göre gruplar arası testosteron seviyelerinin karşılaştırılması.....                 | 59 |
| Şekil 7.4. Haftalara göre gruplar arası total oksidan seviyelerinin karşılaştırılması..                  | 61 |
| Şekil 7.5. Haftalara göre gruplar arası total antioksidan seviyelerinin karşılaştırılması .....          | 62 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 5.1. Farklı türler arasında Kisspeptinin amino asit sekans organizasyonunun karşılaştırılması .....                                                         | 28 |
| Tablo 6.1. Çalışma kapsamında kullanılacak olan primerlerin dizaynı .....                                                                                         | 43 |
| Tablo 6.2. PCR reaksiyon hazırlık protokolü.....                                                                                                                  | 44 |
| Tablo 6.3. PCR döngü koşulları .....                                                                                                                              | 44 |
| Tablo 6.4. qRT-PCR reaksiyon hazırlık protokolü .....                                                                                                             | 44 |
| Tablo 6.5. qRT-PCR döngü koşulları .....                                                                                                                          | 45 |
| Tablo 7.1. Melatonin uygulamasının supratestiküler arterin renkli doppler ultrasonografi ile ölçülen testis kan akımındaki değişikliklere etkisi.....             | 50 |
| Tablo 7.2. Melatonin uygulamasının marjinal arterin renkli doppler ultrasonografi ile ölçülen testis kan akımındaki değişikliklere etkileri.....                  | 51 |
| Tablo 7.3. Melatonin uygulamasının sperma miktarı, total spermatozoa motilitesi, progresif motilite ve yoğunluk parametrelerindeki değişimlere etkileri.....      | 54 |
| Tablo 7.4. Melatonin uygulamasının spermatozoa canlılığı, plazma membran bütünlüğü (HOST) ve morfolojik değerlendirme parametrelerindeki değişimlere etkisi ..... | 54 |
| Tablo 7.5. Melatonin uygulamasının kinematik spermatolojik parametrelerdeki değişikliklere etkisi .....                                                           | 55 |

## 1. GİRİŞ

Üreme faaliyeti, sadece dişilerin değil erkeklerin de üreme kapasitelerine bağlı olarak hayvancılık endüstrisindeki en önemli ekonomik faktörlerden birini oluşturur. Ilıman iklim kuşağında yaşayan koyunlar, güçlü bir mevsimsel üreme özelliği gösteren tür olarak kabul edilir. Mevsimsellik öncelikle gün ışığındaki döngüsel değişiklikler ile sıcaklık, besleme, erkek hayvanlarla temas, kuzulama süresi ve emzirme süresi gibi diğer faktörler tarafından kontrol edilir. Üreme performansındaki bu mevsimsel değişiklikler, evcilleştirme ve yoğun üreme düzeyine göre azalan bir derecede koçlarda da gözlemlenebilir. Ancak koçlardaki bu değişiklikler koyunlara göre daha az belirgin olmakla birlikte spermatogenezis ve cinsel aktivite durmadan sürekliliğini korur (Egerszegi et al., 2014). Küçük ruminantlarda üreme fizyolojisi fotoperiyoda bağımlı olarak meydana gelir ve mevsime bağlı olarak sperma kalite parametrelerinde önemli farklılıklar bulunur. Özellikle üreme sezonu içerisinde (sonbahar-kış) olan koçlar ilkbahar ve yaz aylarına kıyasla daha yüksek üreme performansı ve sperma kalitesi gösterir (Batissaco et al., 2013). Koçların üreme kabiliyeti, nöroendokrin sistemin gelişimi, testosteron konsantrasyonu, bireysel vücut bölümlerinin gelişimi ve cinsel olgunlaşma arasındaki bağlantıların sorunsuz bir şekilde çalışması ile ortaya konulmaktadır (Cevik vd., 2017).

Melatonin (N-asetil-5-metoksitripamin), epifiz bezinden salgılanan bir nörohormondur. Belirli koyun ve keçi ırkları gibi mevsimsel olarak üreyen hayvanlarda, Hipotalamus-Hipofiz-Gonadal eksen arasındaki doğrudan etkileşim sayesinde, gündüz saatlerindeki değişikliklere bağlı olarak üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde büyük rol oynar (Samir et al., 2020). Melatonin salgılanma modelinde, mevsimsel ve sirkadiyen ritimlerin organizasyonunu sağlamak için vücudun fizyolojik merkezlerine aydınlık/karanlık döngüleri hakkında bilgi iletir (Egerszegi et al., 2014). Melatonin aynı zamanda vücut içinde güçlü bir biyolojik antioksidan olarak kabul edilir ve süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz ve glutatyon redüktaz dahil olmak üzere antioksidatif enzimlerin gen ekspresyonunu uyarır. Ek olarak, lipit çift katmanlarını geçen ve serbest radikal toplayıcı olarak işlev gören, diğerlerinin yanı sıra hidroksil ve peroksil radikallerini nötralize eden, lipit membran peroksidasyonunu ve apoptozu önleyen ve Deoksiribo Nükleik Asit'i (DNA) serbest radikallerin neden olduğu hasardan koruyan lipofilik bir ajandır. (Ramadan et al., 2009).

Melatonin etki mekanizması karmaşık olmakla birlikte, hücre plazma zarını geçerek etkilerini vücudun tüm bölümlerinde gösterebildiği için memelilerde çok sayıda etkiye sahip bir hormondur (Cebrián-Pérez et al., 2014). Genel olarak, melatonin etkilerini G proteinlerine bağlı özel reseptörler (GPR) aracılığıyla göstermektedir. Kisspeptinler (Kp), melatoninin sinyallerini taşımada görev alan ve *KISS1* geni tarafından salınımı kontrol edilen bir nöropeptittir ve GnRH'nın pulsatil salımının güçlü uyarıcıları olarak katkısı bulunmaktadır (Bhattacharya et al., 2019). Erkek hayvanlarda kisspeptinler, seksüel farklılaşma, metabolik ve çevresel etkiler ile fertilitenin kontrolü, pubertanın zamanlaması ve gonadal hormonlar tarafından gonadotropin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Koçlarda testisin morfometrik olarak değerlendirmesi, şekil, boyut ve testis ekotekstürünün değerlendirilmesini içerir. Koçlarla ilgili çok sayıda literatür, testis ultrasonografisinin puberta ve olgun hayvanlarda spermatolojik parametreler ile korelasyonunun değerlendirilmesinde önemini göstermektedir (Ntemka et al., 2018). Testis hemodinamiği, oksijen, besinler ve diğer hormonların testise ve testisten taşınması için ana yoldur (Samir et al., 2020). Renkli Doppler ultrasonografi, skrotumdaki vasküler değişiklikleri değerlendirmek için etkili ve noninvaziv bir yöntemdir ve vasküler yapı, kan akışının yönü ve hızı hakkında bilgi sağlar. Bu sayede iki boyutlu bir görüntü ile (B mod) doku ve organlardaki vaskülaritenin renkli bir haritası görselleştirilir. Öte yandan, spektral-Doppler moduyla yapılan analiz ile kanın akış hızı ve akış direnci hakkında bilgi sağlamaktadır ve testiküler arterdeki kan akışını karakterize etmek için kullanılmaktadır (Batissaco et al., 2013). Renkli Doppler moduyla yapılan analiz, kanın hızı ve akış direnci hakkında bilgi sağlamaktadır ve Doppler parametrelerinden olan rezistif indeks (RI) ve pulsatil indeksi (PI), infertil erkeklerin belirlenebilmesi amacı ile rutin klinik kullanımda güvenilir göstergelerdir (Hedia et al., 2020).

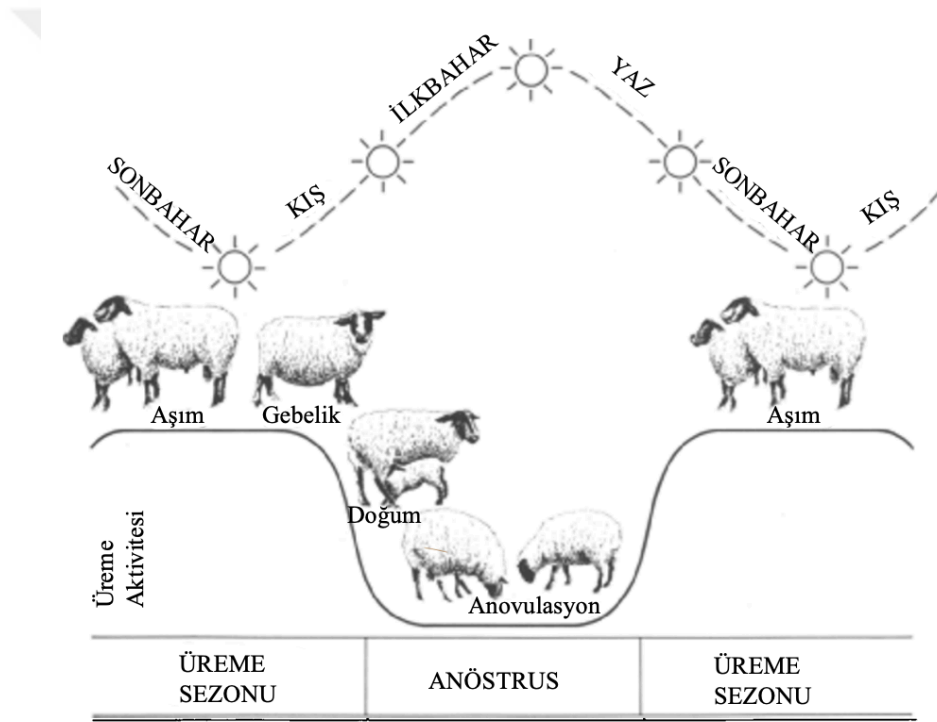
Küçükbaş hayvancılığın geliştirilmesinde verim özelliklerine ilişkin bilgilerin çeşitli ölçüm değerlerine dayalı olarak elde edilmesi, et ve süt üretimi amacıyla kaliteli hayvanların seçilerek bu hayvanlara üreme şansının verilmesi ve üreme performansı ile ilgili gen açısından moleküler ve hücresel mekanizmalara netlik kazandırılarak ileriki çalışmalar ile bu gen bölgelerinde meydana getirilecek iyileştirme ülke ekonomisinin geliştirilmesi ve hayvancılığın yaygınlaştırılması için son derece önemli görülmektedir.

Bu doktora tezinde, öncelikle koçlarda üreme sezonu dışında melatonin kullanımının, Renkli Doppler Ultrasonografi (USG) ile ölçülen testis kan akışı (TBF) ve testiküler morfometri üzerinde olumlu ve anlamlı bir ilişki bulunup bulunmadığı araştırıldı. Ayrıca, melatonin hormonunun antioksidan özelliklerinden kaynaklanan oksidasyon seviyelerindeki değişiklikler ve kan serum plazması hormon profili üzerindeki etkileri de ele alındı. Bu tez çalışmasında ayrıca, sezondışı ekzojen melatonin uygulamasının spermatolojik parametrelerle ilişkisinin belirlenmesi ve mevsime bağlı üreme gösteren erkek hayvanlarda melatonin ile koordineli işlev gördüğü bildirilen kisspeptinlerin gen seviyeleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlandı.



## 2. KÜÇÜK RUMİNANLARDA ÜREME FİZYOLOJİSİ

Koyun ve keçiler dahil olmak üzere bazı geviş getiren hayvan türleri mevsimsel üreme döngüsü sergilemektedir. Bu tür hayvanlarda mevsimsel olarak üremenin amacı, kuzulamanın genellikle ilkbaharda, yılın en uygun zamanına denk gelmesinin sağlanmasıdır. Genellikle üreme davranışları, gün uzunluğunun kısaltmaya başlamasına denk gelen yaz aylarının sonu veya sonbaharın başında ortaya çıkar ve yaklaşık olarak kış sonları veya ilkbaharın başlarına kadar devam etmektedir. Dönem içerisinde de gebelik şekillenmedikçe birbirini izleyen östrus siklusları gözlenebilmektedir. Bu sebeple bu türlerin dişi hayvanları, ‘mevsimsel poliöstrik hayvanlar’ olarak sınıflandırılırlar (Abecia et al, 2012).



Şekil 2.1. Üreme mevsimi boyunca üreme aktivitesindeki değişimler (Foster et al., (1986)’ den uyarlanmıştır)

Koyunlarda üreme mevsimselliği, davranışsal, endokrin ve ovulator seviyelerde mutlak bir şekilde, iki farklı dönem arasında yıllık bir değişim ile meydana gelir. Üreme mevsimi içerisinde bulunan koyunlar, düzenli aralıklarla (ortalama 17 gün) östrus davranışı gösterirler ve ovulasyonu takiben gebelik şekillenmezse dönem içerisinde yeni bir siklus başlar. Koyunlar gün uzunluğunun artmaya başlaması sonucu seksüel aktivitenin kesilmesi ile karakterize anöstrus dönemine girerler (Şekil 2.1). Anöstrus döneminden üreme mevsimine geçiş, kısa döngülerin meydana gelmesiyle

kademeli olarak gerçekleşir. Dişilerde her bir luteinize edici hormon (LH) salınımı, folikülleri bir östrojen salınımı için uyarır ve bu steroid, feed-back mekanizmasında testosteronunkine eş değer bir rol gerçekleştirir. Cinsiyetler arasındaki en büyük fark, üreme mevsimi boyunca dişi gonadın aynı zamanda progesteron hormonu üretmesidir ve feed-back mekanizması esas olarak bu steroide ve bunun östradiol ile sinerjistik etkileşimine dayanır (Martin et al., 2004).

Koç kuzularında pubertanın başlama yaşı, ırklara ve iklim koşullarına göre değişir (Martin et al., 2002). Puberta başlangıcı üreme eksenini aktive eden, Sertoli ve Leydig hücrelerinin gonadotropin etkisine (LH ve FSH) yanıt vermesini sağlayan ve spermatogenezisin başlamasıyla sonuçlanan bir dizi endokrin olayla karakterize edilir. Koç kuzularında puberta yaşı çoğunlukla fotoperiyottan etkilenirken, bir diğer önemli faktör ise beslenme düzenidir. Martin et al. (2004), yüksek proteinli bir diyetle beslenmenin testis dokusunda artışa neden olduğunu ve sonuç olarak puberta yaşını erkene çektiği gözlemlemiştir. Buna ek olarak puberta, testis seviyesindeki anatomik değişikliklerle, özellikle testis dokusundaki artışla karakterize edilebilir.

Koçlarda LH salınımı mevsimle birlikte karmaşık bir şekilde değişir. Üreme sezonu boyunca LH salınımları nispeten yüksek frekans ve düşük genlikte olma eğilimindeyken, üreme sezonu dışında ise eğilim, düşük frekans ve yüksek genlikte salınımı şeklindedir (Rhim et al., 1993). Koçların fotoperiyoda duyarlılığı koyunlardan farklıdır. Koçlarda spermatogenezis yaklaşık 50 gün sürmektedir ve spermatozoonların epididimal kanaldan geçmesi yaklaşık 14 gün sürer. Seksüel aktivite genellikle koçlarda üreme döneminden yaklaşık 1–1,5 ay önce uyarılır ki bu da koyunların östrus dönemi başladığında, koçların zaten yüksek düzeyde seksüel aktiviteye ulaşmasını sağlar. Bu ilerleme anöstrustaki koyunların sahip oldukları mevcut büyük boyutlu foliküller nedeniyle hormonal uyarılmadan birkaç gün sonra ovulasyona uğrayabildikleri için önemlidir (Rosa & Bryant, 2003).

Çevresel faktörlere verilen üreme tepkilerinin çoğu beyin seviyesinde koordine edilir. Burada tüm dış ve iç girdiler nihayetinde gonadotropin salgılayan hormonun (GnRH) salgılanmasını kontrol eden nihai bir ortak yol üzerinde birleşir. Koçların erken pubertal gelişimleri sırasında, LH salınımı ve folikül uyarıcı hormon (FSH) salgılanmasındaki artışların yanı sıra hipofizin gonadotropin salgılayan hormona (GnRH) tepki vermesiyle ilişkilidir. Gelişme devam ettikçe gonadotropin sekresyonu azalırken periferik kan ve intratestiküler testosteron konsantrasyonları ve spermatogenik aktivite artar (Martin et al., 2004).

Testislerin gonadotropik stimölasyonu, muhtemelen kendi başına sinyal modellerindeki değışiklikler ve hedef hücreler tarafından LH ve FSH reseptör bağlama aktivitesindeki artışlar nedeniyle daha etkili hale gelir. LH ve FSH ile prolaktin (PRL), koçta testislerin gelişimini etkileyebilir ve diğör türlerde spermatogenezisin ve testis steroidogenezinin başlatılması ve sürdürölmesinde rol oynar. Prolaktin, hipotalamustan gelen düzenleyici faktörlerin etkisi altında ön hipofiz bezi tarafından salgılanır ve salınımı, fotoperiyodizmden belirgin şekilde etkilenir (Yarney et al., 1990).



### 3. KOÇLARDA ÜREME KAPASİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Koçların üreme yeteneğinin klinik olarak değerlendirilmesi, koyun sürülerinin yönetim programlarının ayrılmaz bir parçasıdır ve koçların üreme yeteneğini olumsuz yönde etkileyen problemlerin çoğu, klinik değerlendirmeler sırasında kolaylıkla tespit edilebilmektedir (Kozłowska et al., 2022). Genel olarak koçların üreme yeteneğini olumsuz yönde etkileyecek sorunları tespit etmek için üreme mevsiminden iki ay önce üreme yeteneğinin klinik değerlendirmesinin yapılması gerekmektedir. (Gouletsou & Fthenakis, 2010). Bu süre, koçların spermatogenezisinin yaklaşık olarak 50 gün sürmesi ve bu süreçten sonra spermatozoonların epididimal kanaldan geçmesi için yaklaşık olarak 14 günlük bir süreye daha ihtiyaç duyması dikkate alınarak belirlenmektedir. Aynı zamanda klinik değerlendirme sonuçlarına göre herhangi bir tedavinin mümkün olmadığı veya hayvan sahibi tarafından istenmediği takdirde iki aylık süre yeni koçların satın alınması için yeterli zamanı vermektedir (Ahmadi et al., 2012).

Koçların üreme yeteneğinin değerlendirilmesi sırasında çeşitli klinik bulgular tespit edilebilmekte ve önem dereceleri değişebilmektedir (Mozo et al., 2015). Özellikle erkek çiftlik hayvanlarında, fertilité potansiyellerini değerlendirmek amacıyla bir dizi yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle bir sürüde bulunan koçların üreme yeteneğinin düzenli olarak izlenmesi, bozuklukların erken bir aşamada teşhisine katkıda bulunur ve böylelikle bu bozukluğun daha kolay kontrol altına alınmasına ve sürüdeki diğer hayvanlara bulaşma tehlikelerinin önlenmesine katkıda bulunur (Gouletsou & Fthenakis. 2010). Erkek hayvanlar üreme hayatına başlamadan önce sperma kalitesinin değerlendirilmesi, fertilité potansiyellerini tahmin etmek için gereklidir (Pinho et al., 2018).

Koçların üreme yeteneğinin klinik değerlendirmesi amacı ile anamnez alma, sürüdeki “koyun : koç” oranının değerlendirilmesi, genel klinik muayene, koçların genital organlarının klinik muayenesi, genital organlarının ultrasonografik muayenesi ve libido değerlendirmesi yapılmaktadır. Ayrıca sperma kalitesi ile spermatozoon ve testosteronun üretildiği yer olan testislere özellikle dikkat edilir (Boukhliq et al., 2018).

### 3.1. Anamnez Alma

Anamnez alma, koçların ve sürülerin üreme yeteneğinin değerlendirilmesinin önemli bir parçasıdır. Koçlarda infertiliteye sebep olabilecek bazı durumların, örneğin; taşıma stresi, aşırı sıcak veya hastalık gibi meydana geldikleri sırada önemsiz sayılabilecek konular veya durumlar hakkında hayvan sahibinden dikkatli bir şekilde bilgilerin alınarak araştırılması gerekmektedir (Hindson & Winter, 2008; Gardiner & Rhind, 2013).

Anamnez alınması aşamasında hayvan sahibine sorulacak sorularda, hayvanın geçmiş üreme performansına (sahibi tarafından değerlendirildiği şekliyle), önceki üreme yeteneği değerlendirmelerinin sonuçlarına, koçun üreme kapasitesine, uygulanan tedavileri ve sürüdeki yönetim uygulamalarına değinilmelidir (Hindson & Winter, 2008). Yine aynı şekilde sürünün üreme performansının kayıtları varsa, bu kayıtlar sürünün genel fertilite seviyesinin değerlendirilmesine ve düşük fertilite döneminin başlangıcının ve süresinin tahmin edilmesine yardımcı olabilmektedir (Dossa et al., 2015).

### 3.2. Sürüdeki “Koyun: Koç” Oranı ve Çiftleşme Davranışları

Kızgınlık dönemindeki olgun koyunlar, koçların etrafında gruplar oluşturarak onlara yakın dururlar ve açıkça onların ilgisini çekerler. Buna karşılık, daha genç yaştaki koyunlarda bu tür gruplaşmalara daha az sıklıkla rastlanılır. Bu durum, genç yaştaki koyunlarda östrus belirlenmesine etki eder ve bu sebeple yetişkin koyunlara göre çiftleşme için daha yüksek oranda koç gerektirir. Bununla birlikte daha genç koyunların yetişkin koyunlara birlikte bulundurulması çiftleşme şanslarını azaltır ve bu nedenle üreme döneminde daha önce çiftleşme aktivitesi göstermeyen koyunların olgun koyunlardan ayrılması tavsiye edilir (Gelez et al., 2003; Dwyer, 2017).

Koçların da kendi cinslerine veya görünüşlerine sahip koyunları tercih ettiği görülmektedir (Tilbrook & Cameron, 1990). Genç koçlar olgun koçlar kadar aktif olamayabilirler ve iri olgun dişiler tarafından şiddete uğramaları veya vücut kondisyonlarının büyük bir kısmını kaybetmeleri gibi durumlar gözlenebilir (Simitzis et al., 2006). Koçlar arasındaki baskınlık da üreme mevsiminde önemli bir rol oynar. Baskın koçlar daha genç koçların koyunlarla çiftleşmesini engelleyebilir. Genç, deneyimsiz koçlar, bir dişiyle ilk temaslarında genellikle tereddütle yaklaşırlar, cinsel organları keşfetmek için uzun zaman harcarlar, ereksiyonla aşım yaparlar, alçalırlar ve tekrar aşım yapma hareketleri ile garip davranırlar. Ereksiyon ve ejakülasyon nispeten

zayıftır ve ejakülat hacmi küçüktür. İlk ejakülasyondan sonra motor sistemler hızla düzenlenir ve normal çiftleşme verimliliğine ulaşılır (Hafez & Hafez, 2000).

Koç ırklarının çoğu yılın herhangi bir zamanında çiftleşebilme özelliği gösterse bile, koyunların üreme sezonu dışında eş zamanlı olarak koçların da sperma kalitesi ve libidosunda bozukluklar gözlenir (Abdel-Hafez et al., 2008). Bu nedenle, koyunlarda üreme sezonu dışında östrusu uyarmak için üreme yönetimi uygulamaları kullanıldığında ortalamanın üzerinde bir “koyun: koç” oranı gereklidir. Ayrıca, koyunların östrus senkronizasyonu yapıldığında, daha kısa sürede daha fazla koyunun çiftleştirilmesi için ortalamanın üzerinde bir “koyun: koç” oranı da gereklidir (Gouletsou & Fthenakis, 2010). Bu oran, sürüde kullanılacak koyunların koçların yaş durumuna bağlı olarak değişmekle birlikte oranın 1:30 ila 1:50 arasında tutulması faydalı bulunmaktadır (Ridler et al., 2012).

### **3.3. Genel Klinik Muayene**

Sağlık yönetimi ve muayene programları, hayvan sahiplerinin iş yükünü azaltarak patolojik durumların önlenmesi ve üretimin artırılmasını hedefler (Lacasta et al., 2015). İyi bir sağlık yönetimi programı, hastalık kaynaklı ekonomik kayıpları azaltır, üretimi artırarak çiftlik kapasitesini iyileştirir ve hastalıkların refah üzerindeki olumsuz etkilerini azaltır (Scott et al., 2007). Koçlar, cins ve yaşlarına göre muayene edilmelidir. Sağlık yönetimi programı uygulamasında üretim türü, hayvan cinsi, yönetim sistemi, iklim, üretim hedefleri, patolojik koşullar, tesisler ve insan kaynakları gibi çeşitli faktörler dikkate alınmalıdır (Caroprese et al., 2016). Koçlarda fiziksel kusurlar veya hastalıklar üreme kapasitesini etkiler. Sistemik hastalıklar spermatogenezisi bozarak fertilitiyi azaltabilir (Hedger, 2011).

Koçun yapısı ve yürüyüşü muayene sırasında önemlidir. Çiftleşme esnasında sağlam arka ayaklar hayati önem taşır ve topallık gibi yürüyüş bozuklukları koçu pasif hale getirip libidoyu düşürebilir (Gouletsou & Fthenakis, 2010). Arka ayak kusurları çiftleşme yeteneğini etkileyebilir ve uzamış ağrı stresi, kortikosteroid aracılı spermatogenezis bozukluğuna neden olabilir (Babic et al., 2011). Yaşlı bir koçta konformasyon hataları üreme başarısını etkileyebilir (Gouletsou & Fthenakis, 2010). Güneş ışınlarına maruz kalmak skrotal sıcaklığı artırarak koçların fertilitasını etkileyebilir (Júnior et al., 2015). Ağır yün kaplamalı cinslerde artan sıcaklık geçici infertiliteye yol açabilir (Shahat et al., 2021). Yaz sonu ve sonbahar başında yapılan kırımlar, yüksek sıcaklıkların fertilitate üzerindeki olumsuz etkilerini azaltabilir (Ott &

Memon, 1980). Skrotal yünün tamamının kesilmesi enfeksiyon riskini azaltarak koç sağlığını olumlu etkiler (Gouletsou & Fthenakis, 2015).

Sürüdeki erkek damızlık hayvanlar üreme performansı ve genetik gelişim için önemlidir. Libido, çiftleşme yeteneği, sperma kalitesi ve vücut kondisyonu skoru gibi faktörlere dikkat etmek gereklidir (Maurya et al., 2010). Düşük vücut kondisyonu skorları düşük üreme verimliliğiyle ilişkilidir (Kenyon et al., 2009). Üreme mevsiminin başında 3.0-3.5 arası vücut kondisyon skoru önerilir. Skoru 4'ün üzerinde olan koçların aşırı kilo almamasına dikkat edilmelidir (Kenyon et al., 2014). Skrotumda yağ birikmesi sperma kalitesini düşürebilir. Üreme mevsimi sonrası vücut kondisyonu genellikle düşer. Eğer vücut kondisyonu düşükse, üreme mevsimi dışında yüksek enerjili bir rasyon önerilir. Ancak düşük kaliteli yemle beslenen koçlar, normal çiftleşmeyi zorlaştırabilir (Maquivar et al., 2021).

Tür içi kavgalar, koçlar arasındaki sosyal dinamiklerin bir parçasıdır. Bu kavgalar, hiyerarşiyi belirleme ve çiftleşme ayrıcalıkları kazanma amaçlıdır. Kavga sırasında oluşan baş ve boyun yaralanmalarına, özellikle boynuz tabanındaki çatlaklara ve enfeksiyonlara karşı dikkat edilmelidir (Drake et al., 2016). Sürü içerisine sonradan katılan koçlar, bulaşıcı hastalıkların potansiyel kaynağı olabilir. Bu nedenle, sürüye katılmadan önce karantina ve biyogüvenlik önlemleri alınmalıdır. Önemli hastalıklar arasında Maedi-Visna (MV), koyun uyuzu (Akariasis), kazeöz lenfadenitis (Pseudotuberkülosis), bulaşıcı küçükbaş digital dermatitis (CODD) sayılabilir. Koçlar iç ve dış parazitlere karşı tedavi edilmelidir (Vipond & Greig, 2007). Bu amaçla aşılama, hayvanın antijene yeterli yanıt vermesini sağlamak için önemlidir (Lacasta et al., 2015).

### **3.4. Genital Organlarının Fiziksel ve Klinik Muayenesi**

Fiziksel muayene üreme organlarının özel olarak dikkate alındığı genel bir sağlık muayenesini içermelidir. Öncelikle testisler boyut, kıvam ve simetri açısından incelenmelidir. Kriptorşidizm, erkek hayvan yavrularında belirli bir sürede keselerine inmesi beklenen testislerden biri veya her ikisinin ya karın boşluğunda ya da inguinal kanal içerisinde kalması olgusudur ve koçlar arasında kriptorşidizm görülme sıklığı % 0,5 olarak bildirilmektedir (Amann & Veeramachaneni, 2007). Tek taraflı kriptorşidizm durumlarında hayvan fertil olabilir, ancak sonraki nesillere aktarımı ile mevcut sorunu şiddetlendirebilecekleri için damızlık hayvan olarak kullanılmamalıdır (Ott & Memon, 1980). Yine aynı şekilde epididimisin normal

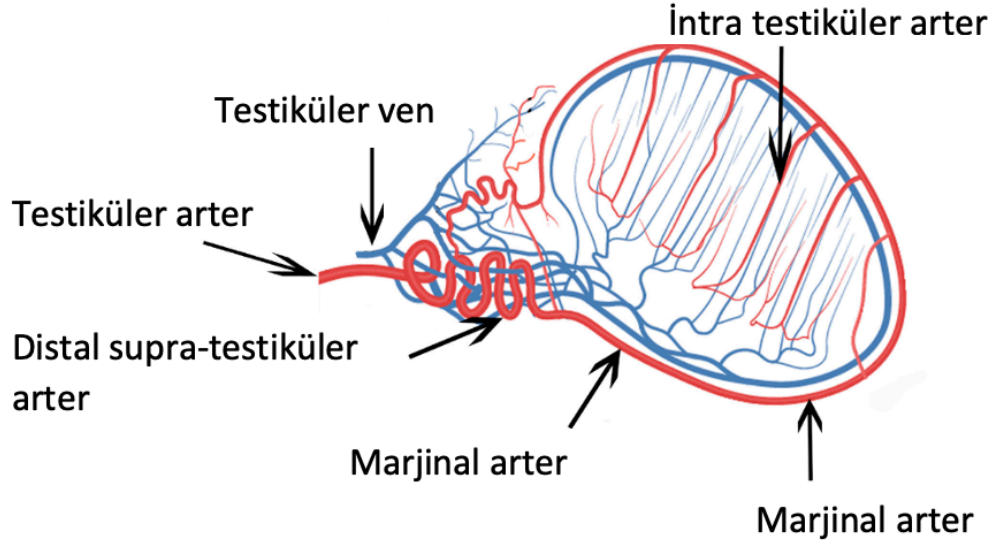
gelişimi için testisler incelenmelidir. Genellikle koçlarda *Brucella ovis* enfeksiyonunun bir sonucu olarak epididimitis gözlenir ve kauda epididimiste bir granülom veya yumru palpe edilebilir. Lezyonlar unilateral veya bilateral olabilirken bu durum epididimal kanalın tıkanmasına neden olur (Júnior et al., 2012). Testislerin kıvamı da önemlidir. Çok yumuşak olan testisler dejenere olabilirken, aşırı sert olan testisler fibrotik olabilir veya yaralanma veya bir hastalığın sonucu olabilir. Testisler simetrik olmalıdır. Sol ve sağ testislerin ve epididimislerin ağırlıkları ve hacimleri arasında önemli bir fark yoktur, bu da koç kuzularının testis büyümesinde yüksek derecede simetrik olması gerektiğini işaret eder. Simetri eksikliği genellikle bir patolojik bozukluğu gösterir (Ott & Memon, 1980). Prepisyum muayenesinde temiz olmalı ve herhangi bir ülseratif lezyon içermemelidir. Görülebilecek lezyonlar, ülseratif postit, ülseratif dermatoz, fimoz veya parafimoz gibi durumlardır. Son olarak penis muayenesinde penis uzatmalı ve herhangi bir anormallik veya yaralanma olup olmadığı incelenmelidir. Bir yaralanma veya enfeksiyon penis ve prepisyum arasında yapışıklıklara neden olarak penisin uzamasını engelleyebilir. Ülseratif dermatoz glans penisini tahrip edebilir ve koçlarda seksüel hissiyatı azaltabilir, bu da libido ve üreme başarısının düşmesine neden olur (Foster, 2016).

Yine aynı şekilde skrotal çevre ölçümü ve endokrin testler, çeşitli hayvan türlerinde testis disfonksiyonunu üreme kapasitesinin belirlenmesinde önemli parametrelerdendir. Yarney et al. (1990), testis boyutu ile spermatogenezis fonksiyonunun pozitif korelasyon içinde olduğunu ve testis boyutu daha büyük olan koç kuzularının altı aylıkken daha fazla günlük spermatozoon çıkışına sahip olduklarını ve koyunlarla daha sık çiftleştiklerini göstermişlerdir.

### **3.5. Genital Organlarının Ultrasonografik Muayenesi**

Ultrasonografik muayene, yumuşak dokuların iç yapısının anlık bir görüntüsünün elde edilmesi ve özellikle anormal testiküler yapıların ve epididimisin görselleştirilmesi ile klinik muayene için avantaj sağlamaktadır (Gouletsou et al., 2003). Testis kan kaynağını yalnızca böbreklerin yakınında aortadan ayrılan testiküler arter yoluyla alır (Şekil 3.1). Bu arter inguinal kanaldan geçer ve çoğu ruminant türünde spermatik kordonun post inguinal segmentinde çok kıvrımlı veya sarmal hale gelir. Testiküler arterin sarılma derecesi boğalarda (60-130 kıvrım), koçlarda (80 kıvrım) ve keçilerde (50 kıvrım) diğer hayvan türlerine (25 kıvrımdan az) kıyasla çok yüksektir (Samir et al., 2021). Testiküler arterin kıvrılma derecesi ve kalibresindeki

tür farklılıkları ve pampiniform pleksusun damarlarıyla ilişkisi, kısmen abdominal-testiküler sıcaklık gradyanlarındaki tür farklılıklarına bağlanabilir.

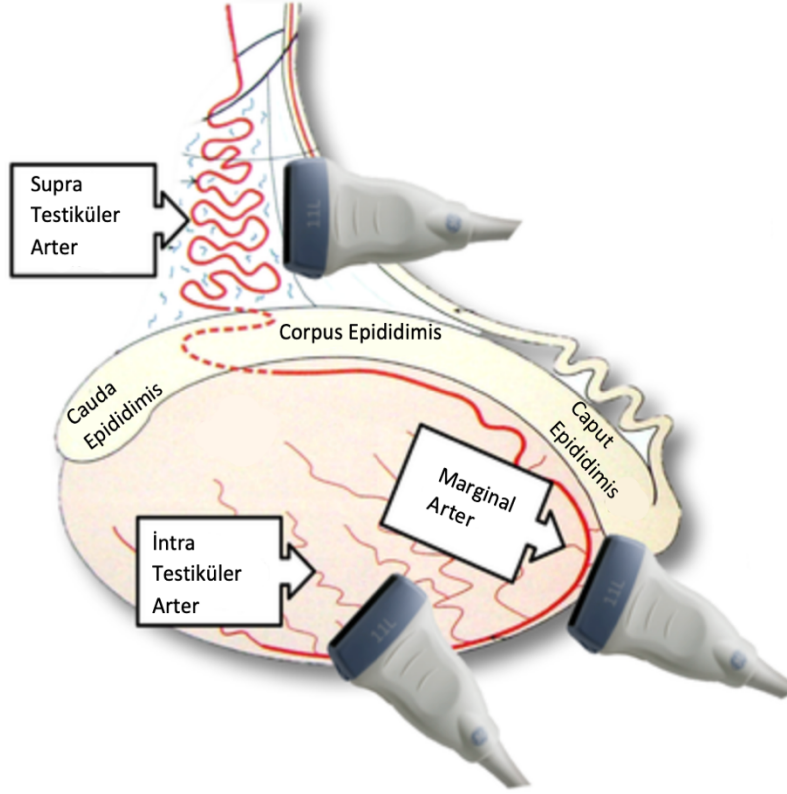


Şekil 3.1. Testisin vaskülarizasyonu (Venianaki et al., (2023)’den uyarlanmıştır)

Normal testis parankiminin tanımlanması için güvenli, non-invaziv bir teknik olduğundan ve testiküler biyometrik parametrelerin değerlendirilmesinde önemli bir araç olması sebebi ile üreme organlarının B-Mode ultrasonografik değerlendirmesine olan ilgi giderek artmaktadır ve rutin olarak kullanılmaktadır. B-mode ultrasonografi eko-doku değişikliklerinin saptanmasında kullanılan invaziv olmayan bir yöntemdir. Testis parankiminin ekojenitesi, gri tonlama düzeylerinin derecelenmesini yansıtan parametrelerin belirlenmesi ile değerlendirilmektedir. B-mode ultrasonografi ile koç da dahil olmak üzere birçok türde patolojik ve patolojik olmayan testis morfolojisi değerlendirilebilir (Ntemka et al., 2018). Ayrıca testisin ultrasonografik muayenesi doğrudan fertilité potansiyeli ile ilişkilendirilmektedir (Pinho et al., 2018; Boukhliq et al., 2018). Küçük ruminantlarda skrotum ve içeriğinin ultrasonografik muayenesi genellikle istenen derinliğe (skrotal kesenin boyutu ve içeriği) bağlı olarak 5 MHz veya 7,5 MHz'lik lineer dizili bir prob kullanılarak gerçekleştirilir. Yüksek frekanslı probalar ( $\geq 7,5$  MHz), lezyonlardan şüphelenilen belirli alanların incelenmesi için uygun olan yüksek çözünürlüklü ve daha ayrıntılı görüntülerin avantajlarını sunar (Crilly et al., 2017).

Testiküler arter, testisin kranialinde yer alan kıvrımlı ve vasküler koniyi oluşturan pleksus pampiniformis ile yakından ilişkili supra-testiküler arter (STA), tunika albugineayı geçen ve testisin kaudal kutbuna doğru uzunlamasına düzlemde

ilerleyen marjinal testiküler arter (MTA) ve testisin merkezine doğru yönelen intra-testiküler arterin (IA) dallarından oluşan karmaşık bir görünüme sahiptir (Şekil 3.2) (de Souza et al., 2015).



Şekil 3.2. Üç farklı konumda testiküler arter ve prob oryantasyonu (Ortiz-Rodriguez et al., (2017)' den uyarlanmıştır)

Seminifer tübüllerdeki yüksek metabolik aktivite, düşük oksijen ve düşük vasküler perfüzyon basınç ortamına uyarlanmıştır ve normal koşullar altında, lokal damar sistemindeki kan akışı ile testise yeterli miktarda besin ve oksijen sağlayabilir (Bergh et al., 2001).

Doppler ultrasonografi, çeşitli organların kanlanmasını değerlendirmek ve aynı zamanda çeşitli patolojik bozuklukların klinik değerlendirmeleri için tercih edilen bir yöntemdir. Testis torsiyonu, testisin bükülerek potansiyel olarak kendi kan akışını kestiği ciddi bir durumdur bu yöntem ile değişen kan akışı modellerini ortaya çıkararak bu durumun tespit edilmesine yardımcı olabilir (Goktas vd., 2017). Varikosel, erkek infertilitesi ile ilişkili olan, pampiniform pleksustaki damarların karakteristik anormal dilatasyonu ve kıvrımlılığı ile karakterize bir testis patolojik durumudur (Basioura et al., 2022). Bu durum testislerdeki kan akışını etkileyebilir ve fertilitenin potansiyel olarak etkilenmesine sebep olur (Tsili et al., 2017). Testis tümörlerinin Doppler ultrasonografi kullanılarak izlenmesi, tümör ve çevresindeki dokuların Doppler

ultrason ile testis içinde yerinin belirlenmesine ve boyutlarının ölçülmesine yardımcı olur. Aynı zamanda kötü huylu tümörler, iyi huylu tümörlere veya normal testis dokusuna kıyasla anormal ve kaotik bir kan akışına sahip olma eğilimindedir. Seri Doppler ultrason muayeneleri zaman içinde tümör içindeki kan akışı modellerinde meydana gelen değişikliklerin izlenmesi ile tümörün tedaviye verdiği yanıtın değerlendirilmesinde veya olası komplikasyonların belirlenmesinde yardımcı olabilir (Samir et al., 2021).

Genellikle TBF, testiküler arterlerin spektral akış Doppleri ile değerlendirilir. Doppler etkisi ilk olarak 1842'de Avusturyalı fizikçi Christian Johann Doppler tarafından tanımlanmıştır. Ultrason dalgaları kan hücreleri gibi hareketli yapılarla çarpıştığında, yansıyan dalgaların frekansı yayılan dalgalarınkinden farklıdır ve en iyi bilinen Doppler etkisini bu şekilde üretir. Bununla birlikte anatomi ve dinamik akış parametreleri ile ilgili verileri birleştirdiği için kan akışını tahmin etmenin en basit ve en kesin tekniklerinden biridir (Strina et al., 2016). Doppler değerlendirmesi, kan akış dağılımının ve dalga biçiminin daha ayrıntılı ve daha güçlü bir analizini ve sonuç olarak en yüksek sistolik hızı (PSV, cm / saniye), diyastol sonu hızı (EDV, cm / saniye) ve testiküler arterlerin Doppler indeksleri gibi birçok Doppler parametresini (pulsatilité indeksi, PI; direnç indeksi, RI) ortaya koymaktadır (Samir et al., 2021). Doppler indeksleri, yalnızca kan akış hızına değil, kan akışına vasküler empedans hakkında verdikleri daha hassas bilgiler nedeniyle, PSV ve EDV gibi diğer hız parametrelerine göre daha duyarlı TBF göstergeleri olarak kabul edilir (Pozor & McDonnell, 2004; Viana et al., 2013). İncelenen damarın RI ve PI değerleri, aşağı yönde dokunun kan akışı ile negatif korelasyon gösterir. RI ve PI değerleri arttığında, kan akışının vasküler direnci artar ve buna karşılık kan perfüzyonu azalır. Bu durumun tersi de geçerli olup ilgili organlara oksijen ve besin tedarikinde artışa yol açar (Hedia et al., 2019).

Artan PI ve RI değerleri, genellikle damar içi daralma veya tıkanma gibi durumlarda gözlemlenir. Bu tür bir durumda, kanın geçişi için daha fazla kuvvet uygulanması gerektiğinden PI ve RI değerleri yükselir. Azalan PI ve RI değerleri ise genellikle damarların daha açık olduğu ve kanın daha kolay akabildiği durumları gösterir. Örneğin, organlara giden damarlar genellikle daha düşük dirence sahiptir ve böylece daha sürekli bir kan akışı sağlanır. Ayrıca, PI ve RI değerlerindeki dalgalanmalar, kan basıncındaki değişiklikler, vasküler tonusun değişmesi veya kalp debisindeki dalgalanmalar gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir (Oglat et al., 2018).

Önceki çalışmalar, TBF'nin çeşitli üreme bozukluklarının teşhisinde ve erkeklerin üreme potansiyelinin değerlendirilmesinde önemini ortaya koymuştur (de Brito et al., 2015; Ribeiro et al., 2020). TBF'nin değerlendirilmesine yönelik çeşitli yöntemlerden biri olan Renkli Doppler ultrasonografi invaziv olmama, yüksek oranda doğruluk ve sonuçların hızla elde edilmesi gibi avantajlara sahiptir (Pozor et al., 2014). TBF'yi Renkli Doppler ultrasonografi ile değerlendirirken incelemeler sırasında hayvanların uygun şekilde zapt edilmesini sağlamak çok önemlidir. Daha büyük hayvanlar ayakta incelenir ve bir destek veya travay ile sabitlenmelidirler. Küçük hayvanlar ve küçük geviş getirenler ayakta veya yaslanmış pozisyonlarda muayene edilebilir (Samir et al., 2021).

Renkli Doppler ultrasonografi teknolojisinin hayvan üreme pratiğinde kullanılmasının bazı dezavantajları olabilir. Bu yöntemin pratik uygulamaları ve taşınabilir cihazların maliyet etkinliği gibi konularda, pratisyenlerin üreme işlevlerini değerlendirmek için potansiyel uygulamaları hakkında yeterli bilgi eksikliği bulunmaktadır. Dolayısıyla ileri teknolojik gelişmelerin katkısı ile çiftlik hayvanlarında renkli Doppler ultrasonografinin pratik uygulamalarını geliştirebileceği düşünülmektedir (Viana et al., 2013).

### **3.6. Libido Değerlendirmesi**

Koyun sürülerinin üreme performanslarında koçların cinsel aktivite düşüklüğü olası engelleyici faktörden biri olarak görülmektedir. Erkek çiftlik hayvanlarında libido potansiyel eşleri arama, onlara yakın kalma davranışları, çiftleşme öncesi sergiledikleri davranışlar ve çiftleşme davranışlarına giriş sıklıkları gözlem yoluyla kaydedilerek nicel olarak değerlendirilebilir. (Price et al., 1992). Her bir koçun değerlendirilmesi en az 30 dakikalık gözlemler gerektirir ve bu gözlemlerin varyasyon faktörlerini hesaba katmak için en az altı kez tekrarlanması gerekir (Stellflug & Berardinelli, 2002). Koçların çiftleşme davranış performansındaki istikrar ile yani çiftleşme ve çiftleşme öncesi davranışlar arasındaki yüksek korelasyonlar nedeniyle sürüdeki koyunlara atlama sayısının otomatik olarak kaydedilmesi bireysel olarak koçların libidolarının tahminine imkân sağlar (Alhamada et al., 2017). Libido değerlendirmeleri, özellikle koçun fizyolojik üreme mevsimi dışında yapıldığında veya genç koçlar değerlendirildiğinde zaman alıcı, maliyetli ve genellikle güvenilir değildir. Bu nedenlerle üreme kapasitesinin değerlendirilmesi için libido değerlendirmesi rutin olarak yapılmamaktadır (Ley et al., 1990).

## 4. KOÇLARDA ÜREMENİN DENETLENMESİ

Islah programlarında üretim etkinliğinin ve genetik seçilimin belirleyicisi olarak üremenin merkezi rolü göz önüne alındığında, üreme teknolojilerindeki gelişmeler dünya nüfusundaki artışın yarattığı zorluklarla yüzleşmek için çok önemli hale gelmektedir (Velasco & Ruiz, 2020). Mevsimsel üreme davranışı ile net bir yavrulama dönemine girilmesi ve hayvanların sağlanması durumunda mevsimsel olarak süt veriminde bir artış sağlanır. Bu durum, et ya da süt talebinin en yüksek olduğu dönemlerde (ilkbaharın sonundan erken sonbahara) fiyatların düşük olduğu mevsimsel bir ürün modeline olanak sağlar. Üreticilerin karlı bir işletmecilikte mevsim dışı hayvansal ürünler üretebilmesi ile mevsimsel anöstrus döneminde östrus sikluslarının tetiklenerek kış aylarında bu talepler için daha yüksek fiyatlardan yararlanılabilir (Abecia et al., 2012).

### 4.1. Doğal Üreme

Koçların üreme mevsimi boyunca koyunlarla doğal olarak çiftleşmesine izin vermek en yaygın üreme kontrolü yöntemidir. Bu süreçte, sağlıklı ve cinsel açıdan olgun bir koç dişi koyunlar olan bir grup koyunların arasında katılır. Amaç çiftleşmeyi ve ardından gebe kalmayı kolaylaştırmaktır. Sürüyü çoğaltmak ve genişletmek için yaygın olarak kullanılan bu yöntemde üreme mevsiminin ve koç-koyun oranının dikkatli bir şekilde yönetilmesini gerektirir (Ridler et al., 2012). Bir koçun üreme döngüsü tipik olarak ırka ve coğrafi konuma bağlı olarak değişkenlik gösterir (Batissaco et al., 2013). Bu süre zarfında koç huzursuzluk, ses çıkarma ve koyunlara karşı artan ilgi gibi artan cinsel aktivite belirtileri gösterir. Koçların gözlerinin yakınında bulunan ve '*Vomero-nazal*' adı verilen özel organ, kızgınlık dönemindeki koyunlar tarafından salınan feromonları tespit etmelerine yardımcı olur. Feromonlar organizmalar arası kimyasal sinyaller olarak işlev görür ve genellikle cinsel çekiciliği düzenleme amacı taşırlar. Dişi koyunlar östrus dönemlerinde belirli feromonları salgırlar. Bu feromonlar, erkek koçlarda çiftleşme isteğini artırarak üreme sürecini etkiler. Feromonlar ayrıca sürü içi iletişimi kolaylaştırarak özellikle dişi koyunların çiftleşme niyetlerini diğer bireylere iletmelerini sağlar. Bununla birlikte feromonlar sürü içindeki sosyal hiyerarşiyi belirlemeye de yardımcı olur ve özellikle erkek koçlar arasındaki sıralamayı etkiler. (Ungerfeld et al., 2006). Koçlar kızgınlık dönemindeki bir koyunu tespit ettiğinde onun dikkatini çekmek ve kabulünü sağlamak için dürtme,

koklama veya ses çıkarma gibi kur davranışları sergileyebilir. Koyun kabul ettiğinde, koç ona arkadan biner ve onunla çiftleşir (Simitzis et al., 2006).

Doğal üreme yöntemi ile koçların aşırı kullanmaktan kaçınmak ve zaman içinde doğurganlıklarını korumak için dönüşümlü bir yetiştirme sisteminin kullanılması sürünün geleceği için önemlidir (Beltman, 2013). Üreme sezonu boyunca farklı zamanlarda farklı koçların dahil edilmesi koçların çiftleşme dönemleri arasında dinlenmelerine ve toparlanmalarına izin verir (Ridler et al., 2012).

#### **4.2. Suni Tohumlama**

Suni tohumlama koyun yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Seçilen bir koçtan spermaların toplanarak elde edilen genetik materyalin kullanılmasına ve bunu daha fazla sayıda dişiye dağıtılmasına olanak tanır. Bu sayede daha iyi süt verimi, et kalitesi, hastalıklara dayanıklılık gibi arzu edilen özelliklere sahip koyun ve keçi ırklarının üretimi mümkün olur. Bu yöntem, istenmeyen genetik özellikleri minimize ederek, hayvanların üretkenliğini ve verimliliğini artırmakla birlikte aynı zamanda cinsel yolla bulaşma riski olan hastalıklarında önlenmesine katkı sağlamaktadır. Suni tohumlama çiftleşmenin doğal döngüsüne bağlı olmadığı için, çiftleşme sürecini daha iyi kontrol eder ve takip eder. Bu da hayvanların daha hızlı bir şekilde gebe kalmasını sağlar. Bu yöntemin en büyük avantajlarından biri de bir koç ile birden fazla koyunun tohumlanması mümkün olması ve böylece üreme verimliliği artırılmasıdır. Bu yöntem ile birden fazla koçu ve koyunu doğal çiftleşme için aynı alanda tutma ihtiyacı ortadan kalkarak hem zaman hem de mekân tasarrufu sağlanır. Aynı zamanda üreme ve yetiştirme işlemlerinde daha etkili ve verimli bir yönetim sağlanır (Faigl et al., 2012; Gibbons et al., 2019).

#### **4.3. Üreme Sezonu Planlaması**

Küçükbaş hayvanların üremesi son yıllarda geliştirilen çeşitli yöntemlerle kontrol edilebilmektedir. Bunlardan bazıları seksüel siklus içerisinde yer alan ve fizyolojik olaylar zincirini değiştiren hormonların verilmesini içerir. Progesteron veya progesteron benzeri maddelerin kullanıldığı yöntemler, bir dişi hayvanın ovulasyondan sonra oluşan ve hipofiz bezinden LH salgılanmasını kontrol eden korpus luteum adı verilen yapı tarafından üretilen doğal progesteronun etkilerini artırarak döngünün luteal fazındaki etkilere dayanır (Abecia et al., 2012). Prostaglandinlerin kullanımı korpus luteumu elimine ederek ve ovulasyon ile sonuçlanacak bir foliküler

fazı indükleyerek üremeyi kontrol etmek için alternatif bir yöntem olarak kullanılır (Letelier et al., 2011). Son olarak fotoperiyoda bağlı olarak üreme davranışı gösteren hayvanlarda melatonin üremeyi kontrol etmek için yeni bir metodoloji açarak ve yıllık üreme modelinde değişikliklere neden olmuştur (Abecia et al., 2012).

#### **4.4. Fotoperiyot**

Fotoperiyot ya da 24 saatlik bir periyotta aydınlık ve karanlık süresi koçlar da dahil olmak üzere birçok hayvanın üreme fizyolojisinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Lincoln & Clarke, 1994). Bu olay üreme davranışlarını, hormonal düzenlerini ve nihayetinde üreme yeteneklerini etkiler. Koçlar, genellikle doğal olarak belirli bir mevsimde çiftleşme eğilimindedirler ve üreme faaliyetleri yıl boyunca değişen fotoperiyottan etkilenir (Perkins & Roselli, 2007). Memelilerde ortamdaki fotoperiyot retina, suprakiazmatik çekirdek (ana sirkadiyen saatin merkezi) ve epifiz bezinden oluşan bir fotonöroendokrin sistem tarafından algılanır. Melatonin gün uzunluğu bilgisinin tüm organizmaya ve özellikle Hipotalamus-Hipofiz-Gonad (HPG) eksenine iletilmesinde merkezi bir rol oynamaktadır.

Fotoperiyodun uzaması ile melatonin salgılanma düzeyi düşmekteyken daha kısa süreli fotoperiyot ile melatonin aktivitesi artmaktadır (Bhattacharya et al., 2019). Işık sinyali retinanın fotoreseptörleri tarafından algılanması ile retino-hipotalamik lifler, üst kiyazmatik çekirdekler, hipotalamus pineal lifleri ve periferik sempatik sinir sistemi içeren nöronların bağlantısı ile gözlerden epifiz bezine aktarılarak melatoninin sentezi ve sekresyonuna öncülük eder (Frungieri et al., 2017). Günlerin kısılması ile azalan gün ışığı melatonin salgılanma süresini artırır. Melatonin de koçlarda sperma üretimi ve olgunlaşması için gerekli olan LH ve FSH gibi üreme hormonlarının hipofiz bezinden salgılanmasını etkiler (Thiéry et al, 2002).

## **5. ÜREME KAPASİTESİNİN ARTIRILMASINDA ETKİLİ FAKTÖRLER**

### **5.1. Stres Yönetimi**

Stresin çeşitli fizyolojik ve davranışsal süreçleri bozduğu bilinmektedir bu da fertilitenin ve üreme performansının azalmasına neden olabilir. Stres kaynaklı olarak koçlarda libido veya cinsel istekte azalmaya yol açar. Bu durum çiftleşmeye daha az ilgi göstermesine, daha az çiftleşme girişimine ve başarılı çiftleşme şansının azalmasına yol açabilir (Tilbrook & Cameron, 1990). Aynı zamanda stres vücudun strese tepki sistemini harekete geçirerek kortizol de dahil olmak üzere hormon seviyelerinde dalgalanmalara neden olabilir. Artan kortizol seviyeleri testosteron, LH ve FSH gibi üreme hormonlarını olumsuz etkileyerek normal üreme fonksiyonu için gerekli hormonal dengeyi bozabilir. Bu durum spermatozoon üretimini ve olgunlaşmasını bozarak sperma kalitesinde düşüşe neden olabilir. Bu sebeple stres faktörlerini en aza indirmek, rahat ve sakin bir ortam sağlamak, doğru beslenmeyi sürdürmek ve yeterli dinlenme sağlamak, stresin koç üremesi üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için kullanılabilecek üreme stratejilerinden bazılarıdır (Córdova-Izquierdo et al., 2014).

### **5.2. Beslenme Manipülasyonları**

Beslenme üreme süreçlerinde önemli bir rol oynar ve üreme sezonu dışında da dikkate alınması gereken önemli bir husustur. Birçok durumda kaba yem tek başına damızlık olarak kullanılmak üzere yetiştirilen kuzular için yeterli bir besin kaynağı değildir. Özellikle koçlar koyunların arasına karıştırıldıktan sonra yem alımları azalır ve dişiler ile çiftleşmek için çok fazla enerji harcarlar. Birçok koçta çevresel faktörler ve yılın o döneminde genellikle düşük kalitede olan mera miktarı ve kalitesi nedeniyle üreme sezonu boyunca vücut ağırlığını ve vücut kondisyon skorunda düşüşler görülecektir. Buna ek olarak, kızgın bir koyun bulmak için cinsel davranışlara harcanan zaman, yemleme için mevcut zaman miktarını azaltır (Martin et al., 2004; Maquivar et al., 2021). Karbonhidrat, protein ve nükleik asit metabolizması ve bunların eksikliği erkek hayvanlarda spermatogenezi ve libidoyu bozabilir (Kheradmand et al., 2006). Ayrıca beslenme seviyesinin veya enerji alımının azalması karaciğerdeki kan akışının azalmasıyla ilişkilidir. Bu durum steroid hormon metabolizmasında azalmaya ve dolayısıyla dolaşımdaki steroid konsantrasyonlarının

artmasına neden olur. Artan steroid konsantrasyonları, üreme fizyolojisi ve fertilité üzerine olumsuz etkilere sebebiyet vermektedir (Swelum et al., 2017).

Koçlarda beslenme rejiminin değışmesi yalnızca testis dokusunun toplam miktarının artışıını değıl aynı zamanda bu doku tarafından üretilen gametlerin verimliliğini de pozitif yönde değıştirir. Ejaküle edilen sperma konsantrasyonu beslenme değışikliğinden sonra 7 hafta kadar etkilenmez. Bu durum beslenmenin spermatogenezis verimliliğı üzerindeki etkilerini son spermatogonial bölünmeden sonra ortaya çıkardığını göstermektedir (Martin et al., 2004). Erkek hayvanlarda yüksek enerji alımı spermatogenezise katkıda bulunur ve çiftleşme sırasında cinsel davranışları desteklemek için gerekli enerji rezervleri sağlar (Blache & Martin, 2009). Flushing olarak adlandırılan besleme ve bakım yönetimi ile üreme mevsimi öncesinde beslenme düzleminde geçici bir artışın gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Enerji ve protein mevcudiyetinin artırılması koçlarda üreme verimliliğini artırır ve koçlar çiftleşmeden 4-6 hafta önce ve çiftleşme sırasında ‘flushing’ programına alınmalıdırlar (Allaoui et al., 2018). Koçların yeterli sperma kalitesi için çinko, selenyum ve kobalta yüksek gereksinimi vardır. Özellikle erkek hayvanların üremesinde selenyum eksikliklerine ek olarak E vitaminin eksiklikleri testis dokularının dejenerasyonuna neden olabilir ve bunların antioksidan etkisi, prostaglandin sentezi ve büyüme metabolizmasındaki rolleri sebebiyle eksiklikleri spermatogenezisin aşamalarında sorunlara yol açabilir (Maquivar et al., 2021).

### **5.3. Uygun Genetik Karakterlerin/Bireylerin Seçimi**

Damızlık koçların genetik seçimi sürünün genel kalitesini ve verimliliğini artırmada önemli bir rol oynar. Etkili genetik seleksiyon koyunlarda büyüme hızı, üreme verimliliğı, hastalıklara karşı direnç ve yüksek kaliteli yün veya et üretimi gibi arzu edilen özelliklerin geliştirilmesine yardımcı olur (Gootwine, 2020). Damızlık koçları genetik olarak seçerken göz önünde bulundurulması gereken en önemli faktörlerden bir tanesi üretim hedeflerinin belirlenmesidir. Koyun sürüsünde ulaşılacak istenen hedefin belirlenmesi genetik açıdan üstün koçların seçilmesini daha kolay hale getirmektedir (Wilson & Morrical, 1991). Bu amaç ile koçların pedigree ve performans kayıtları incelenmektedir. Performans kayıtları büyüme oranları, vücut ağırlığı, yapağı kalitesi, üreme oranları ve diğer ilgili özellikler hakkındaki verileri içermektedir. Özellikle verim özelliklerinden bazıları diğerlerine göre daha kalıtsaldır ve yavrulara geçme olasılıkları daha yüksektir. Bu sebeple sürüye katılacak koçun gelecek nesil

üzerinde daha önemli bir etkiye sahip olacağından ötürü kalıtsallığı daha yüksek olan özelliklere odaklanması gerekmektedir (Bishop, 2015).

#### **5.4. Spermanın Uygun Koşullarda Muhafazası**

Koyun yetiştiriciliğinde üremenin optimizasyonunun sağlanmasında birçok yardımcı üreme teknikleri kullanılmaktadır. Bu tekniklerin başarısı esas olarak sperma kalitesine bağlıdır ve bu da işleme ve sulandırıcıların spermatozoonların ultrastrüktürel, biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini koruma yeteneğine bağlıdır (Kameni et al., 2021). Yirminci yüzyılda çiftlik hayvanlarında suni tohumlama programlarının gelişmesiyle birlikte, spermanın toplandığı noktadan tohumlama alanına taşınması ve çok sayıda dişiye uzun süreler boyunca veya yılın farklı zamanlarında tohumlama yapılabilmesi için spermanın uygun koşullar altında korunması gerekmektedir. Bu amaçla spermatozoonların metabolizmasını azaltarak fertilite ömrünü uzatan yöntemler kullanılmaktadır. Koç spermasının taze ve dondurulmuş halde uzun süreler saklanması çeşitli sulandırıcı formülasyonları ve kriyoprotektan maddelerin kullanımı ile mümkün olabilmektedir.

Spermanın depolanması spermatozoonların metabolizmasını azaltan veya durduran ve böylece fertilite ömrünü uzatan yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla koç spermasının taze halde kısa süreli olarak saklanması kullanılabilecek yöntemlerden birisidir ve bu yöntem ile sperma geri dönüşümlü inaktivasyon yoluyla düşük ortam sıcaklıklarında (0-5°C veya 10-15°C) depolanmaktadır (Salamon & Maxwell, 2000). Spermanın kısa süreli olarak saklanması ile spermatozoonların metabolizma hızı azaltılarak spermatozoonların yaşam sürelerinin uzatılması hedeflenmektedir. Ancak depolama süresinin uzaması ile sperma kalitesi ve fertilite yeteneğinde azalmalar gözlenebilir. Kısa süreli saklama yöntemi ile ilişkili zararlı etkileri en aza indirmek için optimum bir sperma sulandırıcı kullanımı spermatozoonlar için uygun ozmotik basınç, pH ve tamponlama kapasitesine sahip bir sulandırıcı kullanımı gereklidir. Bu sulandırıcı aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu önlemeli ve/veya temizlemelidir. Oksidatif stresin neden olduğu bozulmuş hücre fonksiyonları kademeli olarak spermatozoon canlılığını, morfolojik ve akrozom bütünlüğü ve diğer bazı spermatolojik parametrelerinin azalmasına neden olur. Sonuçta fertilite oranının düşmesine ve bunun sonucunda üretimin azalmasına yol açar (Gündoğan vd., 2010).

Dondurma-çözdürme sonrasında spermatozoonun başarılı bir şekilde korunması, sulandırıcının türü ve bileşimi, kriyoprotektan ekleme yöntemi ve konsantrasyonu, dondurma öncesi sulandırma ve spermanın işlenmesi, dondurma ve çözdürme protokolleri gibi bir dizi etkileşimli faktörlere bağlıdır (Salamon & Maxwell, 2000). Koç spermatozoon membranları yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) içermesinden dolayı dondurma ve çözme işlemi sırasında oksidatif strese karşı hassastır (Kameni et al., 2021). Kriyoprezervasyon spermatozoon canlılığını ve fertilitasını engelleyen serbest radikallerin etkisi gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal etkilere maruz bırakır. Ayrıca küçük sitoplazmik boyutları nedeniyle spermatozoonların antioksidan rezervi çok azdır ve genellikle kriyoprezervasyon sırasında oluşan kayda değer oksidatif streslerin üstesinden gelmek için yeterli değildir (Toker vd., 2016). Oksidatif stresin zararlı etkilerinden kaçınmak için antioksidanlar çok uzun yıllardır çalışmalara konu olmaktadır ve hala güncelliğini korumaktadır (Bucak vd., 2007).

### **5.5. Melatonin Etki Mekanizması ve Melatonin Uygulamaları**

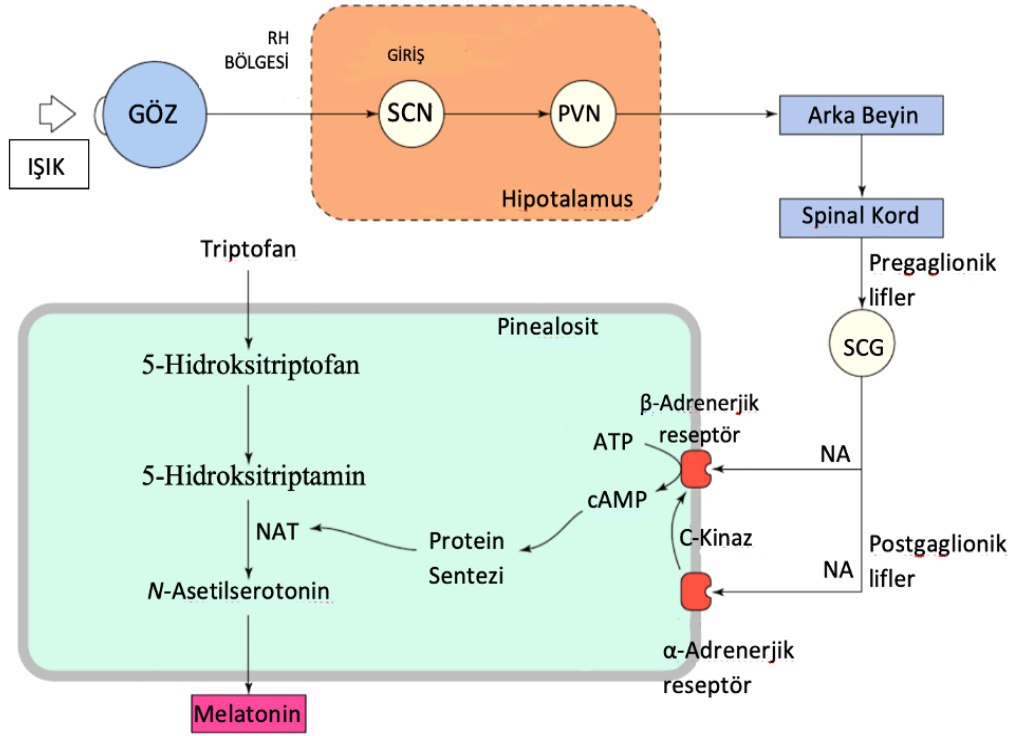
Lerner et al. (1958) tarafından melatoninin keşfi, üremenin mevsimselliği alanında yeni bir araştırma alanı açtı. Aslında hormonun keşfinden sonraki ilk 40 yılda melatonin ve epifiz bezi ile ilgili araştırmaların çoğu bu hormonun fotoperiyoda bağımlı üreyen hayvanlarda üremeyi düzenleme özellikleriyle ilgili olmuştur. Melatonin GnRH salgısını dolaylı olarak dopaminerjik, serotoninerjik ve uyarıcı aminoasiderjik nöronları içeren bir nöral devre aracılığıyla modüle etmektedir. 1993 yılında Tan et al. (1993) melatoninin yüksek reaktif hidroksil radikalini (OH) in vitro olarak detoksifiye edebildiğini keşfetmiş ve melatoninin doğrudan bir serbest radikal temizleyici olarak hareket ettiğini kanıtlamışlardır. Buna ilaveten eksojen melatonin uygulamasının özellikle üreme sezonu dışında bulunan koçlarda sperma kalitesini artırdığı da bilinmektedir (Succu et al, 2011). Melatonin etki mekanizması karmaşık olmakla birlikte hücre plazma zarını geçerek etkilerini vücudun tüm bölümlerinde gösterebildiği için memelilerde çok sayıda etkiye sahip bir hormon olarak nitelendirilmektedir (Cebrián-Pérez et al., 2014).

### **5.5.1. Melatonin Reseptörlerinin Lokalizasyonu**

Fotoperiyodik olmayan hayvanlar da dahil olmak üzere bugüne kadar incelenen türlerde adenohipofizin pars tuberalisi melatonin için yüksek bağlanma özelliği gösterir. Dolayısıyla, pars tuberalisin yüksek yoğunlukta melatonin reseptörü içermesi, türler arasındaki tek ortak bağlanma bölgesi olması ve hipotalamus ile hipofiz arasındaki bağlantı noktasında bulunması, pars tuberalisi mevsimsel üremeyi etkilemek için melatoninin en uygun etki bölgesi haline getirmiştir (Malpoux et al.,1996). Genel olarak melatonin etkilerini GPR'ler aracılığıyla göstermektedir. Bu reseptörler hipotalamusun üst kiyazmatik çekirdeğinde ve hipofizin pars tuberalisinde eksprese edilen Melatonerjik tip 1 (MT1) reseptörleri, esas olarak beyinde ve retinada bulunan Melatonerjik tip 2 (MT2) reseptörleri ve memelilerde eksprese edilmeyen ancak balıklarda, amfibilerde, kuşlarda ve tavuklarda bulunan Melatonerjik tip 3 (MT3) reseptörleridir (Frungeri et al., 2017).

### **5.5.2. Melatoninin Salgılanma Mekanizması**

Pineal bez tarafından sentezlenen melatonin (MLT; N-asetil-5-metoksitriptamin), mevsimsel üreme özelliği gösteren hayvanların gün boyu ışık değişikliklerini algılamasını sağlayan kimyasal bir hormondur (Faigl et al., 2009). Melatonin triptofan aminoasitinden triptofan-5-hidroksilaz enzimi aracılığıyla 5-hidroksilasyon yoluyla 5-hidroksitriptofana, aromatik aminoasit dekarboksilaz tarafından dekarboksilasyon yolu ile 5-hidroksitriptamine (serotonin), N-asetil transferaz tarafından N-asetilasyon yoluyla N-asetilserotonine (NAT) ve Hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) tarafından O-metilasyonu ile melatonine (N-asetil-5-metoksitriptamin) sentezlenir. Bu sentetik yolun temel özelliği ritmik olmasıdır. Özellikle NAT enziminin aktivitesi geceleri 30 kattan 70 kata kadar artar ve çoğu durumda melatonin sentezinde hız sınırlayıcıdır (Şekil 5.1.) (Arendt, 1998)



Şekil 5.1. Melatonin sentezindeki ana kontrol mekanizmalarının diyagramı. Ritim suprakiazmatik çekirdekte (SCN) üretilir ve retino-hipotalamik yol (RH yolu) aracılığıyla ışık tarafından yönlendirilir. Sinyal paraventriküler çekirdek (PVN, bazı tartışmalar olsa da), arka beyin, omurilik, superior servikal ganglion (SCG) üzerinden pineal noradrenerjik (NA) reseptörlere geçer. Çoğu durumda melatonin sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan serotonin N-asetiltransferaz (NAT), noradrenerjik uyarım yoluyla karanlık faz sırasında 30-70 kat artar (Arendt, (1998)'dan uyarlanmıştır)

### 5.5.3. Melatoninin Etki Mekanizması

Erkek fertilitesi ve spermatogenezis süreci büyük ölçüde Sertoli hücrelerinin işlevine bağlı olarak gerçekleşmektedir ve tüm bu süreçlerde melatonin germ hücrelerinin spermatidlere kadar gelişiminde önemli bir modülatör olarak görev almaktadır (Frungieri et al., 2017). Ayrıca melatonin seminal plazmada da bulunması sebebiyle spermatozoonların kalitesi üzerine doğrudan bir etki gösterir. Koçlarda mevsimsel olarak gerçekleşen hormonal değişiklikler seminal plazmada yansımaktadır. Seminal plazmadaki melatonin, testosteron ve antioksidan enzimlerin düzeylerindeki değişiklikler üreme mevsimi boyunca daha yüksek seviyelerde olduğu bildirilmektedir (Cebrián-Pérez et al., 2014). Melatoninin etkileri birçok seviyede meydana gelmesine ve vücudun farklı bölgelerinde melatonin reseptörleri tanımlanmış olmasına rağmen mevsime bağlı üreme özelliği gösteren hayvanlarda fotoperiyodik algıyı değiştiren ana mekanizma Hipotalamus-Hipofiz-Gonadal (HPG) seviyesinde gerçekleşir (Abecia et al., 2012). Melatonin, HPG ilişkili hormonların salgılanmasını düzenleyerek GnRH ve ardından da LH ve FSH salgılanmasını düzenler. Ancak melatoninin GnRH regülasyon mekanizması hala belirsizdir (Yu et al., 2018).

#### 5.5.4. Melatonin ve Kisspeptin İlişkisi

Kisspeptinler (Kp), melatoninin sinyallerini taşımada görev alan ve salgılanması *KISS1* geni tarafından düzenlenen bir nöropeptit olup GnRH'nin pulsatil salımının güçlü uyarıcıları olarak katkısı bulunmaktadır (Bhattacharya et al., 2019). *KISS1* geni 1996 yılında keşfedilmiştir. Galanin reseptörü 2'yi kodlayan gen ile kisspeptin reseptörü olan *KISS1R*'yi kodlayan gen 2001 yılında tanımlanmasına rağmen reseptörün üreme fizyologlarının dikkatini çekmesi 2003 yılına kadar gerçekleşmemiştir. Kisspeptinlerin tüm üyeleri 2001 yılında üç farklı grup tarafından bağımsız olarak GPR54'ün (AXOR12 veya hOT7T175 olarak da bilinir) güçlü agonistleri olarak tanımlanmıştır. O dönemde tüm çabalar kisspeptinlerin hücre çoğalmasını etkilemeden tümör metastazını nasıl baskıladığını anlamaya yönelik olmuştur. 2003 yılının sonlarında kisspeptinlerin GPR54'ün inaktive edici mutasyonlarını sırasıyla insan ve farede idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH) ile ilişkilendiren iki bağımsız çalışma ile pubertanın önemli bir uyarıcısı olarak işlev gördüğü anlaşılmıştır (Seminara et al., 2003; Li et al., 2009).

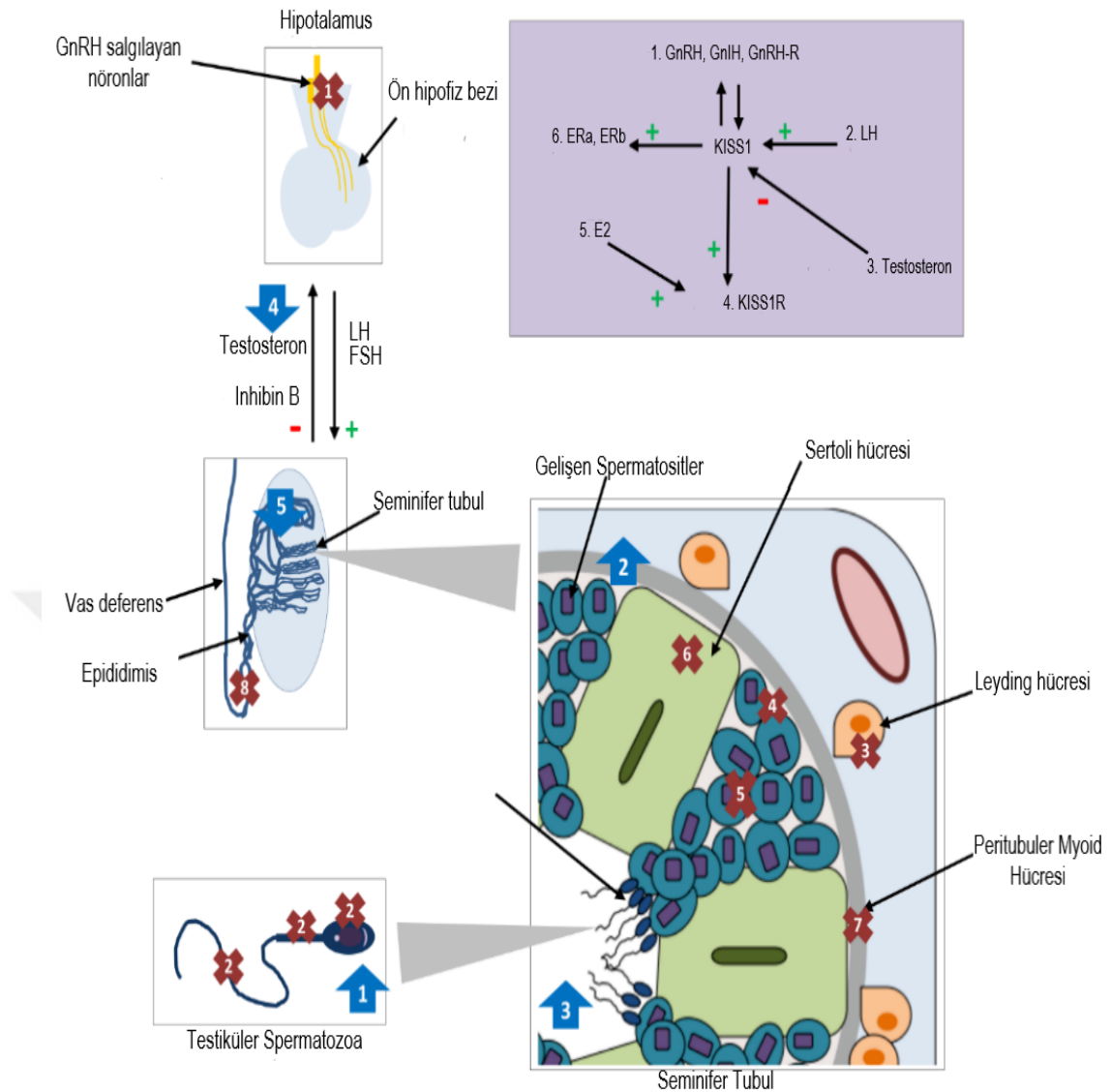
Hipotalamusta iki ana Kp nöron popülasyonu tanımlanmıştır. Bunlardan biri preoptik alan (POA) bölgesinde ve diğeri arkuat çekirdekte (ARC) olanıdır. Kisspeptinler küçükbaş hayvanlarda ARC preoptik alandaki nöronlar tarafından üretilir. Çalışmalar *KISS1* geninin küçükbaş hayvanların preoptik bölgesindeki GnRH pozitif hücrelerde eksprese olduğunu göstermiştir bu da *KISS1* geninin ve GnRH'nin hipofiz bezi üzerinde etkili olmak için hipofiz portal kanına birlikte salgılanabileceğini düşündürmüştür (Pompolo et al., 2006; Beltramo et al., 2020). ARC'de kisspeptin üreten hücreler aynı zamanda nörokinin B ve dynorphin de üretir ve GnRH nöronlarına seks-steroid negatif feed back sinyalleri iletir. GnRH nöronlarının birçok düzenleyicisi GPCR'ler aracılığıyla hareket eder ve pubertanın başlangıcının kontrolünde önemli rol oynarlar (Li et al., 2011). GPR54'ler başlangıçta sıçan beyninden klonlanmış olan G proteinine bağlı reseptörlerin rodopsin ailesinin bir üyesidir. Kisspeptin reseptörü (*KISS1R*), üreme fonksiyonunun nöroendokrin kontrolünde en önemli GPCR'lerden biridir ve ligand kisspeptin hipotalamus üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bununla birlikte, periferik üreme dokularında *KISS1* ve *KISS1R* gen ekspresyonu kisspeptin sinyalinin bu dokulardaki üremenin yerel düzenlenmesinde rol oynadığını düşündürmektedir (Cao et al., 2019). Bununla birlikte GPR54 mRNA'ları hem hipotalamus içinde hem de hipotalamus dışındaki bir dizi limbik yapıların başka

alanlarda bulunması ile kisspeptinler için GnRH salgılanmasını düzenlemenin yanı sıra ek roller önermektedir (Revel et al., 2007; Oakley et al., 2009).

*KISS1* geni ilk olarak kanser hücrelerinin metastazını inhibe ettiği keşfedilmiştir ve daha sonra plasentada yoğun bir şekilde ifade edildiği belirlenmiştir. O zamandan beri, *KISS1* gen ekspresyonunun matriks metalloproteinazların aktivitesini aşağı doğru düzenlediği gösterilmiş olup, bunun *KISS1* geninin kanser metastazını baskılayan mekanizma olduğu bildirilmiştir (Makri et al., 2008). Kuş türleri hariç kisspeptin sistemi omurgalı türler arasında iyi korunmaktadır. Bununla birlikte, kisspeptinin omurgalılarıdaki genel fizyolojik işlevleri hala aydınlatılmayı beklemektedir (Beltramo et al., 2020). Kisspeptin peptid uygulamasının GnRH1 nöronlarında lokalize olan GPR54'ü aktive ederek LH salınımını indüklemektedir ve kisspeptin-GPR54 sisteminin en azından plasental memelilerde HPG ekseninin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı açıktır (Han et al., 2005).

Erkek hayvanlarda kisspeptinler seksüel farklılaşma, metabolik etkiler ve çevresel faktörlerle birlikte fertilitenin kontrolü, pubertanın zamanlaması ve gonadal hormonlar tarafından gonadotropin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Seminal plazmadaki kisspeptin konsantrasyonu ile sperma kalitesi arasındaki pozitif ilişki kisspeptin sisteminin spermatogenezisteki önemini desteklemektedir (Zou et al., 2019). Sertoli hücreleri kisspeptinlere karşı yanıt oluşturarak androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimini uyarır ve bu durum kisspeptinin ABP üretiminde potansiyel bir rolüne işaret etmektedir (Cao et al., 2019). Kisspeptinler ile ilgili ilerleyen çalışmalar kisspeptin ve reseptörü olan GPR54 sinyalleşmesinin pubertanın başlangıcı ve GnRH salgılanmasının başlatılmasında önemli bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Ohkura et al., 2009). Ayrıca Kirilov et al. (2013), kisspeptin ve GPR54 arasındaki sinyalin sağlıklı bir fertilité için gerekliliğini ortaya koymuşlardır.

Melatoninin üreme sistemindeki etkisi Kp düzeylerinde değişikliklere neden olarak kontrol ettiği düşünülmektedir. Ancak melatonin ve Kisspeptin arasındaki mekanizmalar henüz belirsizliğini korumaktadır (Yu et al., 2018). Elde edilen bulgular Kp nöronlarının seks steroidlerinin geri bildirim mekanizmalarının hedefi olduğunu ortaya koymaktadır (Beltramo et al., 2020). Buna ilaveten kisspeptinlerin *KISS1R*'ye bağlanması ile hipotalamik hücrelerde Fosfolipaz C yolu aktif hale gelir ve hücresel aktivitede değişikliklere neden olarak hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol oynar (Messenger et al., 2005).



Şekil 5.2. KISS1'in testiste olası etkileşim mekanizması, (Sharma vd (2020)' dan uyarlanmıştır)

*KISS1* geninin mRNA ekspresyonu başlangıçta ağırlıklı olarak insan plasentasında ve az miktarda böbrek ve pankreasta tespit edilmiştir. Ayrıca kantitatif ters transkriptaz PCR ile *KISS1* transkripti merkezi sinir sistemi, karaciğer, akciğer, gonadlar ve prostat gibi diğer organlarda yaygın olarak tespit edilmiştir (Oakley et al., 2009). Her iki cinsiyette de hipotalamik *KISS1* ve *GPR54* geni doğum sonrası gelişim sırasında aynı ifade modelini paylaşmaktadır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi ile doğumda daha düşük *KISS1* ve *GPR54* geni mRNA seviyeleri tespit edilmiş, doğum sonrası 15. güne kadar korunmuş, daha sonra pubertadan önce en düşük seviyelere düşmüş ve puberta döneminde keskin bir şekilde en yüksek seviyelere yükselmiştir. İmmün boyama yöntemleriyle kisspeptinler büyüyen ve preovulatar foliküllerde, corpus luteum ve interstisyel bezde hücreye ve

aşamaya özgü bir şekilde tespit edilmiştir. Erkek sıçanda ise *KISS1* geni testiste RT-PCR ile güçlü bir şekilde ifade edilmiştir (Li et al., 2009).

Kp prekürsörünün işlenmesi birkaç endojen Kp izoformuna yol açmaktadır. En kısa aktif sekans olan 10 amino asit (Kp10) prekürsörün C-terminal kısmına karşılık gelir. Bu sekans memelilerde son derece iyi korunmuştur ve sadece birkaç varyantı tanımlanmıştır (Beltramo et al., 2020). *KISS1* geni memelilerin çoğunda 52-54 amino asit uzunluğunda olan kisspeptinin biyolojik olarak aktif formunu üretmek için bölünen bir öncü peptidi kodlar. Tablo 5.1’de gösterildiği gibi kisspeptinin çıkarılan amino asit dizisi memeliler arasında iyi korunmuştur. Örneğin, keçi kisspeptin dizisi küçükbaş, büyükbaş ve domuz kisspeptinine sırasıyla %98, %91 ve %77 dizi özdeşliği gösterir. Özellikle, maksimum reseptör aktivasyonu için minimum çekirdek dizisi olan C-terminal 10 kalıntısı, C-terminal tirozinin (Y) primatlarda fenilalanin (F) ile değiştirilmesi dışında listelenen türler arasında aynıdır (Okamura et al., 2013).

Tablo 5.1. Farklı türler arasında kisspeptinin amino asit sekans organizasyonunun karşılaştırılması (Okamura et al., (2013)’ dan uyarlanmıştır)

|              |   |                                                         |    |
|--------------|---|---------------------------------------------------------|----|
| <b>Keçi</b>  | 1 | GAALCPS–ESSAGPRQPGPCAPRSRLIPAPRGAVLVQREKDVSAYNWNSFGLRY  | 53 |
| <b>Koyun</b> | 1 | GAALCPS–ESSAGPRQPGPCAPRSRLIPAPRGAAALVQREKDVSAYNWNSFGLRY | 53 |
| <b>Sığır</b> | 1 | GAALCPP–ESSAGPQRLGPCAPRSRLIPSPRGAVLVQREKDVSAYNWNSFGLRY  | 53 |
| <b>Domuz</b> | 1 | GTSSCQPPESSGPQRPGGLCTPRSRRLIPAPRGAVLVQREKDLAYNWNSFGLRY  | 54 |
| <b>Rat</b>   | 1 | –TSPCPPVENPTGHQRP–PCATRSRLIPAPRGSVLVQREKDMAYNWNSFGLRY   | 52 |
| <b>İnsan</b> | 1 | GTSLSPPESSGSPQQPGLSAPHSRQIPAPQGAVLVQREKDLPNYNWNSFGLRF   | 54 |

—Kp-10—

## 6. MATERYAL VE YÖNTEM

### 6.1. Materyal

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından amaç, gereç, yaklaşım ve yöntem parametreleri açısından incelenmiş, 18/03/2021 tarihli 2021/16 kabul nolu kurul kararı ile gerçekleştirilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir (Ek 1). %95 güven aralığı referans alınarak gerçekleştirilen güç analizi neticesinde çalışmamıza her grupta 5 koç olacak şekilde toplam 10 sağlıklı koç dahil edilmesinin yeterli olacağı kararlaştırıldı (Şekil 6.1). Koçlar  $58.7 \pm 5.31$  aylıktı ve yarı entansif bir sistemde gruplar halinde Samsun / Türkiye’de (kuzey enlemi:  $41.37^\circ$ , doğu boylamı:  $36.21^\circ$ ) bulunduruldu. Koçların ortalama ağırlıkları  $58.45 \pm 4.50$  kilogramdı ve vücut kondüsyon skorları 3-3.5 arasındaydı. Çalışma üreme sezonu dışarısında, Mart'dan Haziran'a kadar süreçte yürütülmüştür. Sunulan doktora tez çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Kliniği ve Araştırma Laboratuvarı’nda yürütülmüştür.

### 6.2. Yöntem

#### 6.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve Melatonin Uygulaması

Hayvanlar çalışma süresince aynı bakım ve beslenme koşulları altında aynı işletme şartlarında tutuldu. Merada hayvanların doğal olarak beslenmelerine ek olarak, her bir hayvan için günde iki kez 400 gram taze saman verildi. Ayrıca mineralize tuz taşları ve temiz musluk suyu ad libitum olarak mevcuttu. Çalışmaya başlamadan önce hayvanların tüm sağlık kontrolleri yapılmış olup, koçlar bireysel olarak testis ve üreme kanalında mevcut olabilecek herhangi bir anomali veya fonksiyon bozukluğu açısından genel muayeneler ile sperma muayanesi ve aynı zamanda ultrasonografik muayenelerle değerlendirildi. Hayvanlar, çalışmaya başlamadan önce iyi bir libidoya sahip olup aynı zamanda klinik olarak da sağlıklıydı. Koçlar rastgele 2 gruba ayrılarak melatonin grubu ( $n=5$ ) ve kontrol grubu ( $n=5$ ) belirlendi. Melatonin grubundaki koçlara 30 gün arayla 2 kez ve her defasında da 2 adet melatonin (Regulin®, 18 mg melatonin) implantı (36 mg/koç) subkutan olarak özel aplikatör tabancası ile uygulandı. Yardımcılar tarafından tutulan ve zapt-ı rapta alınan koçların kulağın dış yüzeyinde damarlaşmanın ve deri kıkırdak bağlantısının az olduğu bir bölge implant uygulama alanı olarak seçildi. Kulak derisi antiseptik ile temizlenerek dezenfekte

edildi ve implantlar uygulama aplikatörünün ucuna yerleştirildi (Şekil 6.2 a). İmplant uygulaması için seçilen bölgede aplikatör yassı ve sivri olan uç kısmı ile kulak derisine paralel olacak şekilde ve kıkırdak dokuya zarar vermeden bir hamle ile deri altına girildi. Aplikatörün iğnesi deri altında implantın uzunluğu kadar (2,0 – 2,5 cm) ilerletildi (Şekil 6.2 b). Aplikatörün kalın iğnesinin deri ve kıkırdak doku arasına açmış olduğu yuvaya, aplikatör yavaş bir şekilde geri çekilirken aplikatör pistonu ileri doğru itilerek implantın yerleşmesi sağlandı. Yapılan literatür taramaları sonrasında melatonin implantı uygulaması 30 gün ara ile iki kez olacak şekilde gerçekleştirildi (Kleemann et al., 2022) (Şekil 6.3). Bu amaçla melatonin dolaşımdaki dozunun, planlanan çalışma süresi aynı kalması hedeflendi.



Şekil 6.1. Çalışma grubumuzu oluşturan Bafra ırkı koçları

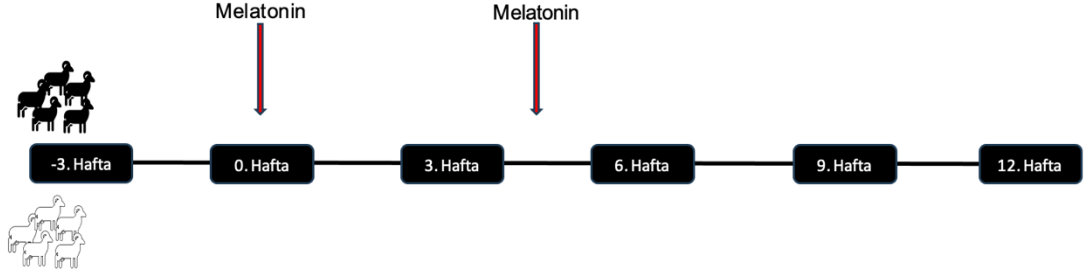


a



b

Şekil 6.2. Melatonin implant uygulaması, Melatonin implantlarının deri altına uygulaması amacı ile kullanılan aplikatör (a). Melatonin hormonunun koçların kulak bölgesinden uygulama yöntemi (b)



Şekil 6.3. Melatonin uygulaması ve çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizlerin zaman çizelgesi

### 6.2.2. Testis Morfometrik Ölçümleri

Koçların testislerinin morfometrik ölçümleri, melatonin implantı uygulaması yapılmadan üç hafta önce (1. ölçüm), melatonin uygulaması esnasında (2. ölçüm) ve melatonin uygulamasından sonraki 3 haftada birer kez olacak şekilde (H -3, H 0, H 3, H 6, H 9 ve H 12) toplam 6 kez yapılmıştır. Testislerin morfometrik ölçümleri alınmadan önce skrotum üzerinde bulunan yabancı maddeler ve yapağı bir makas yardımı ile kesilerek yıkanıp kurulandı. Skrotal genişlik testislere baskı oluşturulmadan en geniş çevre uzunluğunda kumpas ile ölçüldü. Epididimisin caput ve cauda kısımları hesaba katılmaksızın kumpas yardımıyla dorso-ventral sağ ve sol testis uzunlukları ayrı ayrı ölçülerek kaydedildi. Skrotum kalınlığı (k) skrotum üzerinden dijital kumpas yardımıyla cranio-caudal sağ ve sol testis kalınlıkları ayrı ayrı ölçülerek kaydedildi (Şekil 6.4). Testis hacmini hesaplamak için skrotal çevreye paralel olarak testis uzunluğu ve skrotum kalınlığının ölçümleri ile hesaplandı. Hesaplamalar Milczewski et al. (2015), tarafından önerildiği gibi yapıldı.

$$a = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{b - k}{2} \times \left[ \frac{c - k}{2} \right]^2$$

a = testis hacmi (ml), b = testis uzunluğu (cm), c = testis genişliği (cm) ve k = skrotum kalınlığı



Şekil 6.4. Testis hacminin hesaplanması için gerekli ölçümlerin alınması. Sırasıyla testis uzunluğu (a), testis genişliği (b), skrotum kalınlığının (c) ölçüm değerlendirilmesi

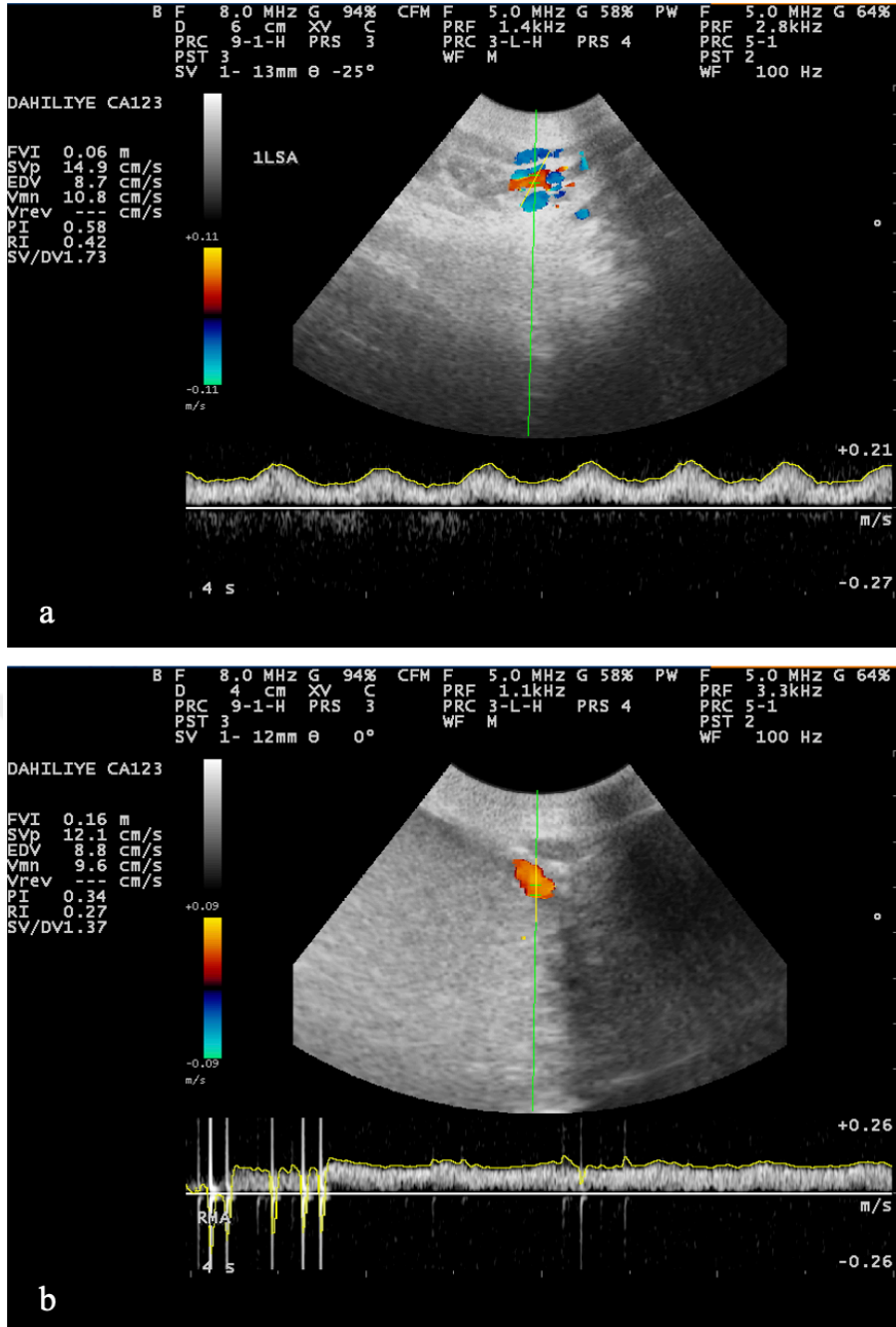
### 6.2.3. Testis Arter Hemodinamiğinin Renkli Doppler USG ile Ölçülmesi

Testiküler kan akışındaki değişikliklerin izlenmesi morfometrik ölçümlerde olduğu gibi, melatonin implantasyondan üç hafta önce, 0. haftada ve ilk implantasyondan sonraki arka arkaya 3 haftada bir olarak altı kez gerçekleştirildi. Anestezik madde uygulamasının TBF üzerindeki olumsuz etkisinden kaçınmak için koçlar sedasyon olmadan zapt-ı rapt altına alındı. Tüm incelemeler, doğrusal çok frekanslı bir prob (6-14 MHz) ile donatılmış ultrason cihazı kullanılarak gerçekleştirildi (Esaote Biomedica MYLAB5 VET) (Şekil 6.5 a). Ultrasonografik değerlendirmeler çalışma süresince aynı operatör tarafından yapıldı. Skrotumun her iki tarafındaki tüyler tıraş edildi ve ultrasonografi ile değerlendirmeyi kolaylaştırmak için prob üzerine bol miktarda ultrasonik jel sürüldü. Bu çalışmada supratestiküler ve marjinal testis arterlerinde testis kan akışı değerlendirilmiştir (Şekil 6.5 b). Koçlarda testiküler arter testise girmeden hemen önce kıvrımlı olarak görünmektedir. Bu kıvrımlı kısım supratestiküler arter (STA) olarak adlandırılır. Vasküler yapılar belirlendikten ve STA'nın en büyük longitudinal bölümü ile marjinal testis arteri (MTA) B-mode ultrasonografi kullanılarak gözlemlendikten sonra köpeklerde ve keçilerde tarif edildiği gibi TBF'nin Doppler değerlendirmesi yapıldı (Samir et al., 2020; Carrillo et al., 2012) (Şekil 6.6 a,b). Değerlendirme ile kan akış dağılımının ve dalga biçiminin daha ayrıntılı ve daha güçlü bir analizini ve sonuç olarak en yüksek

sistolik hızı (PSV, cm / saniye), diyastol sonu hızı (EDV, cm / saniye) ve testiküler arterlerin Doppler indeksleri gibi birçok Doppler parametresi (rezistif indeks (RI) ve pulsatil indeksi (PI)) ortaya konuldu. İncelenen damarın uzun eksenine ile Doppler ışını arasındaki açı kan akış yönünde 45-60°'den az olarak tutuldu. Doppler probu otomatik olarak elde edilen spektral eğri ve vasküler indeksleri belirlemek üzere damarın merkezi bir alanına yerleştirildikten sonra en az üç ardışık dalganın izlenmesine dikkat edildi.



Şekil 6.5. Renkli Doppler Ultrasonografi cihazının kullanımı. Doğrusal çok frekanslı bir prob (6-14 MHz) ile donatılmış ultrason cihazı (Esaote Biomedica MYLAB5 VET) (a). Testis üzerinde sol elin baş parmağı Supra Testiküler arter için yapılan ölçüm yerini gösterirken probun olduğu bölge ise Marjinal arter için yapılan ölçüm yerini göstermektedir (b)



Şekil 6.6. Renkli Doppler Ultrasonografi cihazının kullanımı ile değerlendirmenin yapılması. Supra Testiküler arter için yapılan ölçüm grafiğini (a), Marjinal arter için yapılan ölçüm grafiğini göstermektedir (b).

### 6.3. Kan Örneklerinin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler

İmplantasyondan üç hafta önce, 0. Haftada (ilk implantasyon) ve sonraki arka arkaya 3 haftada bir olacak şekilde jugular venadan kan örnekleri (5 ml) heparinize tüplere (Venoject II, Terumo, Tokyo, Japonya) alındı (Şekil 6.7). Kan örnekleri 5000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildikten sonra plazma elde edilerek dolaşımdaki hormonların konsantrasyonları değerlendirilene kadar -20°C'de saklandı. Tüm analizler kullanılan kitin aşağıda açıklanan prensiplerine göre sırasıyla gerçekleştirildi.



Şekil 6.7. Vena jugularisten kan örneklerinin toplanması ve kan plazma ya da serumlarının elde edilmesi

#### 6.3.1. Melatonin Seviyesinin Ölçümü

Melatonin (pg/ml) konsantrasyonları rekabetçi ELISA Kiti (AFG Scientific) yöntemi kullanılarak ölçüldü. Tespit aralığı 12,35-1000,00 pg/mL' dir. Melatonine özgü bir monoklonal antikor bir mikroparka üzerine önceden kaplıdır. Biyotinle işaretlenmiş melatonin ve işaretlenmemiş melatonin (Standartlar veya numuneler) arasında, önceden kaplanmış antikorla spesifik melatonin arasında rekabetçi bir inhibisyon reaksiyonu başlatıldı. İnkübasyondan sonra bağlanmamış konjugat yıkandı. Daha sonra, Horseradish peroksidazına (HRP) konjuge edilmiş avidin her mikroparka kuyucuğuna eklendi ve inkübe edildi. Bağlı HRP konjugat miktarı numunedeki melatonin konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Substrat çözeltisinin eklenmesinden sonra, oluşan rengin yoğunluğu numunedeki melatonin konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Mikroparka okuyucuyu çalıştırılarak 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

### 6.3.2. Testosteron Seviyesinin Ölçümü

Bu analiz rekabetçi inhibisyon enzim immünoassay tekniğini kullanılarak gerçekleştirildi. Tespit aralığı 370,4-30000,00 pg/mL' dir. Önceden kaplanmış bir mikrolaka üzerine testosterona özgü bir monoklonal antikor bulunmaktadır. Testosterona özgü önceden kaplanmış antikor ile biyotin işaretli testosteron ve etiketsiz testosteron (Standartlar veya numuneler) arasında rekabetçi bir inhibisyon reaksiyonu başlatıldı. İnkübasyondan sonra bağlanmamış konjugat yıkandı. Daha sonra, HRP konjuge edilmiş avidin her mikrolaka kuyucuğuna eklendi ve inkübe edildi. Bağlı HRP konjugat miktarı numunedeki testosteron konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Substrat çözeltisinin eklenmesinden sonra, oluşan rengin yoğunluğu numunedeki testosteron konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Mikrolaka okuyucuyu çalıştırılarak 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

### 6.3.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 Seviyesinin Ölçümü

Bu kitle sağlanan mikrolaka, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1'e (IGF-1) özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Tespit aralığı 0,94-60,00 ng/mL' dir. Standartlar veya numuneler daha sonra IGF-1'e özgü biotin-konjuge antikor ile uygun mikrolaka kuyucuklarına eklendi. Daha sonra, HRP konjuge Avidin her mikrolaka kuyusuna eklenerek inkübe edildi. TMB substrat çözeltisi eklendikten sonra, yalnızca IGF-1, biyotin konjuge antikor ve enzim konjuge Avidin içeren kuyucuklarda renk değişikliği görüldü. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisi eklenerek sonlandırıldı ve renk değişimi  $450 \pm 10$  nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

### 6.4. Koçlardan Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi

Sperma alma işlemi implantasyondan üç hafta önce, 0. Haftada (ilk implantasyon anında) ve sonraki arka arkaya 3 haftada bir olacak şekilde özel tasarlanmış elektroejakülatör kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 6.8 a,b). Elektroejakülatör vahşi ve evcil hayvanlardan sperma toplamak için çok etkili bir prosedürdür. Ayrıca, bu prosedür kolay, uygulaması güvenli, numune alma güvenilirliğini yüksektir (Palmer, 2005). Bu işlemden önce rektum dışkıdan temizlendi. Elektrik akımının tam iletken olabilmesi için rektum içerisinde dışkı bırakılmadı. Penis ve prepusyum içerisi serum fizyolojik ile güzelce yıkanıp kurulandı. Hem proba hem de anal sfinktere kayganlaştırıcı uygulandıktan sonra voltaj ve amper

kontrolüne izin veren bir güç kaynağına bağlı, yaklaşık olarak 2,5 cm çapında ve 25 cm uzunluğunda ve üç uzunlamasına elektrotlu bir prob yeterli uzunlukta rektal yolla yerleştirildi ve koçlar uyarılmaya başlandı (Şekil 6.8 c). Elektrik akımı rejimi her biri 5 saniyelik dinlenme olacak şekilde birbirini izleyen 5-10 saniyelik benzer voltaj uygulamalarını içermektedir. Bu uygulamada başlangıç voltajı olarak 4 V kullanılmış olup maksimum 8 V'a kadar çıkıldı. Tekrarlayan 5 uygulama içerisinde koçlardan sperma alma işlemi gerçekleştirildi (Fidan vd., 2017). Ejakülasyonların toplanması sperma toplama kadehleri kullanıldı ve 37 °C de hızlı bir şekilde laboratuvara transferi sağlandı (Şekil 6.9).



Şekil 6.8. Sperma örneklerinin toplanması öncesi hazırlık. Voltaj ve amper kontrolüne izin veren güç kaynağı (a) Elektrik akımının iletilmesi için güç kaynağı ile üç uzunlamasına elektrotlu rektal probun bağlantısının gerçekleştirilmesi (b) Rektal proba kayganlaştırıcı uygulanması (c)



Şekil 6.9. Sperma örneklerinin toplanması. Sperma örneklerinin toplanması. Elektrik akımı rejimine başlandıktan sonra spermaların özel olarak üretilmiş sperma toplama kadehlerine alınması. Peniste ereksiyonun gerçekleşmesi ile tipik görünümü olan koç penisi (a), ereksiyon şekillenmeden sızıntı şeklinde spermanın toplanması (b)

#### 6.4.1. Spermatozoa Motilitesi ve Yoğunluğunun Değerlendirilmesi

Koçlardan alınan ejakülatlar 37°C derecede bulunan su banyosuna alındı ve 37°C derecede hazırlanmış TRIS sulandırıcısı ile (100 ml içinde çözülmüş 3.63 g TRIS, 1.99 g sitrik asit, 0.5 g D-fruktoz, 0.5 ml gentamisin) 1: 50 veya 1: 100 oranında sulandırıldı. Spermaların motilite detaylı hareket özellikleri ve yoğunlukları Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı (CASA), (SCA®, Microptic, Barcelona, Spain) kullanılarak en az 5 farklı mikroskop sahasında ve en az 500 hücre okutması yapılarak değerlendirildi. CASA sistemi negatif faz-kontrast, 10x objektifte ve 37°C derecede bulundurulacak olan ısıtma tablalı mikroskop (Nikon, Eclipse, Tokyo, Japan) ile yapıldı. Yapılan analizlerde spermatozoa total motilitesi ve progresif motilite yüzde (%) olarak, VCL (eğrisel hız,  $\mu\text{m}/\text{s}^{-1}$ ), VAP (ortalama yol hızı,  $\mu\text{m}/\text{s}^{-1}$ ), VSL (düz çizgisel hız,  $\mu\text{m}/\text{s}^{-1}$ ), STR (VSL/VAP, %), LIN (VSL/VCL, %), WOB (VAP/VCL, %), ALH (lateral kafa değiştirme,  $\mu\text{m}$ ) ve BCF (Çapraz geçiş frekans ritmi Hertz (Hz) kinematik parametreleri belirlendi. Toplam yoğunluk ve motilite değerlendirilmesi eş zamanlı olarak CASA sisteminde tanımlanmış uygun modül tarafından okuma yapılarak kayıt altına alındı.

#### 6.4.2. Morfolojik Muayene

Spermatozoonların morfolojisi Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı (CASA) (SCA®, Microptic, Barcelona, Spain) kullanılarak değerlendirildi. CASA sisteminde 400x objektifte mavi filtrede bulundurulacak olan mikroskop (Nikon, Eclipse, Tokyo, Japan) ve SpermBlue® kiti (Microptic, Spain) ile morfolojik değerlendirme yapıldı.  $25 \times 10^6$  spermatozoon/mL yoğunluktaki spermadan 15 µL alınarak lam üzerine konulup 45° açı ile smear hazırlandı. Daha sonra preparat kurumaya bırakıldı. Tamamen kuruyan preparatlar SpermBlue® fiksatif içeren jar içerisine dikey olarak dikkatlice yerleştirilerek 2 dakika bekletildi. Daha sonra lam 60-80 derece diklikte kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi sonrasında içerisinde distile su bulunan jar içerisinde yavaşça 2 kez batırılıp çıkarıldı ve lamın kuruması beklendi. Boyama işlemi sonrası CASA sisteminin yazılımında morfoloji modülü seçildi ve en az 100 spermatozoon üzerinde değerlendirmeler yapıldı (Şekil 6.10). Morfolojik değerlendirme yüzde (%) olarak değerlendirildi ve kaydedildi.

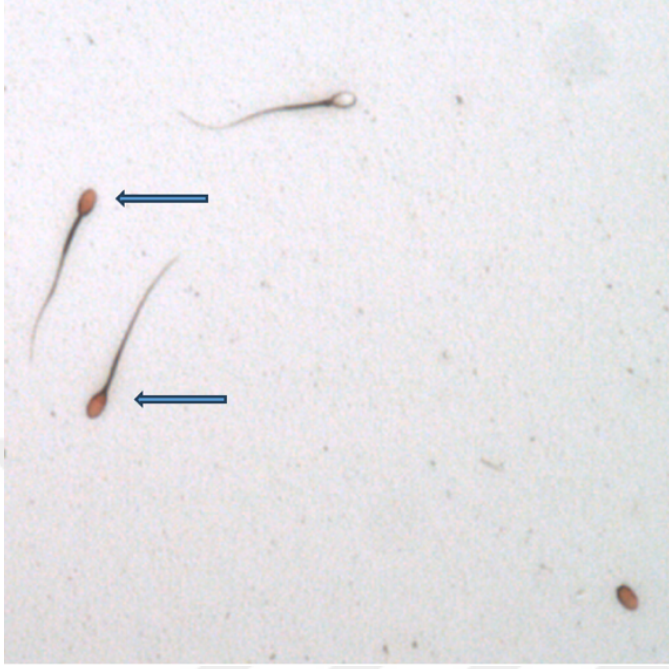


Şekil 6.10. SpermBlue® ile boyanmış koç spermasının morfolojisi

#### 6.4.3. Canlılık Testi

Lamel üzerine 15 µL Eosin-nigrosin boyası yerleştirildi. Daha sonra 10 µL sperma ayarlanabilir pipet kullanılarak Eosin-nigrosin damlasının yanına yerleştirildi ve pipet ucu kullanılarak hafifçe karıştırıldı. 30 - 40° açıda tutulan ayrı lamel, numune karışımını lam boyunca yaymak için kullanıldı. Slayt birkaç dakika daha ısıtıcıya yerleştirildi ve ışık mikroskobu (1000x büyütme, yağ immersiyonu) altında toplam

200 spermatozoon değerlendirildi. Kısmen veya tamamen pembe/kırmızı renk gösteren spermatozoonlar ölü kabul edildi ve boyayı kesin olarak hücre içine almayan spermatozoonlar canlı olarak kabul edildi (Şekil 6.11).



Şekil 6.11. Eosin-Nigrosin boyama ile spermatozoon canlılığının tespiti. Mavi ok ile gösterilen ve kırmızı renk almış spermatozoon ölü kabul edildi

#### **6.4.1. Plazma Membran Bütünlüğünün Tespiti (Hipo-Osmotik Swelling Test)**

Koç sperm zarının işlevsel bütünlüğü, Jeyendran et al. (1984)'nin insan spermi için geliştirdikleri HOS testi kullanılarak değerlendirildi. Testten önce HOS testinin etkinliği, 150 mOsm/kg ozmolariteye sahip bir fruktoz ve Na-sitrat çözeltisi kullanılarak doğrulandı (Hipoosmotik çözelti (150 mOsm/L) = 7,35 g sodyum sitrat+ 13,51 g fruktoz 1 L içerisinde hazırlandı). 37°C derecede bulunan HOST solüsyonundan 1 mL alınarak eppendorf tüp içerisine konuldu ve içerisine 0,1 mL sulandırılmış sperma ilave edildi. Bu karışım 37°C de 1 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Daha sonra karışımdan 10 µL alınarak bir lam üzerine konulup lamel kapatıldı ve hemen sonra faz-kontrast mikroskobu altında değerlendirildi (400x büyütme). Toplam 200 spermatozoon, en az beş farklı mikroskobik alanda sayıldı. Sağlıklı spermatozoonların sayısı, içine girdikleri hipoosmotik sıvıyı absorbe ederek

baş kısmında şişme (swelling) ve kuyruk bölgesinde kıvrılma (coiled) özelliği göstermeleri kriterine göre kaydedildi (Şekil 6.12).



Şekil 6.12. Hipo-Ozmotik şişme testi (HOST). Sağlıklı spermatozoon mavi ok ile gösterilmiştir

### 6.5. Antioksidan Profilin Değerlendirilmesi

Oksidatif ve antioksidatif kapasitenin belirlenmesi için toplam antioksidan durumu (TAS) test kiti ve toplam oksidan durumu (TOS) test kiti ile ELISA yöntemine göre değerlendirildi (Rel Assay Diagnostics, Türkiye). Spermanın alınıp sulandırılmasından sonra örnekler 800 g'de 10 dakika santrifüje tabi tutuldu (Gündoğan vd., 2010). Santrifüj sonrasında elde edilecek süpernatant kısmı eppendorf tüplerine alındı. Eppendorf tüpler -20°C derecedeki dondurucuda tüm numune örnekleri hazırlanana dek muhafaza edildi ve daha sonra analizler üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgedi. Absorbansın 660 nm'deki değişimi numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Test geleneksel olarak bir E vitamini analogu olan Trolox eşdeğeri olarak adlandırılan kararlı bir antioksidan standart çözeltisi ile kalibre edildi. TOS seviyelerinin ölçümünde numunede bulunan oksidanlar demir-o-dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksitlemiştir. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile güçlendirilmiştir. Ferrik iyon asidik bir ortamda ksilenol turuncusu ile renkli bir kompleks oluşturmuştur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarıyla ilişkilidir. Test hidrojen

peroksit ile kalibre edilmiş ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  eşdeğeri/L) cinsinden ifade edilmiştir.

## **6.6. KISS1 Gen İfade Düzeylerinin Analizi**

### **6.6.1. Spermadan Total RNA İzolasyonu ve Konsantrasyon Tayini**

Rutin aralıklarla alınan sperma örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu kapsamda, tüm sperma örnekleri 1000 g'de 5 dakika santrifüje edildi. Elde edilen özütler TRIZOL ile muamele edilerek total RNA izolasyonu gerçekleştirildi (Şekil 3.12 a). Bu kapsamda izlenen protokol şu şekildedir; 200  $\mu\text{L}$  hacmindeki örnek özütü için beş kat hacim düzeyinde 1 mL TRIZOL eklenerek 1 dakika boyunca en yüksek devirde vorteks yapıldı. Daha sonra 10 dk. oda ısısında bekletilip (2-3 dk.'da bir vorteks yapılacak) özüte kloroform eklendi. 1 dakika boyunca en yüksek devirde vorteks yapıldıktan sonra 3 dakika oda ısısında faz oluşması beklendi. 10.000 g'de 10 dk.  $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj yapıldıktan sonra şeffaf faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine alkol eklenerek 10 dakika oda ısısında bekletildi (Şekil 3.12 b). Daha sonra 10.000 g'de 10 dakika  $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj yapılarak süpernatantı uzaklaştırıldı. Çökelti 400  $\mu\text{L}$  etanol ile çözdürülerek elle karıştırıldı. 10.000 g'de 5 dakika  $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj yapıldı ve süpernatantı atılarak alkolün uzaklaşması için 15 dakika oda ısısında bekletildi. Son olarak steril  $\text{dH}_2\text{O}$  eklenerek çökelti çözdürüldü.

İzole edilen total RNA konsantrasyonu, nanodrop 2000 (Thermo Scientific) cihazı ile tayin edildi. A260/280 oranı kirlilik tespiti için kontrol edildi ve optimal 2 düzeyinde olması beklendi. İzole edilen total RNA'lar 400 ng düzeyinde dilüe edildi ve çalışma gününe kadar (muhtemel 3 ay)  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

### **6.6.2. Total RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi**

Tüm örneklerle ait izolasyon işlemleri tamamlandıktan sonra mRNA'dan tamamlayıcı (complimentary) DNA zincirinin sentezi gerçekleştirildi. Bu noktada ticari olarak satışı sunulan ticari kitler kullanıldı. İlk olarak muhtemel genomik DNA parçalarının uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Ardından, reaksiyon tüpünün içerisine dNTP'ler, reaksiyon tampon bileşenleri ve reverse transkriptaz enzimi eklendi. Konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazı yardımı ile kitin önerdiği protokol çerçevesinde cDNA sentezi gerçekleştirildi ve yüksek sıcaklıkta mRNA'ların degradasyonu sağlandı (Şekil 6.12 a,b).



Şekil 6.13. Sperm Örneklerinden Total RNA İzolasyonu, cDNA Eldesi ve qRT-PCR Analizi

### 6.6.3. qRT-PCR analizi

Çalışma kapsamında kullanılacak olan *GAPDH*, *KISS1* ve *KISS1r* genlerine ait primerlerin tasarımı NCBI primer BLAST programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, ticari bir firmaya sentez ettirildi. İnternal kontrol geni olarak GAPDH (housekeeping gen) kullanıldı. Kullanılan primerlere ait baz dizisi, PCR reaksiyon hazırlık protokolü ve PCR döngü koşulları sırasıyla Tablo 6.1, 6.2 ve 6.3'te sunulmaktadır.

Tablo 6.1. Çalışma kapsamında kullanılacak olan primerlere ait genel bilgiler

| Hedef gen     | Yön | Primer dizilimi (5'-3') | Tm (°C) | Aplikon uzunluğu |
|---------------|-----|-------------------------|---------|------------------|
| <i>Kiss1</i>  | F   | CCACCTCTGGACATTACC      | 61      | 148              |
|               | R   | GCTGCCAAGAAACCAGTGAG    | 59      |                  |
| <i>Kiss1r</i> | F   | CCCCTCTCTCTGAGCGGACC    | 63      | 163              |
|               | R   | CACAACGAACTGCACCGAAC    | 60      |                  |
| <i>Gapdh</i>  | F   | TCGGAGTCAACGGATTTGGT    | 57      | 181              |
|               | R   | TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC    | 59      |                  |

Tablo 6.2. PCR reaksiyon hazırlık protokolü

| Reaksiyon bileşenleri  | Hacim        |
|------------------------|--------------|
| PCR master mix (2x)    | 15 µl        |
| Forward primer (10 µM) | 1 µl         |
| Reverse primer (10 µM) | 1 µl         |
| cDNA (300 ng)          | 14 µl        |
| RNaz/DNaz içermeyen su | 19 µl        |
| <b>Toplam hacim</b>    | <b>50 µl</b> |

Tablo 6.3. PCR döngü koşulları

| Basamaklar               | Süre    | Sıcaklık       | Döngü sayısı |
|--------------------------|---------|----------------|--------------|
| <b>Enzim aktivasyonu</b> | 10 dak. | 95°C           | 1            |
| <b>Denatürasyon</b>      | 30 sn.  | 94°C           | 40           |
| <b>Primer bağlanması</b> | 30 sn.  | T <sub>m</sub> |              |
| <b>Uzama</b>             | 60 sn.  | 72°C           |              |
| <b>Erime eğrisi</b>      | 15 dk.  | 72°C           | 1            |

100 ml 1x Tris/Borate/EDTA (TBE) tamponu ile Agaroz (Sigma-Aldrich, Almanya) karışımı mikrodalga cihazında kaynatılarak yürütme jeli hazırlandı. Hazırlanan jelin sıcaklığı 65-70°C arasına gelince jel içerisine etidyum bromid (EtBr, 100 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD) eklendi ve yatay elektroforez cihazına yerleştirilmeye uygun olan bir kalıba döküldü. Jel hazır olunca, 1xTBE tamponu bulunan elektroforeze yerleştirildi ve PCR reaksiyonundan elde edilen ürünler kuyucuklara yüklenerek 120 V'ta 90 dakika yürütüldü. Referans standart olarak GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. İlgili gen bölgelerine ait bantlar, referans bant aralığına göre değerlendirildi ve beklenen ürün uzunluğu ile aynı ölçütlerde olup olmadığı tayin edildi. Primerlere ait bantlar görüntülenene kadar, farklı sıcaklıklarda primerlerin bağlanması test edildi.

Örnek konsantrasyonu ve primer bağlanma sıcaklığına ilişkin optimizasyonların gerçekleştirilmesini takiben kitin önerdiği protokol çerçevesinde reaksiyon buz üzerinde hazırlandı (Tablo 6.4).

Tablo 6.4. qRT-PCR reaksiyon hazırlık protokolü

| Reaksiyon bileşenleri                  | Hacim        |
|----------------------------------------|--------------|
| 2xQuantitect SYBR Green PCR Master Mix | 25 µl        |
| Forward primer (10 µM)                 | 1,5 µl       |
| Reverse primer (10 µM)                 | 1,5 µl       |
| cDNA (300 ng)                          | 3 µl         |
| RNaz bulunmayan su                     | 19 µl        |
| <b>Toplam hacim</b>                    | <b>50 µl</b> |

Reaksiyon döngü koşulları primerlerin Erime Değeri (T<sub>m</sub>, Melting temperature) sıcaklıklarının optimizasyonu sonucu düzenlendi. Tablo 6.5'te paylaşılan döngü koşullarına göre reaksiyonlar gerçekleştirildi.

Tablo 6.5. qRT-PCR döngü koşulları

| Basamaklar        | Süre                                   | Sıcaklık |          |
|-------------------|----------------------------------------|----------|----------|
| Enzim aktivasyonu | 15 dak.                                | 95°C     |          |
| Denatürasyon      | 15 sn.                                 | 94°C     |          |
| Primer bağlanması | 30 sn.                                 | 60°C     | 40 döngü |
| Uzama             | 30 sn.                                 | 72°C     |          |
| Erime eğrisi      | Her derecede 25 ölçüm gerçekleştirilir | 65- 95°C |          |

Tüm örnekler sırayla 96'lık mikrolakalarda reaksiyona tabi tutuldu. qRT-PCR reaksiyonunu takiben tüm gruplardaki genlere ait Ct değerleri görüntülendi. qRT-PCR'da PCR ürünündeki anlamlı artışın gözlemlendiği ilk döngü eksponensiyal fazda görüntülenir ve bu genellikle başlangıç materyalindeki gen ifade düzeyi ile doğru orantılıdır. Bu nedenle başlangıç materyalinde ifade düzeyi yüksek olan genler eksponensiyal faza daha erken girecektir. Çalışmamızda da eksponensiyal fazda görüntülenen Ct değerleri istatistiksel analizler için kaydedildi. Gen ifade analizinde internal kontrol geni olarak kullanılan GAPDH genine ait Ct değerleri referans Ct değeri olarak kabul edildi ve diğer gen ifadelerine ait değerler normalize edildi. Hesaplamalar kıyaslamalı Ct metodu olan delta-delta Ct metodu ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) kullanılarak gerçekleştirildi (Livak & Schmittgen, 2001). Sonuçlar gen ifade düzeyinin kaç kat değiştiğini göstermektedir.

## 6.7. İstatistiksel Analiz

Veriler homojenliği ve veri türünü belirlemek için SPSS'de Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak bir normallik testine tabi tutuldu. Bu çalışmada koçların Doppler parametreleri arasında sağ ve sol testisler arasında önemli bir fark bulunmadı ve böylece her koç için veriler bir havuzda toplanarak iki grup arasında karşılaştırmalar yapıldı. Testis hacmi, Doppler parametreleri ve semen kalitesi parametreleri için veriler, Ortalama (MEAN)± Ortalamanın Standart Hatası (SEM) olarak sunuldu. Tüm istatistiksel analizler için SPSS yazılımı (SPSS version 27; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı. Melatonin implantasyonunun testis hacmi, sperma hacmi ve spermatolojik parametreler üzerindeki etkileri Bağımsız Örneklem t-testi kullanılarak test edildi. Tedavinin etkisini sabit bir faktör olarak ve zamanı tekrarlanan bir faktör

olarak incelemek için tekrarlanan ölçümler iki yönlü ANOVA (two way ANOVA) kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Hormon analizi ve gen analizinde gruplar arası verilerin değerlendirilmesinde, normal dağılıma uyduğu tespit edilen sayısal değişkenlerin karşılaştırması için parametrik testlerden Tek Yönlü Varyans Analizi (one way ANOVA), veri setinin normal dağılıma uymaması durumunda ise Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. Her olgudaki uygulama öncesi ve sonrası farklılıkların istatistiksel olarak değerlendirilmesi için normal dağılıma uyduğu tespit edilen sayısal değişkenlerin karşılaştırmasında, parametrik testlerden bağımlı t-testi, veri setinin normal dağılıma uymaması durumunda ise Mann-Whitney U testi kullanıldı.



## 7. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bir sürüde bulunan koçların üreme performansının etkinliği koyun sürülerinin ekonomik açıdan devamlılığının sağlanmasını için son derece önemlidir. Yetişkin anovulator koyunlarda ovulasyonların ve östrusun indüklenmesi sürüye dahil edilen koçların etkin bir şekilde kullanımı ile mümkündür. Koyunlar en yüksek oranda üreme sezonlarında, geç anöstrus ya da erken östrus döneminde koçlara maruz kaldığında ovulasyonları ve östrusları indüklenir. Koç katımı hem pratik hem de ekonomik açıdan üreme verimliliğini önemli ölçüde artırma avantajına sahip olmakla birlikte, üreme mevsiminin 4-6 hafta veya daha fazla ilerlemesine izin verir. Ayrıca koç katımı dişi hayvanlarda iyi bir östrus senkronizasyonu sağlayabilir (Rosa & Bryant, 2002). Koyunlarda ovulasyon ve östrus mevsime bağlı olarak duraklayabilirken, koçlarda spermatogenezis ve cinsel aktivite asla durmaz. Ancak, yine de üreme sezonu dışında testis hacminde ve çapında azalma, sperma kalitesinde bozulma ve hormon profillerinde değişimler gözlemlenebilir (Casao et al., 2010a). Bu sebeple üreme sezonu dışında uygulanacak stratejilerin etkinliğinin birçok açıdan incelenmesi gerekmektedir.

Sunulan bu doktora tez projesinde üreme sezonu dışında bulunan koçlara 36 mg melatonin uygulaması yapılarak düzenli aralıklarla (H -3, H 0, H 3, H 6, H 9 ve H 12), yapılan melatonin uygulamasının testis hacmine, testiküler kan akışına ve spermatolojik parametreleri üzerine etkinliği araştırıldı. Ayrıca eksojen olarak uygulanan melatonin implantının dolaşımdaki testosteron, melatonin ve IGF-1 hormon seviyeleri üzerine etkisi ile aynı zamanda melatonin hormonunun antioksidan özelliğinin ve etkinliğinin belirlenmesi amacıyla TAS ve TOS seviyeleri ölçüldü. Sunulan tez projesi ile üreme sezonu dışındaki koçlara eksojen melatonin uygulanmasının reproduktif açıdan etkinliğinin belirlenmesinin yanı sıra melatonin hormonunun işlevini yerine getirmesinde aracı proteinler olan Kisspeptinlerin (*KISS1*) ve ilgili reseptörlerin (*KISS1R*) gen ekspresyonu ile ilişkisi araştırıldı.

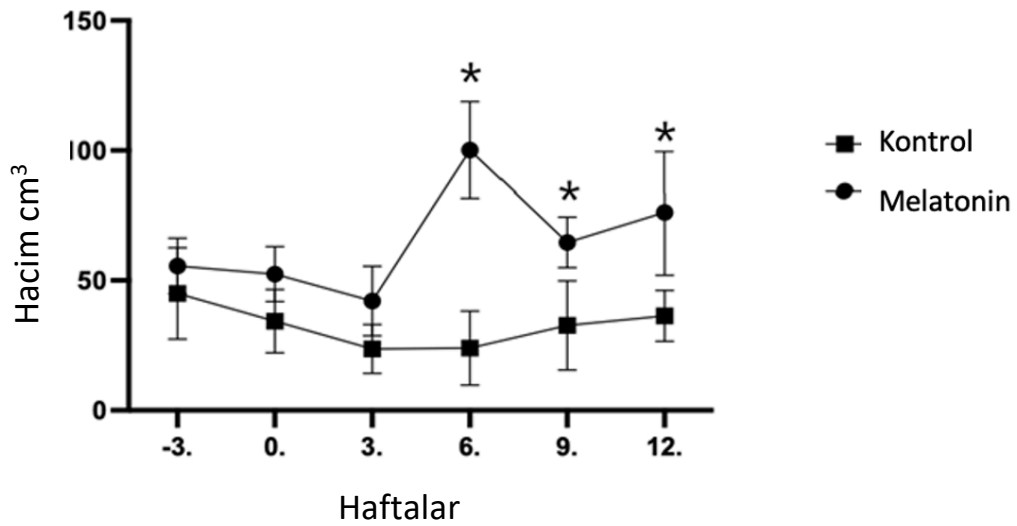
Çalışmamızın başlangıç aşamasında laboratuvar şartlarının kontrolü, deney protokollerinin optimizasyonu ve el becerisinin kazanılması amacıyla elektroejakülatör kullanımı ile koçlardan sperma alınması ve koçlar için en uygun sperma sulandırıcısı formülasyonunun optimize edilmesi, spermanın CASA ve subjektif metotlarla değerlendirmesini içeren ön çalışmalar yapıldı. Ardından koç spermasından *KISS1* ve *KISS1R* gen bölgelerinin ekspresyonunu içeren pilot

alışmalar ile renkli Doppler USG kullanımının optimizasyonunu içeren ön çalışmalar yapıldı. Bu konuda ultrason cihazın kullanımında el becerisinin geliştirilmesi tez çalışmasının ilk dönemini oluşturmuştur. Bu dönemde aynı zamanda konuyla ilgili olarak farklı hayvan türlerinde de denemeler yapılarak manipölasyon ile ilgili tecrübe eksikliği de giderildi.

### 7.1. Testis Hacmi

Çalışma haftaları boyunca, Bafra koçlarında testis hacminde tedavi ( $p<0,05$ ), süre ( $p<0,05$ ) ve tedavi x zaman etkileşiminin ( $p<0,05$ ) etkileri somut olarak gözlemlendi (Şekil 7.1). Melatonin grubunda testis hacmi melatonin implantından sonraki özellikle 6, 9 ve 12. haftalarda istatistiksel olarak artış gösterdiği belirlendi ( $p<0,05$ ).

Melatoninin uygulamasından sonra testis hacmi etkisi 3. haftadan itibaren, melatonin grubunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 kat artış ( $42,08\pm5,97\text{ cm}^3$ 'e karşılık  $24,38\pm5,31\text{ cm}^3$ ) şekillendiği belirlendi. Melatoninin dolaşımdaki konsantrasyonunun maksimuma ulaştığı ve etkisinin de belirginleştiği 6. haftada ise hacim farklılığının melatonin ve kontrol grupları karşılaştırmasında ( $100,14\pm8,33\text{ cm}^3$ 'e karşılık  $26,42\pm7,56\text{ cm}^3$ ) yaklaşık 4 kat kadar artışın şekillendiği tespit edildi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı hale geldi ( $p<0,05$ ).



Şekil 7.1. Haftalık olarak testis hacmindeki değışiklikler

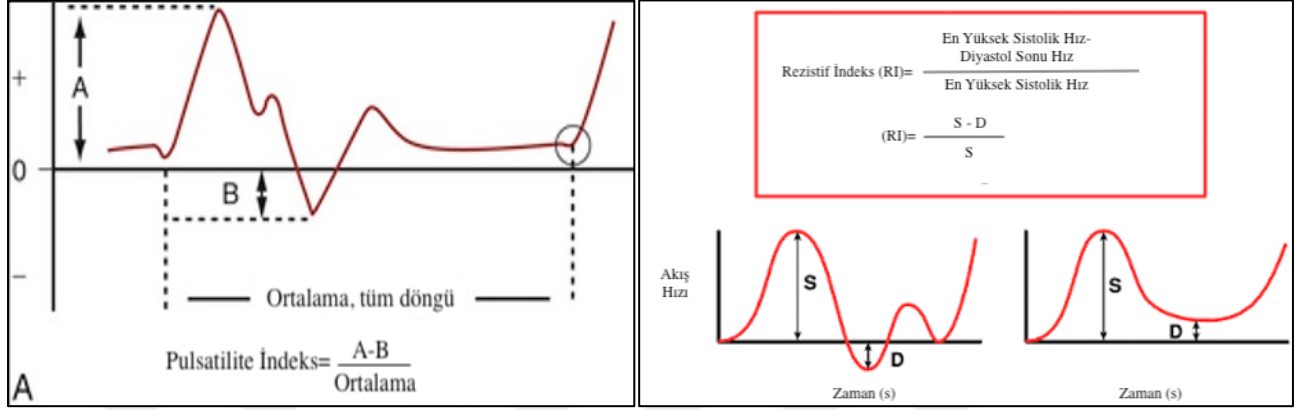
Kontrol grubundaki koçlarda mevcut testis hacmi ortalaması belirli bir azalma sergilerken, melatonin uygulanan koçlarda özellikle 3. haftadan başlayarak 6. haftaya kadar artış gözlemlenmiş ve ikinci doz melatonin uygulamasının etkisiyle 9. hafta itibari ile hacimsel artış korunmuştur. Testis hacminin doğru bir şekilde belirlenmesi testis

fonksiyonunun değerlendirilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Seminifer tübüller, testis kütlesinin %70-80'ini oluşturduğundan, testis hacmi büyük ölçüde spermatogenezisin de bir yansımasıdır (Lin et al., 2009). Racka (Sarlós et al., 2013), Karakul (Kafi et al., 2004) ve Suffolk (Oláh et al., 2013) koçlarında testis hacmi ilkbahardan yaza anlamlı olarak yüksek iken ( $p<0,05$ ), sonbahar ve kış aylarında daha düşük ölçülmüştür. Hedia et al. (2019), yağlı kuyruklu koçlar ile yaptıkları çalışmada testis hacminin en düşük ve en yüksek değerleri sırasıyla sonbahar (Ekim) ve kış başlarında (Aralık) gözlemlemişlerdir. Çeşitli çalışma sonuçları mevsime bağlı üreme özelliği gösteren küçükbaş hayvanlarda testis hacminin farklı zaman periyodları ve bölgeye göre çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Kuzey yarımkürede standart küçük baş hayvan yetiştirme mevsimi Eylül'den Aralık'a kadardır ve takip eden yıl içerisinde Şubat'tan Mayıs'a kadar ardışık bir kuzulama dönemi gerçekleşir (Maquivar et al., 2021). Bu tez çalışmasına dahil edilen koçlar fiziksel gelişimlerini tamamlamış ve çalışma sırasında vücut ağırlıklarında dalgalanma olmaması için etkili bir şekilde takip edilmişler ve aynı zamanda her iki gruptaki koçlar da aynı bakım ve besleme şartlarına maruz bırakılmışlardır. Bu nedenle testis hacmindeki değişiklikler fiziksel gelişimlerdeki dalgalanmalardan ve yönetim faktörlerinden değil melatonin etkisinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Melatoninin etkisi ile testis boyutunda şekillenen hacimsel artışı testis parankiminin doğal üreme mevsiminde olduğu gibi çoğaldığı düşünülmektedir. Melatonin uygulamasının gonadotropin salgılama kapasiteleri üzerine etkileri incelendiğinde, prolaktin düzeylerinin azaldığı, FSH ve LH seviyelerinin ise arttığı gözlemlenmektedir (Lincoln et al., 1996; Casao et al., 2010a). Tüm bu faktörler Sertoli hücrelerinin eksojen melatonin salınımına karşı FSH'ye olan hassasiyetini etkiler ve hücresel büyüme, çoğalma ve farklı testis hücre tiplerinin (myoid ve peritübüler hücre) sayısını düzenler (Frungeri et al., 2017). Melatonin ve benzeri uyaranların etkisiyle şekillenen FSH ve LH'nın yukarı regülasyonu sayesinde artan testis hacminin desteklenmesine katkıda bulunmaktadır.

## **7.2. Testis Hemodinamiği**

Melatonin uygulamasının TBF üzerindeki etkisi Tablo 7.1 ve 7.2'de sunulmuştur. PI ve RI değerlerine ilişkin hesaplama formülasyonları Şekil 7.2'de sunulmuştur. Genel olarak, gruplar arasında hafta etkisi STA'da PSV değerlerinde dikkate değer farklılıklar göstermiştir. İmplantasyondan sonra melatonin grubunda 12. haftada ( $13,93 \pm 0,96$  cm/s) STA'nın PSV değerlerinde kontrol grubuna ( $20,26 \pm 1,26$

cm/s) göre düşüşler ( $p<0,05$ ) gözlemlendi. Ayrıca, STA'da EDV değerlerinde anlamlı olmayan farklılıklara sahipti. STA'da melatonin grubundaki hayvanlar, kontrol grubuna göre daha düşük RI ve PI değerlerine sahipti ( $p<0,05$ ) ve bu değerler uygulamadan sonraki 3. hafta - 9. hafta döneminde daha düşüktü ( $p<0,05$ ) (Tablo 7.1).



Şekil 7.2. PI ve RI değerlerine ilişkin hesaplama formülasyonları

MTA'da PSV değerlerinde istatistiksel bir fark gözlenmemişken, EDV'nin 6. haftada artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Ayrıca MTA'nın PI değeri melatonin uygulanan grupta kontroldeki değerlerine kıyasla 3, 6 ve 9. haftalarda anlamlı olarak azalış gösterirken ( $p<0,05$ ), RI değerinde anlamlı azalma 6. haftada kaydedildi ( $p<0,05$ ) (Tablo 7.2).

Tablo 7.1. Çalışma gruplarında melatonin uygulamasından sonra farklı zamanlarda Suprategistiküler Arterin Renkli Doppler Ultrasonografi ile ölçülen testis kan akımındaki değişiklikler

| HAFTA | PSV        |             | EDV       |           | PI        |            | RI        |            |
|-------|------------|-------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
|       | Kontrol    | Melatonin   | Kontrol   | Melatonin | Kontrol   | Melatonin  | Kontrol   | Melatonin  |
| H -3  | 19,54±2,00 | 17,39±2,15  | 8,67±0,54 | 7,72±0,51 | 0,78±0,06 | 0,89±0,12  | 0,53±0,02 | 0,53±0,04  |
| H 0   | 14,64±1,47 | 18,46±1,89  | 8,03±0,55 | 8,00±0,52 | 0,71±0,04 | 0,91±0,09  | 0,59±0,01 | 0,50±0,05  |
| H 3   | 13,28±0,95 | 16,00±1,64  | 7,39±0,57 | 8,29±0,54 | 0,65±0,03 | 0,80±0,12* | 0,45±0,01 | 0,48±0,06* |
| H 6   | 14,73±0,88 | 15,00±0,82  | 8,30±0,60 | 7,10±0,42 | 0,65±0,05 | 0,84±0,05* | 0,43±0,02 | 0,41±0,03* |
| H 9   | 15,13±1,23 | 13,56±0,94  | 7,80±0,59 | 8,37±0,58 | 0,74±0,08 | 0,55±0,03* | 0,51±0,03 | 0,38±0,01* |
| H 12  | 20,26±1,26 | 13,93±0,96* | 8,81±1,08 | 7,08±0,58 | 0,82±0,06 | 0,71±0,04  | 0,56±0,04 | 0,49±0,02  |

Kısaltmalar: H: Hafta (analiz zaman noktası olarak), Kullanılan spektral Doppler ultrasonografinin parametreleri ve indeksleri: PSV= Tepe sistolik hız (cm/sn); EDV= Son diastolik hız (cm/sn); RI= Direnç indeksi, PI= Pulsatilité indeksi. Değerler ortalama ± SEM'dir. \*Her parametredeki değerler, iki grup arasında en az  $p<0,05$ 'te anlamlı derecede farklıdır.

Tablo 7.2. Çalışma gruplarında melatonin uygulamasından sonra farklı zamanlarda Marjinal Arterin Renkli Doppler Ultrasonografi ile ölçülen testis kan akımındaki değişiklikler

| HAFTA | PSV        |            | EDV       |            | PI        |            | RI        |            |
|-------|------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
|       | Kontrol    | Melatonin  | Kontrol   | Melatonin  | Kontrol   | Melatonin  | Kontrol   | Melatonin  |
| H -3  | 14,04±0,52 | 11,83±0,80 | 8,84±0,45 | 8,03±0,65  | 0,54±0,04 | 0,50±0,08  | 0,37±0,03 | 0,35±0,05  |
| H 0   | 12,21±0,54 | 11,53±1,12 | 8,08±0,24 | 7,50±0,69  | 0,47±0,05 | 0,55±0,07  | 0,33±0,03 | 0,38±0,05  |
| H 3   | 10,39±0,56 | 11,24±1,45 | 7,33±0,47 | 6,98±0,74  | 0,41±0,07 | 0,61±0,06* | 0,29±0,03 | 0,41±0,05  |
| H 6   | 11,26±0,76 | 11,40±0,76 | 7,08±0,60 | 8,25±0,56* | 0,54±0,07 | 0,39±0,05* | 0,35±0,04 | 0,28±0,02* |
| H 9   | 10,51±0,59 | 10,34±0,80 | 7,12±0,45 | 7,36±0,66  | 0,47±0,03 | 0,34±0,04* | 0,35±0,03 | 0,28±0,03  |
| H 12  | 13,17±0,94 | 12,47±0,92 | 8,26±0,83 | 8,04±0,69  | 0,54±0,03 | 0,48±0,04  | 0,38±0,02 | 0,35±0,01  |

Kısaltmalar: H: Hafta (analiz zaman noktası olarak), Kullanılan spektral Doppler ultrasonografinin parametreleri ve indeksleri: PSV= Tepe sistolik hız (cm/sn); EDV= Son diyastolik hız (cm/sn); RI= Direnç indeksi, PI= Pulsatilite indeks. Değerler ortalama ± SEM'dir. \*Her parametredeki değerler, iki grup arasında en az p<0,05'te anlamlı derecede farklıdır.

Yetersiz kan akışı spermatogenezisin basamaklarında aksaklıklara sebep olduğu bilinmektedir. Optimal spermatozoa üretimi için testislerin vücut sıcaklığından biraz daha düşük olması gerekmektedir. Doppler ölçümleri bu vasküler düzenlemenin etkinliğini değerlendirilmesinde son derece önemlidir. Dahası anormal kan akışı modellerinin tespiti, fertilité sorunlarının tespitinde son derece yardımcı göstergelerdir (Samir et al., 2018). Bu çalışmada incelenen koçların supratestiküler arterlerinde ölçülen testis kan akışının dalga formları monofazik ve dirençsizdi. Bu durum kan akışının dalga formunu tek bir faz veya tek bir yönde hareket ettiğini gösterir.

Çalışmamızda melatonin uygulaması yapılan koçlarda RI ve PI indeksleri kontrol grubuna kıyasla, özellikle melatonin uygulamasından sonraki 3. haftadan itibaren STA ve MTA'da azalma gösterdi. Bu değerler melatonin uygulamasından sonraki 3. hafta ile 9. hafta arasındaki dönemde kaydedildi. RI ve PI değerlerinde gözlenen azalma testiküler perfüzyonun (kan dolaşımı) artışı ve testislerin sürekli oksijen ve enerji sağlayan kaynaklara olan erişimini ifade eder (Ginther & Utt, 2004). Doppler ölçümlerinden ikisi olan PSV ve EDV değerleri arteriyel kan akışının standart kardiyovasküler döngü sırasında karakteristik göstergeleridir. Ancak bu değerler aynı organ için bile düzensiz seyredebilmektedir (Pozor & McDonnell, 2002). Renkli Doppler ultrasonografi tarafından tespit edilen RI ve PI testis damarlarının anatomik yapısı ve kan akış hızı hakkında daha sağlam veriler sunmaktadır (Biagiotti et al., 2002). Melatonin mevsimsel üreme karakteristiği sergileyen memelilerde Hipotalamus-Hipofiz-Gonadal eksenini farklı düzeylerde uyarak testiküler kan akışını ve sperma kalitesini etkileyebilir (Lincoln & Clarke, 1994). Eksojen melatonin

uygulamaları ile gözlenen farklı vasküler etkiler koç üreme sisteminde bulunan melatonin reseptörleri M1 ve M2'nin göreceli dağılımına bağlanmaktadır (Cook et al., 2011; González-Arto et al., 2017). Bu nedenle üreme sezonu dışında uygulanan melatonin hormonunun, M1 ve M2 reseptörlerinin sayısında artışa neden olabileceği hipoteziyle testislerdeki kan akışında artışı takip etmek amacıyla Doppler ultrasonografi kullanıldı. Testisteki kan akımı testislere oksijen ve enerji sağlamak ve metabolik artıkları uzaklaştırmak açısından kritik bir öneme sahiptir (Samir et al., 2018). Salama et al. (2022) ve Samir et al. (2021), STA'deki RI ve PI Doppler indeksleri, kan hızı parametrelerinin (PSV ve EDV), testis hacmi ve testis içi renkli alanlar ile güçlü bir negatif korelasyona sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu bulgular melatonin uygulamasının testis kan akışında belirgin bir artışa neden olduğunu göstermektedir. Melatoninin damar genişletici etkisi koç üreme sisteminde tanımlanan M2 reseptörlerine bağlanmasından kaynaklanabilir (González-Arto et al., 2017).

Samir et al. (2018), mevsimsel üreme özelliği göstermeyen Shiba koçlarında testis kan akışının mevsimsel döngüden etkilenip etkilenmediğini araştırdıkları çalışmada testiküler artere ait direnç indeksi (RI) ve pulsasyon indeksi (PI) değerlerinin en düşük seviyelerini kış mevsiminde kaydetmişlerdir. Bu değişiklikleri küçükbaş hayvanlarda üremenin mevsimselliğini etkileyen temel faktör olarak kabul edilen fotoperiyoda ve melatoninin sirkadiyen ritmik salgılanmasına bağlamışlardır. Tez projemizde elde ettiğimiz sonuçlar melatonin uygulamasının testis arterlerindeki kan perfüzyonunu artırdığını göstermektedir ve bu bulgular, Samir et al. (2018) çalışmasıyla uyumlu olup benzer sonuçları desteklemektedir. Hedia et al. (2019), yapmış oldukları çalışmada yaz aylarında testis hacmindeki önemli bir azalmayı RI ve PI'deki artışla yani testis kan akışındaki azalmayla ilişkilendirmişler. Bu sonuçlar, üreme mevsimi dışında kontrol grubunda RI ve PI değerlerinde bir artış gözlemlediğimiz için bu tez çalışmasının sonuçlarıyla uyumludur. Samir et al. (2020) tarafından bildirildiği üzere Shiba keçilerine deri altı yoluyla tek bir yavaş salınım melatonin implantı uygulandığında benzer sonuçlar gözlemlenmiş ve bu uygulamanın erkek keçilerin fertilitite potansiyelini artırabileceği belirlenmiştir. Ayrıca, Zelli et al. (2013) tarafından yapılan çalışmada, testiküler RI ve PI değerlerinin köpeklerde sperm kalitesi parametreleriyle, Biagiotti et al. (2002), tarafından yapılan bir çalışmada ise insanlarda cinsel işlev bozukluğu ile yüksek oranda korele olduğu gösterilmiştir. Sonuçlarımız, melatonin uygulamasından sonraki dördüncü haftadan itibaren testiküler RI ve PI değerlerinde benzer bir düşüş gözlemlenen Ossimi koçları üzerinde

yapılan El-Shalofy et al. (2022) çalışması ile uyumludur. Tez projemizden elde edilen verilerden farklı olarak ekzojen melatonin uygulaması etkisinin başlangıcındaki şekillenen küçük farklılığa ise mevsimsel varyasyonların neden olabileceği düşünülmektedir.

### **7.3. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi**

Spermatolojik parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla sperma hacmi, total spermatozoa motilitesi ve yoğunluk parametrelerinin sonuçları Tablo 7.3'te, spermatozoon canlılığı, plazma membran bütünlüğü ve spermatozoa morfolojisi Tablo 7.4'te sunulmuştur. Sperma miktarı, spermatozoonun total ve progresif motilite yüzdesi ile sperma yoğunluğu açısından çalışma sırasında iki grup arasında fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ). Melatonin uygulamasının bazı temel spermatolojik parametreler üzerindeki olumlu etkisi, spermatozoon canlılığı değerinde (3. hafta ve 12. haftada), plazma membran bütünlüğü değerinde (3. hafta ve 12. hafta aralığında) ve normal morfoloji değerinde (12. haftada) görüldü ( $p<0,05$ ).

Çalışma kapsamında tüm gruplara ait kinematik parametreler Tablo 7.5'te sunulmuştur. Kinematik parametrelerden VCL, VAP, WOB, ALH ve BCF değerlerinde kontrol ve melatonin uygulama grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilemedi ( $p>0,05$ ). Kinematik parametrelerden VSL değerinde özellikle 12. haftada melatonin grubunda belirgin bir artış söz konusu olmuştur ve bu durum diğerlerinden farklılık arz etmiştir ( $p<0,05$ ). Yine STR ve LIN değerlerinde 3. haftada ve 12. haftada istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit belirlendi ( $p<0,05$ ). Bu artışın sebebinin ekzojen melatonin uygulamalarında dolaşımdaki artışın ve asıl etkinliğin 3. haftadan itibaren şekillenmesine bağlı olarak oluştuğunu düşünüyoruz.

Tablo 7.3. Melatonin uygulamasının sperma miktarı, total spermatozoa motilitesi, progresif motilite ve yoğunluk parametrelerindeki değişimlere etkileri

| HAFTA | Sperma Miktarı (ml) |           | Total Motilite (%) |            | Progresif Motilite (%) |            | Yoğunluk x10 <sup>9</sup> sperm/ml |           |
|-------|---------------------|-----------|--------------------|------------|------------------------|------------|------------------------------------|-----------|
|       | Kontrol             | Melatonin | Kontrol            | Melatonin  | Kontrol                | Melatonin  | Kontrol                            | Melatonin |
| H -3  | 0,73±0,10           | 0,52±0,10 | 93,75±3,50         | 93,88±1,30 | 73,33±10,10            | 70,74±3,90 | 1,37±0,70                          | 0,99±0,80 |
| H 0   | 0,63±0,10           | 0,49±0,20 | 90,56±0,90         | 92,95±2,30 | 72,76±4,40             | 71,43±2,80 | 1,18±0,30                          | 1,07±0,40 |
| H 3   | 0,81±0,60           | 0,60±0,20 | 97,48±0,60         | 96,28±0,90 | 85,83±3,20             | 77,81±5,20 | 1,30±0,20                          | 1,32±0,80 |
| H 6   | 0,80±0,10           | 1,09±0,20 | 97,67±1,10         | 96,25±2,40 | 84,56±1,50             | 80,83±6,70 | 1,36±0,50                          | 1,31±0,20 |
| H 9   | 0,90±0,10           | 1,20±0,20 | 93,89±2,40         | 97,07±0,80 | 77,00±6,10             | 82,44±2,60 | 1,10±0,30                          | 1,12±0,40 |
| H 12  | 0,93±0,20           | 1,54±0,50 | 92,23±1,10         | 95,86±1,40 | 74,47±5,50             | 85,96±2,40 | 1,00±0,50                          | 0,81±0,10 |

Kısaltmalar: H: Hafta. Değerler ortalama ± SEM'dir.

Tablo 7.4. Melatonin uygulamasının spermatozoa canlılığı, plazma membran bütünlüğü (HOST) ve morfolojik değerlendirme parametrelerindeki değişimlere etkisi

| HAFTA | Canlılık (%) |             | HOST (%)   |             | Morfoloji (%) |             |
|-------|--------------|-------------|------------|-------------|---------------|-------------|
|       | Kontrol      | Melatonin   | Kontrol    | Melatonin   | Kontrol       | Melatonin   |
| H -3  | 72,00±2,90   | 76,40±1,80  | 69,50±2,10 | 75,80±1,60  | 90,00±1,70    | 93,20±0,90  |
| H 0   | 80,10±0,90   | 81,00±1,50  | 77,25±1,70 | 79,36±1,10  | 91,00±0,90    | 93,52±1,30  |
| H 3   | 87,50±1,40   | 84,00±1,30* | 80,40±0,90 | 82,50±0,90* | 91,00±1,40    | 93,00±0,50  |
| H 6   | 84,75±1,30   | 81,60±0,60  | 82,75±2,10 | 78,20±2,80  | 92,50±0,80    | 92,80±0,80  |
| H 9   | 78,00±1,50   | 78,40±1,20  | 77,50±0,90 | 79,60±1,60  | 91,25±1,30    | 93,80±0,50  |
| H 12  | 78,25±1,10   | 82,80±1,80* | 74,00±1,90 | 82,80±1,80* | 90,25±1,40    | 94,80±0,50* |

Kısaltmalar: H: Hafta. Değerler ortalama ± SEM'dir. Genel olarak aynı örnekleme periyodundaki tedavi grupları arasındaki üst simge \* önemli farklılıklar anlamına gelir (p<0,05).

Tablo 7.5. Melatonin uygulamasının kinematik spermatozojik parametrelerdeki değişikliklere etkisi

|                  |                  | VCL $\mu\text{m/s}$ | VAP $\mu\text{m/s}$ | VSL $\mu\text{m/s}$ | STR $\mu\text{m/s}$ | LIN $\mu\text{m/s}$ | WOB $\mu\text{m/s}$ | ALH $\mu\text{m/s}$ | BCF $\mu\text{m/s}$ |
|------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>-3. Hafta</b> | <b>Kontrol</b>   | 80,37 $\pm$ 11,20   | 50,08 $\pm$ 8,01    | 31,83 $\pm$ 6,46    | 58,69 $\pm$ 2,49    | 38,49 $\pm$ 3,05    | 61,59 $\pm$ 1,98    | 3,34 $\pm$ 0,34     | 6,93 $\pm$ 0,50     |
|                  | <b>Melatonin</b> | 92,16 $\pm$ 10,05   | 67,06 $\pm$ 7,14    | 45,33 $\pm$ 4,50    | 64,26 $\pm$ 2,15    | 48,12 $\pm$ 2,59    | 70,55 $\pm$ 1,66    | 3,33 $\pm$ 0,37     | 6,54 $\pm$ 0,25     |
| <b>0. Hafta</b>  | <b>Kontrol</b>   | 105,22 $\pm$ 14,02  | 60,92 $\pm$ 9,70    | 36,91 $\pm$ 7,59    | 55,85 $\pm$ 2,48    | 34,2 $\pm$ 2,46     | 57,98 $\pm$ 1,80    | 4,48 $\pm$ 0,45     | 6,79 $\pm$ 0,43     |
|                  | <b>Melatonin</b> | 107,99 $\pm$ 8,64   | 74,99 $\pm$ 5,75    | 49,93 $\pm$ 4,51    | 63,97 $\pm$ 2,56    | 46,78 $\pm$ 3,56    | 68,70 $\pm$ 2,56    | 3,77 $\pm$ 0,46     | 7,29 $\pm$ 0,16     |
| <b>3. Hafta</b>  | <b>Kontrol</b>   | 130,27 $\pm$ 16,85  | 71,76 $\pm$ 11,39   | 42 $\pm$ 8,72       | 53,02 $\pm$ 2,47    | 29,92 $\pm$ 1,87    | 54,37 $\pm$ 1,63    | 5,63 $\pm$ 0,57     | 6,65 $\pm$ 0,37     |
|                  | <b>Melatonin</b> | 123,83 $\pm$ 7,23   | 82,93 $\pm$ 4,37    | 54,53 $\pm$ 4,53    | 63,69 $\pm$ 2,98*   | 45,44 $\pm$ 4,54*   | 66,86 $\pm$ 3,46*   | 4,22 $\pm$ 0,55     | 8,05 $\pm$ 0,77     |
| <b>6. Hafta</b>  | <b>Kontrol</b>   | 92,68 $\pm$ 10,38   | 67,26 $\pm$ 8,17    | 47,8 $\pm$ 6,06     | 67,6 $\pm$ 2,32     | 51,47 $\pm$ 3,21    | 71,26 $\pm$ 1,79    | 3,30 $\pm$ 0,38     | 7,64 $\pm$ 0,23     |
|                  | <b>Melatonin</b> | 104,47 $\pm$ 11,28  | 69,35 $\pm$ 6,92    | 47,58 $\pm$ 6,40    | 63,13 $\pm$ 4,52    | 44,73 $\pm$ 6,46    | 65,14 $\pm$ 5,03    | 3,99 $\pm$ 0,60     | 6,62 $\pm$ 0,60     |
| <b>9. Hafta</b>  | <b>Kontrol</b>   | 97,96 $\pm$ 6,65    | 75,75 $\pm$ 6,03    | 58,91 $\pm$ 4,30    | 69,78 $\pm$ 0,83    | 54,40 $\pm$ 1,39    | 72,94 $\pm$ 1,57    | 3,13 $\pm$ 0,17     | 7,24 $\pm$ 0,12     |
|                  | <b>Melatonin</b> | 87,68 $\pm$ 8,90    | 62,31 $\pm$ 9,43    | 46,32 $\pm$ 8,65    | 66,67 $\pm$ 3,80    | 48,64 $\pm$ 5,05    | 67,86 $\pm$ 4,07    | 3,25 $\pm$ 0,13     | 6,63 $\pm$ 0,75     |
| <b>12. Hafta</b> | <b>Kontrol</b>   | 106,45 $\pm$ 17,59  | 81,74 $\pm$ 14,64   | 57,15 $\pm$ 8,57    | 64,44 $\pm$ 1,48    | 49,19 $\pm$ 0,86    | 71,81 $\pm$ 1,49    | 3,55 $\pm$ 0,50     | 7,71 $\pm$ 0,64     |
|                  | <b>Melatonin</b> | 115,21 $\pm$ 1,85   | 94,18 $\pm$ 5,01    | 76,3 $\pm$ 17,14*   | 76,54 $\pm$ 4,79*   | 64,31 $\pm$ 6,83*   | 65,33 $\pm$ 15,18   | 3,18 $\pm$ 0,41     | 8,11 $\pm$ 0,25     |

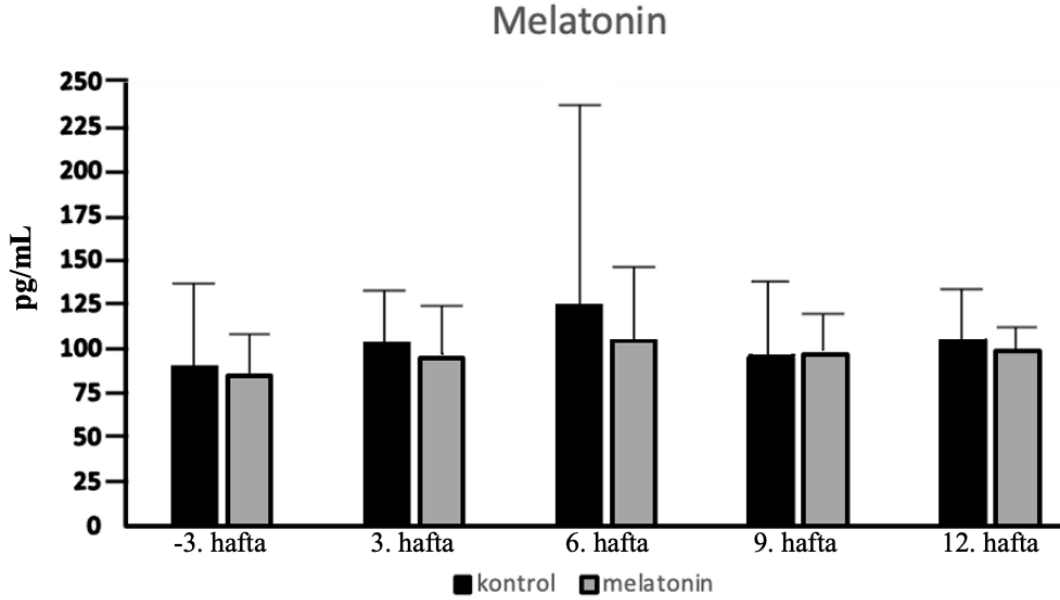
\*Her parametredeki değerler, iki grup arasında en az p<0,05'te anlamlı derecede farklıdır.

Koçlarda üreme mevsimi dışında eksojen melatonin uygulamasının spermatolojik parametreler üzerine etkisinin araştırıldığı önceki çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ramadan et al. (2009), Damascus tekelerinde fotoperiyodik uyarım ve melatonin uygulamasının spermatolojik parametreler üzerindeki pozitif etkilerini üreme sezonu dışında belirgin olmadığını bildirmişlerdir. Egerszegi et al. (2014), siyah Racka koçlarında üreme sezonu dışında melatonin uygulamasının spermatolojik parametreler üzerinde etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışma bulguları tez projemizin sonuçları ile örtüşmektedir. Buna karşın bazı çalışmalarda üreme sezonu dışında melatonin uygulamasının mandalarda (Ramadan et al., 2019), tekelerde (Vince et al., 2017) ve koçlarda (El-Shalofy et al., 2022) spermatolojik parametreler üzerinde olumlu etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Bununla birlikte Casao et al. (2010b) üreme sezonu dışındaki koçlarda melatonin implantlarının spermatolojik parametreleri üzerinde bir etkisi olduğunu gözlemlemiş ve bu etkiyi implantasyondan yaklaşık 91-105 gün sonra belirlemişlerdir. Sunulan projemizde, melatonin uygulamasının çalışma süresi boyunca spermatolojik parametreler üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna ulaşıldı. Gözlenen etki eksikliği çalışmamızın süresinin Casao et al. (2010b), tarafından yürütülen çalışma ile karşılaştırıldığında çalışmamızın süresinin daha kısa olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Önceden öngördüğümüz bu duruma rağmen, koçların haziran ayı ortalarından itibaren sürüyle birlikte yaylaya çıkmalarının zorunlu olması, ne yazık ki takip süresini yeterince uzatmamıza imkân tanımamıştır. Koçlarda melatonin implantlarının uygulanmasını takiben testis morfolojisinde meydana gelen değişimlerin 6-8 hafta sürebileceği ve spermatogenezis için gereken sürecin 7-9 hafta olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda çalışmamızdan farklı olarak eksojen melatonin implantının uygulanmasından sonraki 15-17. haftalar içerisinde yapılabilecek bir spermatolojik muayenenin melatonin etkisinin daha net bir şekilde değerlendirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Bafra ırkı koyunları ve koçları Sakız x Karayaka koyunlarının melezlenmeleri sonucu oluşan bir ırktır. Bireysel olarak Sakız (Aytekin ve Öztürk, 2012) ve Karayaka (Olfaz vd., 2010) ırkı koyunlarının reproduktif verimlilikleri diğer koyun ırklarına nazaran mevsimsellikten daha az etkilenmektedir. Bu durum proje kapsamında üreme sezonu dışında Bafra koçlarında melatonin uygulamasının spermatolojik parametrelere pozitif

bir etkisinin daha az gözlemlendiğini ya da gözlenmediğini açıklayabilir. Bu durum kısmen üreme sezonu dışında melatonine maruz kaldıklarında Bafra koçlarında sperma kalitesindeki genel iyileşme eksikliğini açıklayabilir. Aynı şekilde melatonin grubundaki birçok koç melatonin implantasyonundan önce yüksek kalitede spermatolojik parametrelere sahipti ve koyun üreme programlarında aktif olarak kullanılmaktaydılar. Bu durum, proje dahilinde olan koçlarda melatonin implantlarının spermatolojik parametreler üzerindeki etki eksikliğini açıklayabilir. Ancak böyle bir varsayımda bulunmadan önce daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

#### **7.4. Biyokimyasal Analizler**

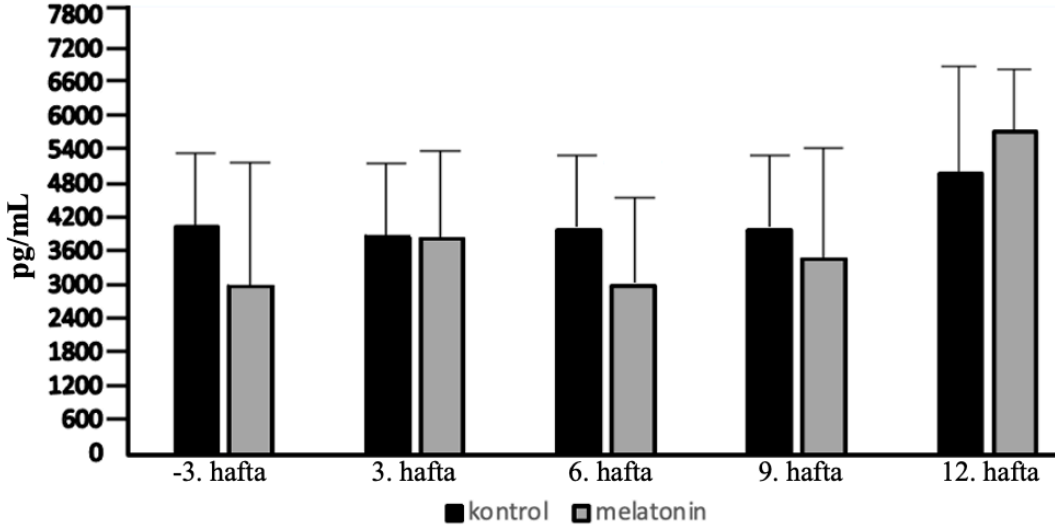
Haftalara göre gruplar arası melatonin seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 7.2’de sunulmuştur. Serum örneklerinden ELISA yöntemi ile yapılan melatonin miktar tayin sonuçlarına göre, -3, 3, 6, 9 ve 12. haftalarda kontrol ve melatonin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ). Melatonin uygulanan grupta özellikle 9. ve 12. hafta ölçümlerinde artış olduğu saptanmış olup, bu durum istatistiksel olarak bir önem arz etmedi ( $p>0,05$ ). Bu durumun verilerin dağılımındaki düzensizlikten kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca tez çalışma kapsamında incelenen bazı reproduktif parametrelerde artış gözlemlediğimiz göz önüne alındığında, melatonin konsantrasyonundaki değişikliklerin hipotalamus ve hipofizin lokalize seviyesinde meydana geldiği ve bir etkinin ortaya çıktığı varsayılabilir. Melatonin konsantrasyonlarının karanlık saatlerde arttığı bilindiğinden, gündüz saatlerinde veri toplanması da bu sonucu etkilemiş olabilir (Pool et al., 2020).



Şekil 7.2. Haftalara göre gruplar arası melatonin seviyelerinin karşılaştırılması

Haftalara göre gruplar arası testosteron seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 7.3'te sunulmuştur. Serum örneklerinden ELISA yöntemi ile yapılan testosteron miktar tayin sonuçlarına göre, -3, 3, 6, 9 ve 12. haftalarda kontrol ve melatonin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ). İstatistiksel olarak anlamlılık şekillenmese de, 6. haftaya kadar 3000 pg/ml düzeylerinde seyreden testosteron seviyeleri, melatonin uygulamasının etkisinin dolaşımda kendini göstermeye başladığı 9. haftada 3500 pg/ml'ye ve 12. haftada ise belirgin bir artış kaydederek 5500-6000 pg/ml seviyelerine ulaşmıştır. Muhtemelen verilerin parametrik dağılmamasından kaynaklı olsa gerek istatistiksel olarak bu farklılık belirlenememiş olabilir ( $p>0,05$ ).

## Testosteron



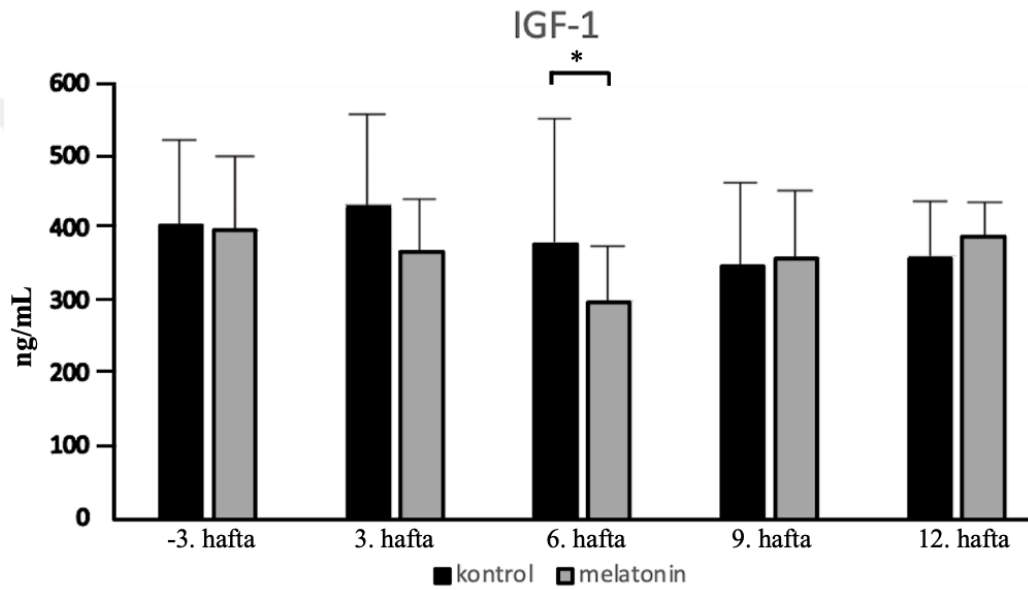
Şekil 7.3. Haftalara göre gruplar arası testosteron seviyelerinin karşılaştırılması

Melatonin ön hipofiz üzerinde doğrudan merkezi bir etki ve Leydig hücreleri üzerindeki insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) reseptörlerini artırarak dolaylı etkiler dâhil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla testosteron üretimini etkileyebilir (Deng et al., 2018). Koçta testosteron öncelikle testislerdeki Leydig hücrelerinden salgılanır ve libido, sperma üretimi ve kalitesi ile pozitif olarak ilişkilidir. Çalışmamızda melatonin uygulanmış koçlarda plazma testosteronunun implantasyondan sonra 12. haftada istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükselişini gözlenmiş olup bu önceki çalışmalarla örtüşmektedir (Kaya vd., 2000). Koçlara dışarıdan verilen melatonin muhtemelen melatonin reseptörlerinin ifadesini artırarak testosteron salınımını artırır ve testosteronun östrojene dönüşümünü azaltır. Muhtemelen eksojen uygulanan melatonin hedef hücrelerde reseptör artışının ve uyarımların ancak 12. haftalarda gerçekleştirebilmektedir. Bu nedenle melatonin uygulanan koçlar dışarıdan verilen melatonin takip eden üreme döneminde daha fazla testosteron üretebilirler (Pool et al., 2020). Daha önce de belirtildiği gibi hormon salınımı ve reseptör ifadelerindeki artış ayrıca ırk düzeyindeki duyarlılık veya dirençle de doğrudan etkilenebilmektedir.

Koç seminal plazmasındaki testosteronun mevsimsel değişimi melatonininden biraz daha düşüktür (Casao et al., 2010a). Kontrol ve melatonin grubunu oluşturan hayvanlar, çalışmanın -3.haftasından itibaren yüksek sperma kalitesine sahipti. Çalışma ve kontrol grubu arasında sperma kalitesi açısından çalışmanın başlangıcından itibaren bir fark gözlenmediğinden dolayı melatoninin spermatolojik parametreler üzerindeki pozitif etkisi tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu durum, hormon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın elde edilememesine sebep

olabilir. Hormon ölçümleri için kullanılan ELISA yönteminde numunelerin hazırlanması, kullanılan ekipman ve kit prosedürlerinin uygulanması sırasında uygulayıcı kaynaklı hataların sonuçları etkileme potansiyeline sahip olduğu unutulmamalıdır (Punchoo & Bhoora, 2021).

Haftalara göre gruplar arası insülin benzeri büyüme faktör-1 (IGF-1) seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 7.4'te sunulmuştur. Serum örneklerinden ELISA yöntemi ile yapılan insülin benzeri büyüme faktör-1 miktar tayin sonuçlarına göre, -3, 3, 9 ve 12. haftalarda kontrol ve melatonin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken ( $p>0,05$ ), 6. hafta da melatonin grubunda kontrol grubuna



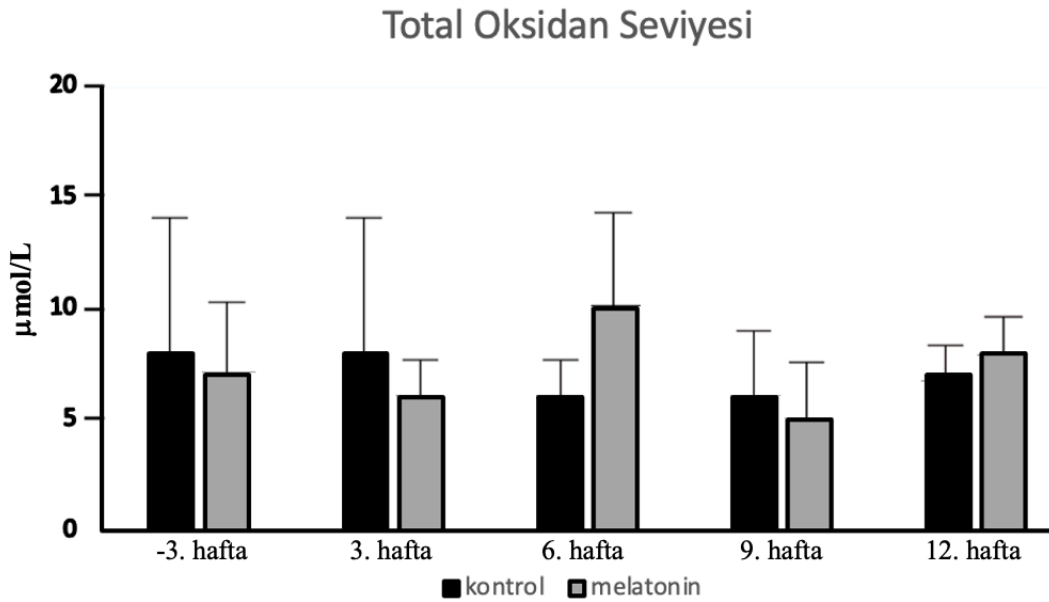
kıyasla anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır ( $p<0,05$ ).

Şekil 7.4. Haftalara göre gruplar arası IGF-1 seviyelerinin karşılaştırılması, \*; ( $p<0,05$ )

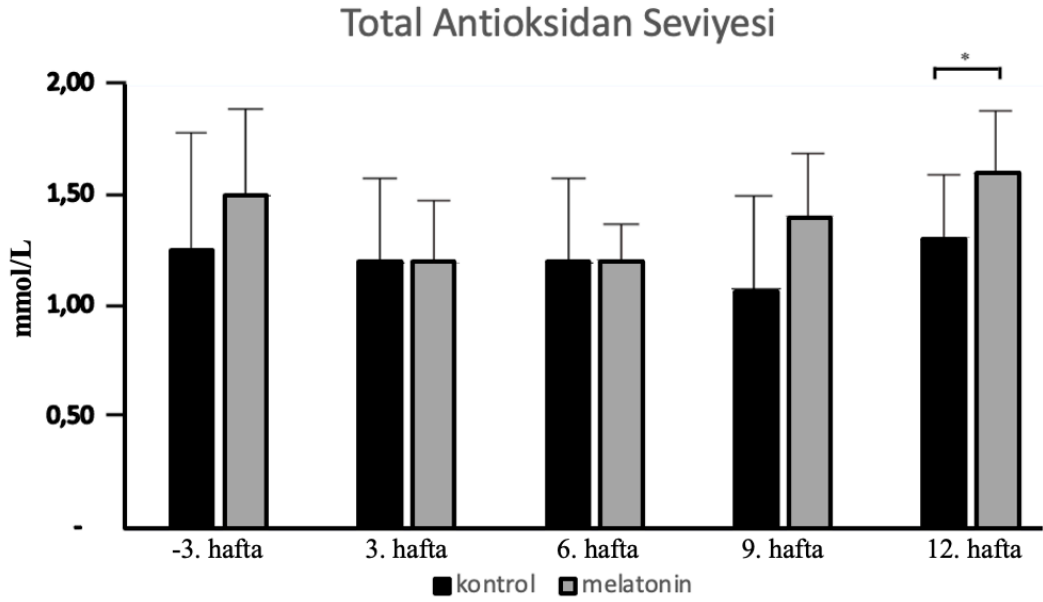
Fotoperiyodun koçların LH ve testosteron salgılanması, cinsel aktivite, testisin hacimsel artışı ve spermatozoa üretimi dahil olmak üzere hemen hemen tüm üreme özelliklerinde değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Muhtemelen verilerin parametrik dağılmamasından kaynaklı istatistiksel farklılık belirlenememiş olsa bile melatonin implant uygulaması IGF-1 düzeyinde bir artış sağlamıştır. Melatonin, ön hipofiz üzerinde doğrudan merkezi bir etki ve Leydig hücreleri üzerindeki IGF-1 reseptörlerini artırarak dolaylı etkiler dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla testosteron üretimini etkileyebilir (Deng et al., 2018). Kajdaniuk et al. (2002), yaptıkları çalışmada melatonin ile IGF-1 seviyeleri arasında negatif bir ilişki olduğu bulunmuştur. IGF-1 ve melatonin arasındaki olası negatif ilişki, bu iki bileşiğin fizyolojik sirkadiyen ritmine dayandırılabilir. Melatonin en yüksek seviyeye karanlık

zamanlarda ulaşırken, IGF-1 sabahları maksimum seviyelere ulaşır. Kontrol grubunda 6.haftada gözlenen IGF-1 düzeyindeki anlamlı artış melatonin ve IGF-1 arasındaki negatif ilişkiden kaynaklı olabilir.

Haftalara göre gruplar arası total oksidan seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 7.5'te, total antioksidan seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 7.6'da sunulmuştur. Serum örneklerinden ELISA yöntemi ile yapılan total oksidan tayin sonuçlarına göre, -3., 3., 6., 9. ve 12. haftalarda kontrol ve melatonin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ). Yapılan total antioksidan tayin sonuçlarına göre, -3., 3., 6. ve 9. haftalarda kontrol ve melatonin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, 12. hafta da melatonin grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğu saptandı ( $p<0,05$ ).



Şekil 7.4. Haftalara göre gruplar arası total oksidan seviyelerinin karşılaştırılması



Şekil 7.5. Haftalara göre gruplar arası total antioksidan seviyelerinin karşılaştırılması, \*, ( $p < 0,05$ )

Tez çalışmamızda, çalışma grupları arasında TOS açısından bir fark gözlenmezken, 12. haftada melatonin grubunda TAS daha yüksek bulunmuştur. Melatoninin antioksidan rolü potansiyel olarak oksidatif strese maruz kalan patofizyolojik koşullarda gözlenmektedir (Malhotra et al., 2004). Bu çalışmadaki hayvanlar melatoninin bu önemli rolünü ortaya çıkaracak stresli koşullar altında bulunmuyorlardı. Melatonin mitokondri ve plazma membranını serbest radikallerden, lipid peroksitlerden ve reaktif oksijen türlerinden koruyarak membran bütünlüğünü artırabilir. Bununla beraber eksojen melatonin kullanımını içeren çalışmalar göstermektedir ki, melatonin uygulaması morfolojik olarak normal spermatozoa oranını önemli ölçüde iyileştirir (García et al., 1997; Kaya vd., 2000). Bu nedenle, 12. haftada TAS'daki önemli artış, 12. haftada plazma membran bütünlüğünde ve normal spermatozoa'daki anlamlı artış ile ilişkilendirilebilir.

### 7.5. KISS1 Geni İfade Düzeyi Sonuçları

Kontrol ve melatonin gruplarındaki *KISS1* gen ifade düzeyleri arasındaki farklılıklar haftalara göre kategorize edilip analiz edildi. Melatonin grubunda, -3. haftada *KISS1* geninin ifade düzeyleri kontrol grubuna göre 6,16 kat artmışken, 3. haftada melatonin grubunda kontrol grubuna göre 0,49 kat azalma gözlenmiştir. Uygulamaların 6. haftasında, melatonin grubunda *KISS1* gen ifade düzeyleri kontrol grubuna göre 0,16 kat azalma göstermiştir. Devam eden süreçte 9. haftada yapılan ölçümlerde ise melatonin grubunda *KISS1* geni ifade düzeylerindeki azalış devam etmiş ve kontrol grubuna göre 0,98 kat azalmıştır. Takip sürecinin son ölçümleri olan

12. haftada, melatonin grubunda *KISS1* geni ifade düzeyi kontrol grubuna göre 0,84 kat azalmış olup, bu veriler istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).

Kontrol ve melatonin grupları arasındaki *KISS1R* gen ifade düzeylerindeki farklılıklar da haftalara göre kategorize edilip analiz edildi. Çalışmanın -3. haftasında melatonin grubunda *KISS1R* gen ifade düzeyleri, kontrol grubuna göre 12,91 kat artmıştır. Melatonin uygulanan gruptaki *KISS1R* gen ifade düzeyleri 3. haftada bir önceki ölçüme göre azalmış olmakla birlikte, melatonin grubunda kontrol grubuna göre 1,74 kat artmıştır. Benzer şekilde 6., 9. ve 12. haftalarda yapılan *KISS1R* gen ifade düzeyi karşılaştırmalarında artışlar melatonin grubu lehine olmuştur. Bu artışlar sırasıyla 6., 9. ve 12. haftalarda sırasıyla 2,33; 1,19 ve 1,50 katlık artışlar olarak belirlenmiş olup bu veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Bu tez çalışmamızda, *KISS1* geninin mevsimsel üremedeki potansiyel rolünü belirlemek için spermatozoa düzeyinde ifadesinin değişikliklerini inceledik. *KISS1* geninin ürünü olan kisspeptinler omurgalılarda üreme sistemini yöneten hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin kontrolünde kritik bir rol oynar. Ayrıca kisspeptin proteinleri pubertanın düzenleme mekanizmasında rol oynarlar (Smith, 2012). Kisspeptinin eksojen uygulaması puberta öncesi ve sonrasında hem GnRH hem de gonadotropinlerin salgılanmasını uyarır. Benzer şekilde pubertal gelişim sürecinde *KISS1* ve *KISS1R* genlerinin ekspresyonunda artışlar gözlemlenmiştir. Bununla birlikte *KISS1R*'nin kisspeptin uygulaması ile aktivasyonu pubertaya ulaşmamış hayvanlarda gonadotropik eksenin aktivasyonunu indüklemek için yeterli görünmektedir (Luridiana et al., 2016). Li et al. (2015), hamsterlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada ekzojen melatonin uygulamasının *KISS1* gen ekspresyonu üzerinde önemli etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Boufermes et al. (2014), sezonluk üreme özelliği gösteren kemirgen türünde (*Meriones libycus*) yapmış oldukları çalışmada *KISS1* gen ekspresyonun üreme sezonu içerisinde, üreme sezona dışına göre daha yüksek bulmuşlardır.

Çalışmalar *KISS1* geninin testis (Han et al., 2020), ovaryum (Castellano et al., 2006), yağ doku, pankreas ve karaciğer (Hsu et al., 2014; Dudek et al., 2016) gibi periferik dokularda lokal olarak ifade edildiğini göstermektedir. Yapılan literatür taramaları doğrultusunda varılan sonuca göre çalışmamız koç spermasından *KISS1* gen ifade düzeyinin belirlendiği ilk çalışma olma özelliği göstermektedir. Çalışma sonuçlarımıza göre *KISS1* ve *KISS1R* genlerinin ifade düzeyleri koç spermatozoasında ortaya koyulmuştur. Ayrıca çalışmamızda *KISS1R* gen ifade düzeyinin *KISS1* gen

ifade düzeyine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Proteine translasyonunun eşdeğer bir şekilde belirgin bir yükseklik göstermemesi ilginç görülmektedir. Yine aynı şekilde koyun beyninin preoptik alanında (POA) ve arkuat çekirdeğinde (ARC) bulunan Kiss nöronal popülasyonlarının boyutu üzerindeki fotoperiyodik değişikliğinin etkisini belirlemeyi amaçlayan Chalivoix et al. (2010), koyunlarda mevsimsel üremenin nöroendokrin kontrolü için iki önemli hipotalamik alanda (POA ve ARC) Kisspeptin içeriğinin modülasyonu indüklediğini ortaya koymuşlardır. Bu veriler melatoninin *KISS1* gen ekspresyonu üzerinde bir etkisi olduğunu göstermektedir. Melatonin hormonu, hipotalamus-hipofiz-gonadal sistem üzerine etki ettiği genel olarak kabul edilmektedir (Díaz López et al., 2005). Melatonin adenohipofizin gonadotropik fonksiyonlarını düzenlemek için GnRH ve/veya GnIH üretmek üzere hipotalamik nöronları etkileyen kisspeptinden başlayarak endokrin eksenini kontrol etmede kritik bir rol oynar. Bu nedenle *KISS1* ve *KISS1R* gen bölgelerinin erkeklerde mevsimsel üreme üzerinde belirli bir etkisi olabilir. Ancak şimdiye kadar *KISS1* ve *KISS1R* geninin koçların üreme sistemi üzerine etkilerine dair bir kanıt rapor edilmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada koçların mevsimsel üreme özelliğinin araştırılması için melatonin hormonu ile ilişkili olduğu düşünülen *KISS1* ve *GPR54* geni seçilmiştir.

Ansel et al. (2010), mevsimsel üreme özelliği gösteren Suriye hamsterlarında, melatonin ve seks steroidlerinin ARC (Arcuate çekirdek) ve AVPV (Anteroventral preoptic çekirdek) bölgelerinde *KISS1* gen ekspresyonunu farklı şekillerde düzenleyip düzenlemediğini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu çalışmada AVPV ve ARC'deki *KISS1* geninin melatonine farklı yanıt verdiğini bildirmişlerdir. Suriye hamsterlarında üreme fonksiyonunun mevsimsel kontrolünün anahtar noktasının ARC'deki *KISS1* geni olduğunu işaret etmektedir.

Okafor et al. (2020), sıçanlarda yapmış oldukları çalışmada testisten yapılan *KISS1* gen izolasyonunda tüm deney gruplarının *KISS1* gen ekspresyonunun ifade düzeyinde bir fark olduğu bildirilmemiştir. Han et al. (2020), keçiler üzerinde yapmış oldukları çalışmada seminifer tübüllerde bulunan spermatidlerde *KISS1* gen ekspresyonunun şiddetinin yüksek olduğunu, primer spermatositlerde ise zayıf olduğunu göstermişlerdir. Aynı şekilde *GPR54*'ün ifadesinin keçi Sertoli hücrelerinde güçlü, spermatidlerde ise zayıf olduğunu tespit etmişlerdir. Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler spermatozoadan elde edilen *KISS1* gen ifade düzeyinin yeterli bir ekspresyon seviyesine ulaşamadığını, bu sebeple Bafra

koçlarında *KISS1* gen seviyesinin mevsimsel kontrolün esas göstergesi olup olmadığı konusunda şüpheleri de beraberinde getirmektedir.

Xia et al. (2020), yıl boyu üreme davranışı gösteren Han ve Sutine koç ırklarının hipotalamuslarından yapılan *KISS1* gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre *KISS1* gen ekspresyonunun Han koçlarında Sutine koçlarına göre daha fazla eksprese olduğunu bildirilmiştir. Hipotalamusta saptanan bu farklılık testis dokusu düzeyinde yeterli bir şekilde ifade edilememiştir. *GPR54* ekspresyonu ise çeşitli dokularda karşılaştırması yapılmış olup Sutine koçlarında Han koçlarına göre en yüksek testis ve vas deferenste eksprese edildiğini ortaya koymuşlardır. Mevcut tez çalışmamızdan farklı olarak gen ekspresyon seviyelerinin farklı cins ve farklı hedef bölge kullanılarak karşılaştırılması yapılan bu çalışmada *KISS1* ve *KISS1R* geninin koçların yıl boyunca üreme davranışı göstermesinde olumlu işlevler oynayabileceğini göstermişlerdir. Bu tez çalışması, koçlarda Hipotalamus-Hipofiz-Gonad eksenine ilişkili olan *KISS1* ve *KISS1R* genlerinin spermatozoonlardaki ekspresyon seviyelerinin tatmin edici düzeylerde olmamakla birlikte belirlendiği ilk analizdir. *KISS1* geninin lokalize olduğu bölgelerin başında hipotalamus olduğu göz önüne alındığında spermatozoa *KISS1* ekspresyon seviyelerinde istenilen artış gözlenememesi spermatozoonlar için yeterli *KISS1* geni karakterize edilemediği hipotezini ortaya çıkarmaktadır. Pinto et al. (2012) spermatozoon hücrelerinde *KISS1* ve *KISS1R* gen ekspresyonunu Western Blot ve immünohistokimya analizlerini gerçekleştirmiş olup, *KISS1* ve *KISS1R* gen bölgelerinin spermatozoonlarda bulunduğunu ve her ikisinin de esas olarak spermatozoon baş bölgesinde, boyun çevresinde ve flagellumun orta kısmında lokalize olduğunu bulmuşlardır. *KISS1* geninin merkezi sinir sisteminde üremenin önemli bir düzenleyicisi olduğu bulunmasına rağmen periferik üreme organlarındaki işlevi ve ekspresyon düzeyi iyi tanımlanmamıştır (Li et al., 2009). Bu amaçla, kisspeptinlerin koçların üreme sistemindeki mevcudiyetleri ve işlevlerini ortaya koyacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 8. SONUÇ

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar melatonin uygulamasının koçların üreme verimliliğini artırmak ve üreme yönetiminde esneklik sağlamak için sezon dışı melatoninin uygulanmaya değer olduğunu desteklemektedir. Mevcut araştırma bulgularının temel olarak üç kesin sonucu vardır. İlk olarak, başlangıçta, sezon dışında ekzojen melatonin uygulaması testis arterlerinin RI ve PI değerlerini düşürerek, testislerine giden kan akışını artırmakta, böylece testisin endojen ve ekzojen fonksiyonlarında belirgin bir iyileşme şekillendirmektedir. Testislerde melatonin ile ilişkili reseptörlerin varlığı, melatoninin kan akışı üzerine etkisini bu yolla gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada FSH ve LH konsantrasyonları ölçülmemiş olsa bile melatoninin gonadotropik hormonların salgılanmasını artırarak testiste hücre büyümesini ve çoğalmasını sağlamaktadır. Bu da testisteki hacimce artışı ve artan kan akımını açıklamaktadır. İkinci olarak melatoninin testiküler kan akışını ve testiküler morfometrik ölçüleri artırması, melatonin grubundaki koçlarda, kontrol grubuna kıyasla sperm parametrelerinde anlamlı bir iyileşme yaratmamıştır. Yani, testislerdeki kan akışının artması, beklenenin aksine sperma kalitesi üzerinde olumlu etkiyi sağlamamıştır. Üçüncü olarak koç spermasında da diğer birçok memelide olduğu gibi *KISS1* gen analizi mümkündür ancak daha kesin sonuçlar elde edebilmek için daha geniş örneklemde ve doku orijinli *KISS1* gen analizlerine ihtiyaç vardır. Spermatozoadan elde edilen *KISS1* gen ifade düzeyinin yeterli bir ekspresyon seviyesine ulaşamaması Bafra koçlarında *KISS1* gen seviyesinin mevsimsel kontrolün esas göstergesi olup olmadığı konusunda şüpheleri de beraberinde getirmektedir.

Renkli Doppler ultrasonografisinin yaygın kullanımı koçlarda yeni uygulamaların etkinliğinin değerlendirilmesinde klinik olarak faydalı olacaktır. Unutulmamalıdır ki çok sayıda hayvanın, farklı hormonal tedavilerin kullanıldığı ve uyarımların yapıldığı ileri düzeydeki çalışmalar sürecin daha net olarak aydınlatılması ve koyunculuk sektörünün daha çok faydalanabilmesi için son derece önemlidir.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Hafez, M. A. M., Fadiel, A., Marai, I. F. M., & El-Darawany, A. A. (2008). Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8(3), 209-234.
- Abecia, J. A., Forcada, F., & González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 173-179.
- Ahmadi, B., Lau, C. P. S., Giffin, J., Santos, N., Hahnel, A., Raeside, J., ... & Bartlewski, P. (2012). Suitability of epididymal and testicular ultrasonography and computerized image analysis for assessment of current and future semen quality in the ram. *Experimental Biology and Medicine*, 237(2), 186-193.
- Alhamada, M., Debus, N., & Bocquier, F. (2017). An automated method for the evaluation of ram libido in real mating conditions. *Animal*, 11(11), 2036-2044.
- Allaoui, A., Safsaf, B., Tlidi, M., Djaalab, I., & Mansour, H. D. (2018). Effect of increasing levels of wasted date palm in concentrate diet on reproductive performance of Ouled Djellal breeding rams during flushing period. *Veterinary World*, 11(5), 712.
- Amann, R. P., & Veeramachaneni, D. N. R. (2007). Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction*, 133(3), 541-561.
- Ansel, L., Bolborea, M., Bentsen, A. H., Klosen, P., Mikkelsen, J. D., & Simonneaux, V. (2010). Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *Journal of Biological Rhythms*, 25(2), 81-91.
- Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, 3, 13-22.
- Aytekin, İ., & Öztürk, A. (2012). Turkey's sheep and sheep management. *Archiva Zootechnica*, 15(3), 39.
- Babic, N. P., Radišić, B., Lipar, M., Balić, I. M., Orak, A., Samardžija, M., ... & Cergolj, M. (2011). Influence of lameness-caused stress, pain and inflammation on health and reproduction in Holstein-Frisian bulls. *Veterinarska Stanica*, 42(Supplement 1), 3-6.
- Basioura, A., Brellou, G. D., Tsakmakidis, I., Vlemmas, I., Boscós, C. M., & Giadinis, N. (2022). Varicocele in an Adult Ram: Histopathological Examination and Sperm Quality Evaluation. *Veterinary Sciences*, 9(2), 86.
- Batissaco, L., Celeghini, E. C. C., Pinaffi, F. L. V., de OLIVEIRA, B. M. M., de ANDRADE, A. F. C., Recalde, E. C. S., & Fernandes, C. B. (2013). Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50(5), 384-395.
- Beltman, M. (2013). Ovine reproductive management: more than just counting sheep. *The Veterinary Record*, 173(24), 604.
- Beltramo, M., Robert, V., & Decourt, C. (2020). The kisspeptin system in domestic animals: what we know and what we still need to understand of its role in reproduction. *Domestic Animal Endocrinology*, 73, 106466.

- Bergh, A., Collin, O., & Lissbrant, E. (2001). Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biology of Reproduction*, 64(1), 13-20.
- Bhattacharya, K., Sengupta, P., & Dutta, S. (2019). Role of melatonin in male reproduction. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 8(5), 211.
- Biagiotti, G., Cavallini, G., Modenini, F., Vitali, G., & Gianaroli, L. (2002). Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. *BJU International*, 90(9), 903-908.
- Bishop, S. C. (2015). Genetic resistance to infections in sheep. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2), 2-7.
- Blache, D., & Martin, G. B. (2009). Focus feeding to improve reproductive performance in male and female sheep and goats: how it works and strategies for using it. *Nutritional and Foraging Ecology of Sheep and Goats*. 351-364.
- Boufermes, R., Richard, N., Le Moguen, K., Amirat, Z., Khammar, F., & Kottler, M. L. (2014). Seasonal expression of KiSS-1 and the pituitary gonadotropins LH $\beta$  and FSH $\beta$  in adult male Libyan jird (*Meriones libycus*). *Animal Reproduction Science*, 147(1-2), 56-63.
- Boukhliq, R., El Allali, K., & Tibary, A. (2018). Gross anatomy and ultrasonographic examination of the reproductive organs in rams and bucks. *Acta Scientiarum Agronomy*, 2, 226-240.
- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., & Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 67(5), 1060-1067.
- Cao, Y., Li, Z., Jiang, W., Ling, Y., & Kuang, H. (2019). Reproductive functions of Kisspeptin/KISS1R Systems in the Periphery. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17, 1-9.
- Caroprese, M., Napolitano, F., Mattiello, S., Fthenakis, G. C., Ribó, O., & Sevi, A. (2016). On-farm welfare monitoring of small ruminants. *Small Ruminant Research*, 135, 20-25.
- Carrillo, J. D., Soler, M., Lucas, X., & Agut, A. (2012). Colour and pulsed Doppler ultrasonographic study of the canine testis. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4), 655-659.
- Casao, A., Cebrián, I., Asumpção, M. E., Pérez-Pé, R., Abecia, J. A., Forcada, F., ... & Muiño-Blanco, T. (2010a). Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 1-9.
- Casao, A., Vega, S., Palacín, I., Pérez-Pe, R., Laviña, A., Quintín, F. J., ... & Muiño-Blanco, T. (2010b). Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(3), 425-432.
- Castellano, J. M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V. M., Bellido, C., ... & Tena-Sempere, M. (2006). Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation?. *Endocrinology*, 147(10), 4852-4862.

- Cebrián-Pérez, J. A., Casao, A., González-Arto, M., dos Santos Hamilton, T. R., Pérez-Pé, R., & Muiño-Blanco, T. (2014). "Melatonin in sperm biology: Breaking paradigms", *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 11-21.
- Cevik, M., Yilmazer, C., & Kocyigit, A. (2017). Comparison of sexual performance and testicular characteristics of melatonin treated Kivircik and Charollais rams during the non-breeding season. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69, 278-284.
- Chalivoix, S., Bagnolini, A., Caraty, A., Cognie, J., Malpaux, B., & Dufourny, L. (2010). Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(2), 110-118.
- Cook, J. S., Sauder, C. L., & Ray, C. A. (2011). Melatonin differentially affects vascular blood flow in humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300(2), H670-H674.
- Córdova-Izquierdo, A., Villa-Mancera, A., Olivares Pérez, J., & Sánchez-Aparicio, P. (2014). Environmental stress effect on animal reproduction. *Open Journal of Animal Sciences*, 4(2), 79-84.
- Crilly, J. P., Politis, A. P., & Hamer, K. (2017). Use of ultrasonographic examination in sheep veterinary practice. *Small Ruminant Research*, 152, 166-173.
- de Brito, M. B. S., Feliciano, M. A. R., Coutinho, L. N., Uscategui, R. R., Simoes, A. P. R., Maronezi, M. C., ... & Russiano, W. R. (2015). Doppler and contrast-enhanced ultrasonography of testicles in adult domestic felines. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(5), 730-734.
- de Souza, M. B., Barbosa, C. C., England, G. C., Mota Filho, A. C., Sousa, C. V. S., de Carvalho, G. G., ... & Silva, L. D. (2015). Regional differences of testicular artery blood flow in post pubertal and pre-pubertal dogs. *BMC Veterinary Research*, 11, 1-6.
- Deng, S. L., Wang, Z. P., Jin, C., Kang, X. L., Batool, A., Zhang, Y., ... & Liu, Y. X. (2018). Melatonin promotes sheep Leydig cell testosterone secretion in a co-culture with Sertoli cells. *Theriogenology*, 106, 170-177.
- Díaz López, B., Rodríguez, E. D., Urquijo, C., & Alvarez, C. F. (2005). Melatonin influences on the neuroendocrine-reproductive axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1057(1), 337-364.
- Dossa, L. H., Sangaré, M., Buerkert, A., & Schlecht, E. (2015). Production objectives and breeding practices of urban goat and sheep keepers in West Africa: regional analysis and implications for the development of supportive breeding programs. *SpringerPlus*, 4(1), 1-12.
- Drake, A., Donahue, T. L. H., Stansloski, M., Fox, K., Wheatley, B. B., & Donahue, S. W. (2016). Horn and horn core trabecular bone of bighorn sheep rams absorbs impact energy and reduces brain cavity accelerations during high impact ramming of the skull. *Acta Biomaterialia*, 44, 41-50.
- Dudek, M., Kołodziejski, P. A., Pruszyńska-Oszmałek, E., Sassek, M., Ziarniak, K., Nowak, K. W., & Sliwowska, J. H. (2016). Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression in the hypothalamic–

- pituitary–gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats. *Neuropeptides*, 56, 41-49.
- Dwyer, C. (2017). Reproductive management (including impacts of prenatal stress on offspring development). *Advances in Sheep Welfare*, 131-152. Woodhead Publishing.
- Egerszegi, I., Sarlós, P., Rátky, J., Solti, L., Faigl, V., Kulcsár, M., & Cseh, S. (2014). Effect of melatonin treatment on semen parameters and endocrine function in Black Racka rams out of the breeding season. *Small Ruminant Research*, 116(2-3), 192-198.
- El-Shalofy, A. S., Shahat, A. M., & Hedia, M. G. (2022). Effects of melatonin administration on testicular hemodynamics, echotexture, steroids production, and semen parameters during the non-breeding season in Ossimi rams. *Theriogenology*, 184, 34-40.
- Faigl, V., Keresztes, M., Kulcsár, M., Nagy, S., Keresztes, Z., Amiridis, G., ... & Cseh, S. (2009). Testicular function and semen characteristics of Awassi rams treated with melatonin out of the breeding season. *Acta Veterinaria Hungarica*, 57(4), 531-540.
- Faigl, V., Vass, N., Jávör, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G., & Cseh, S. (2012). Artificial insemination of small ruminants—A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(1), 115-129.
- Fidan, A. F., Yeni, D., Avdatek, F., Özçınar, Ü., & Hazman, Ö. (2017). Changes in oxidative stress markers during electro-ejaculation procedure in merino rams. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 68(3), 479-486.
- Foster, D. L., Karsch, F. J., Olster, D. H., Ryan, K. D., & Yellon, S. M. (1986). Determinants of puberty in a seasonal breeder. In *Proceedings of the 1985 Laurentian Hormone Conference* (pp. 331-384). Academic Press.
- Foster, R. A. (2016). Male genital system. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 3, 465.
- Frungieri, M. B., Calandra, R. S., & Rossi, S. P. (2017). Local actions of melatonin in somatic cells of the testis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1170.
- García, J. J., Reiter, R. J., Guerrero, J. M., Escames, G., Byung, P. Y., Oh, C. S., & Muñoz-Hoyos, A. (1997). Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS letters*, 408(3), 297-300.
- Gardiner, A., & Rhind, S. (2013). Taking a history on veterinary education. *Veterinary Record*, 173(16), 388-393.
- Gelez, H., Lindsay, D. R., Blache, D., Martin, G. B., & Fabre-Nys, C. (2003). Temperament and sexual experience affect female sexual behaviour in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 84(1), 81-87.
- Gibbons, A. E., Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M. M., Spinelli, M. V., & Cueto, M. I. (2019). Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*, 16, 803-809.

- Ginther, O. J., & Utt, M. D. (2004). Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *Journal of Equine Veterinary Science*, 24(12), 516-526.
- Goktas, S., Yalcin, O., Ermek, E., Piskin, S., Capraz, C. T., Cakmak, Y. O., & Pekkan, K. (2017). Haemodynamic recovery properties of the torsioned testicular artery lumen. *Scientific Reports*, 7(1), 15570.
- González-Arto, M., Aguilar, D., Gaspar-Torrubia, E., Gallego, M., Carvajal-Serna, M., Herrera-Marcos, L. V., ... & Casao, A. (2017). Melatonin MT1 and MT2 receptors in the ram reproductive tract. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 662.
- Gootwine, E. (2020). Invited review: Opportunities for genetic improvement toward higher prolificacy in sheep. *Small Ruminant Research*, 186, 106090.
- Gouletsou, P. G., & Fthenakis, G. C. (2010). Clinical evaluation of reproductive ability of rams. *Small Ruminant Research*, 92(1-3), 45-51.
- Gouletsou, P. G., & Fthenakis, G. C. (2015). Microbial diseases of the genital system of rams or bucks. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2), 130-135.
- Gouletsou, P. G., Amiridis, G. S., Cripps, P. J., Lainas, T., Deligiannis, K., Saratsis, P., & Fthenakis, G. C. (2003). Ultrasonographic appearance of clinically healthy testicles and epididymides of rams. *Theriogenology*, 59(9), 1959-1972.
- Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., & Fidan, A. F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 200-207.
- Hafez, B., & Hafez, E. S. E. (2000). Reproductive behavior. *Reproduction in Farm Animals*, 291-306.
- Han, S. K., Gottsch, M. L., Lee, K. J., Popa, S. M., Smith, J. T., Jakawich, S. K., ... & Herbison, A. E. (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *Journal of Neuroscience*, 25(49), 11349-11356.
- Han, Y., Peng, X., Si, W., Liu, G., Han, Y., Jiang, X., ... & Huang, Y. (2020). Local expressions and function of Kiss1/GPR54 in goats' testes. *Gene*, 738, 144488.
- Hedger, M. P. (2011). Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *Journal of Andrology*, 32(6), 625-640.
- Hedia, M. G., El-Belely, M. S., Ismail, S. T., & El-Maaty, A. M. A. (2019). Monthly changes in testicular blood flow dynamics and their association with testicular volume, plasma steroid hormones profile and semen characteristics in rams. *Theriogenology*, 123, 68-73.
- Hedia, M. G., El-Belely, M. S., Ismail, S. T., & Abo El-Maaty, A. M. (2020). Seasonal variation in testicular blood flow dynamics and their relation to systemic and testicular oxidant/antioxidant biomarkers and androgens in rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(7), 861-869.
- Hindson, J. C., & Winter, A. (2008). 'Male infertility' *Manual of sheep diseases*. John Wiley & Sons.

- Hsu, M. C., Wang, J. Y., Lee, Y. J., Jong, D. S., Tsui, K. H., & Chiu, C. H. (2014). Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. *Reproduction*, 147(6), 835-845.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219-228.
- Júnior, C. C., Lucci, C. M., Peripolli, V., Silva, A. F., Menezes, A. M., Morais, S. R. L., ... & McManus, C. (2015). Effects of testicle insulation on seminal traits in rams: preliminary study. *Small Ruminant Research*, 130, 157-165.
- Júnior, C. C., Moustacas, V. S., Xavier, M. N., Costa, E. A., Costa, L. F., Silva, T. M. A., ... & Santos, R. L. (2012). Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research*, 102(2-3), 213-222.
- Kafi, M., Safdarian, M., & Hashemi, M. (2004). Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Research*, 53(1-2), 133-139.
- Kajdaniuk, D., Marek, B., Kos-Kudła, B., Zwirska-Korczala, K., Ostrowska, Z., Buntner, B., & Szymaszal, J. (2002). Does the negative correlation found in breast cancer patients between plasma melatonin and insulin-like growth factor-I concentrations imply the existence of an additional mechanism of oncostatic melatonin influence involved in defense?. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 8(6), CR457-61.
- Kameni, S. L., Meutchieye, F., & Ngoula, F. (2021). Liquid storage of ram semen: associated damages and improvement. *Open Journal of Animal Sciences*, 11(3), 473-500.
- Kaya, A., Baspinar, N., Yildiz, C., Kurtoglu, F., Ataman, M. B., & Haliloglu, S. (2000). Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151(12), 1143-1146.
- Kenyon, P. R., Smith, S. L., Morel, P. C. H., Morris, S. T., & West, D. M. (2009). The effect of the maturity and prior breeding activity of rams and body condition score of ewe hoggets on the reproductive performance of ewe hoggets. *New Zealand Veterinary Journal*, 57(5), 290-294.
- Kenyon, P. R., Thompson, A. N., & Morris, S. T. (2014). Breeding ewe lambs successfully to improve lifetime performance. *Small Ruminant Research*, 118(1-3), 2-15.
- Kheradmand, A., Babaei, H., & Ali Batavani, R. (2006). Effect of improved diet on semen quality and scrotal circumference in the ram. *Veterinarski Arhiv*, 76(4), 333-341.
- Kirilov, M., Clarkson, J., Liu, X., Roa, J., Campos, P., Porteous, R., ... & Herbison, A. E. (2013). Dependence of fertility on kisspeptin–Gpr54 signaling at the GnRH neuron. *Nature Communications*, 4(1), 2492.

- Kleemann, D. O., Kelly, J. M., Arney, L. J., Tilbrook, A. J., & Walker, S. K. (2022). Melatonin dose: testicular and testosterone response in Border Leicester rams during spring. *Livestock Science*, 260, 104928.
- Kozłowska, N., Faundez, R., Borzyszkowski, K., Dąbrowski, S., Jasiński, T., & Domino, M. (2022). The relationship between the testicular blood flow and the semen parameters of rams during the selected periods of the breeding and non-breeding seasons. *Animals*, 12(6), 760.
- Lacasta, D., Ferrer, L. M., Ramos, J. J., González, J. M., Ortín, A., & Fthenakis, G. C. (2015). Vaccination schedules in small ruminant farms. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2), 34-46.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), 2587-2587.
- Letelier, C. A., Contreras-Solis, I., García-Fernández, R. A., Sánchez, M. A., García-Palencia, P., Sánchez, B., ... & Gonzalez-Bulnes, A. (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Animal Reproduction Science*, 126(1-2), 61-69.
- Ley, W. B., Sprecher, D. J., Thatcher, C. D., Pelzer, K. D., & Umberger, S. H. (1990). Use of the point-score system for breeding soundness examination in yearling Dorset, Hampshire and Suffolk rams. *Theriogenology*, 34(4), 721-733.
- Li, D., Yu, W., & Liu, M. (2009). Regulation of KiSS1 gene expression. *Peptides*, 30(1), 130-138.
- Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I. J., & Smith, J. T. (2011). Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(10), 871-882.
- Li, S. N., Xue, H. L., Zhang, Q., Xu, J. H., Wang, S., Chen, L., & Xu, L. X. (2015). Photoperiod regulates the differential expression of KiSS-1 and GPR54 in various tissues and sexes of striped hamster. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 13894-905.
- Lin, C. C., Huang, W. J., & Chen, K. K. (2009). Measurement of testicular volume in smaller testes: how accurate is the conventional orchidometer?. *Journal of Andrology*, 30(6), 685-689.
- Lincoln, G. A., & Short, R. V. (1980). Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Proceedings of the 1979 Laurentian Hormone Conference*, Academic Press.
- Lincoln, G. A., Clarke, I. J., & Sweeney, T. (1996). 'Hamster-like' cycles in testicular size in the absence of gonadotrophin secretion in HPD rams exposed to long-term changes in photoperiod and treatment with melatonin. *Journal of Neuroendocrinology*, 8(11), 855-866.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method", *Methods*, 25(4), 402-408.
- Luridiana, S., Mura, M. C., Daga, C., Cosso, G., Bodano, S., Farci, F., ... & Carcangiu, V. (2016). Influences of melatonin treatment, melatonin receptor 1A (MTNR1A) and kisspeptin (KiSS-1) gene polymorphisms on first conception in Sarda ewe lambs. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(6), 750-756.

- Makri, A., Pissimissis, N., Lembessis, P., Polychronakos, C., & Koutsilieris, M. (2008). The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. *Cancer Treatment Reviews*, 34(8), 682-692.
- Malhotra, S., Sawhney, G., & Pandhi, P. (2004). The therapeutic potential of melatonin: a review of the science. *Medscape General Medicine*, 6(2).
- Malpaux, B., Viguié, C., Skinner, D. C., Thiéry, J. C., Pelletier, J., & Chemineau, P. (1996). Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 109-117.
- Maquivar, M. G., Smith, S. M., & Busboom, J. R. (2021). Reproductive management of rams and ram lambs during the pre-breeding season in US sheep farms. *Animals*, 11(9), 2503.
- Martin, G. B., Hötzel, M. J., Blache, D., Walkden-Brown, S. W., Blackberry, M. A., Boukhliq, R., ... & Miller, D. W. (2002). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(3), 165-175.
- Martin, G. B., Rodger, J., & Blache, D. (2004). Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 491-501.
- Maurya, V. P., Sejian, V., Kumar, D., & Naqvi, S. M. K. (2010). Effect of induced body condition score differences on sexual behavior, scrotal measurements, semen attributes and endocrine responses in Malpura rams under hot semi-arid environment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(6), 308-317.
- Messenger, S. (2005). Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty. *Journal of Neuroendocrinology*, 17(10), 687-688.
- Milczewski, V., Chahad-Ehlers, S., Spencoski, K. M., Morais, R. N., & Soccol, V. T. (2015). Quantifying the effect of seasonality on testicular function of Suffolk ram in lower latitude. *Small Ruminant Research*, 124, 68-75.
- Mozo, R., Galeote, A. I., Alabart, J. L., Fantova, E., & Folch, J. (2015). Evaluating the reproductive ability of breeding rams in North-Eastern Spain using clinical examination of the body and external genitalia. *BMC Veterinary Research*, 11, 1-11.
- Ntemka, A., Kioussis, E., Boscós, C., Theodoridis, A., Kourousekos, G., & Tsakmakidis, I. (2018). Effects of testicular hemodynamic and echogenicity changes on ram semen characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 50-55.
- Oakley, A. E., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2009). Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrine Reviews*, 30(6), 713-743.
- Oglat, A. A., Matjafri, M. Z., Suardi, N., Oqlat, M. A., Abdelrahman, M. A., & Oqlat, A. A. (2018). A review of medical doppler ultrasonography of blood flow in general and especially in common carotid artery. *Journal of Medical Ultrasound*, 26(1), 3.
- Ohkura, S., Uenoyama, Y., Yamada, S., Homma, T., Takase, K., Inoue, N., ... & Tsukamura, H. (2009). Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating

- gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. *Peptides*, 30(1), 49-56.
- Okamura, H., Yamamura, T., & Wakabayashi, Y. (2013). Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: an overview of kisspeptin research in domestic animals. *Animal Science Journal*, 84(5), 369-381.
- Oláh, J., Kusza, S., Harangi, S., Posta, J., Kovács, A., Pécsi, A., ... & Jávora, A. (2013). Seasonal changes in scrotal circumference, the quantity and quality of ram semen in Hungary. *Archives Animal Breeding*, 56(1), 102-108.
- Olfaz, M., Soydan, E., Onder, H., & Ocağ, N. (2010). The oestrous behavior of the Karayaka sheep in Turkey. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5(2), 93-102.
- Ott, R. S., & Memon, M. A. (1980). Breeding soundness examinations of rams and bucks, a review. *Theriogenology*, 13(2), 155-164.
- Palmer, C. W. (2005). Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology*, 64(3), 469-479.
- Perkins, A., & Roselli, C. E. (2007). The ram as a model for behavioral neuroendocrinology. *Hormones and Behavior*, 52(1), 70-77.
- Pinho, R. O., Camilo, B. S., Lima, D. M. A., Villadiego, F. A. C., Vergara, J. C. M., Shiomi, H. H., ... & Guimarães, J. D. (2018). The use of ultrasonography in the reproductive evaluation of boars. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 393-400.
- Pinto, F. M., Cejudo-Román, A., Ravina, C. G., Fernández-Sánchez, M., Martín-Lozano, D., Illanes, M., ... & Candenas, M. L. (2012). Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 35(1), 63-73.
- Pompolo, S., Pereira, A., Estrada, K. M., & Clarke, I. J. (2006). Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology*, 147(2), 804-810.
- Pool, K. R., Rickard, J. P., Pini, T., & De Graaf, S. P. (2020). Exogenous melatonin advances the ram breeding season and increases testicular function. *Scientific Reports*, 10(1), 9711.
- Pozor, M. A., & McDonnell, S. M. (2002). Doppler ultrasound measures of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology*, 58(2-4), 437-440.
- Pozor, M. A., & McDonnell, S. M. (2004). Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology*, 61(5), 799-810.
- Pozor, M. A., Nolin, M., Roser, J., Runyon, S., Macpherson, M. L., & Kelleman, A. (2014). Doppler indices of vascular impedance as indicators of testicular dysfunction in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1(34), 38-39.
- Price, E. O., Erhard, H., Borgwardt, R., & Dally, M. R. (1992). Measures of libido and their relation to serving capacity in the ram. *Journal of Animal Science*, 70(11), 3376-3380.

- Punchoo, R., & Bhoora, S. (2021). Variation in the Measurement of Anti-Müllerian Hormone—What Are the Laboratory Issues?. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 719029.
- Ramadan, T. A., Kumar, D., Ghuman, S. S., & Singh, I. (2019). Melatonin-improved buffalo semen quality during nonbreeding season under tropical condition. *Domestic Animal Endocrinology*, 68, 119-125.
- Ramadan, T. A., Taha, T. A., Samak, M. A., & Hassan, A. (2009). Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Theriogenology*, 71(3), 458-468.
- Revel, F. G., Ansel, L., Klosen, P., Saboureaux, M., Pévet, P., Mikkelsen, J. D., & Simonneaux, V. (2007). Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8, 57-65.
- Rhim, T. J., Kuehl, D., & Jackson, G. L. (1993). Seasonal changes in the relationships between secretion of gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone, and testosterone in the ram. *Biology of reproduction*, 48(1), 197-204.
- Ribeiro, D. L. D. S., Santos, L. S., França, I. G., Pereira, H. G., Lima, J. D. S., Miranda, B. D. B., ... & Junior, J. R. S. T. (2020). The use of Doppler ultrasound as a potential fertility predictor in male goats. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 44(5), 1115-1124.
- Ridler, A. L., Smith, S. L., & West, D. M. (2012). Ram and buck management. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 180-183.
- Rosa, H. J. D., & Bryant, M. J. (2002). The ‘ram effect’ as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Ruminant Research*, 45(1), 1-16.
- Rosa, H. J., & Bryant, M. J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, 48(3), 155-171.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77-111.
- Samir, H., Nyametease, P., Elbadawy, M., Nagaoka, K., Sasaki, K., & Watanabe, G. (2020). Administration of melatonin improves testicular blood flow, circulating hormones, and semen quality in Shiba goats. *Theriogenology*, 146, 111-119.
- Samir, H., Nyametease, P., Nagaoka, K., & Watanabe, G. (2018). Effect of seasonality on testicular blood flow as determined by color Doppler ultrasonography and hormonal profiles in Shiba goats. *Animal Reproduction Science*, 197, 185-192.
- Samir, H., Radwan, F., & Watanabe, G. (2021). Advances in applications of color Doppler ultrasonography in the andrological assessment of domestic animals: A review. *Theriogenology*, 161, 252-261.
- Sarlós, P., Egerszegi, I., Balogh, O., Molnár, A., Cseh, S., & Rátky, J. (2013). Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Ruminant Research*, 111(1-3), 90-95.
- Scott, P. R., Sargison, N. D., & Wilson, D. J. (2007). The potential for improving welfare standards and productivity in United Kingdom sheep flocks using veterinary flock health plans. *The Veterinary Journal*, 173(3), 522-531.

- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno Jr, J. S., Shagoury, J. K., ... & Colledge, W. H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine*, 349(17), 1614-1627.
- Shahat, A. M., Thundathil, J. C., & Kastelic, J. P. (2021). Scrotal subcutaneous temperature is increased by scrotal insulation or whole-body heating, but not by scrotal neck insulation; however, all three heat-stress models decrease sperm quality in bulls and rams. *Journal of Thermal Biology*, 100, 103064.
- Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., & Bizelis, J. A. (2006). Effect of breed and age on sexual behaviour of rams. *Theriogenology*, 65(8), 1480-1491.
- Smith, J. T. (2012). The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 43(2), 75-84.
- Stellflug, J. N., & Berardinelli, J. G. (2002). Ram mating behavior after long-term selection for reproductive rate in Rambouillet ewes. *Journal of Animal Science*, 80(10), 2588-2593.
- Strina, A., Corda, A., Nieddu, S., Solinas, G., Lilliu, M., Zedda, M. T., ... & Ledda, S. (2016). Annual variations in resistive index (RI) of testicular artery, volume measurements and testosterone levels in bucks. *Comparative Clinical Pathology*, 25(2), 409-413.
- Succu, S., Berlinguer, F., Pasciu, V., Satta, V., Leoni, G. G., & Naitana, S. (2011). Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *Journal of Pineal Research*, 50(3), 310-318.
- Swelum, A. A. A., Ayadi, M., Alhidary, I., Alowaimer, A., & Abouheif, M. (2017). The relationships between body fatness, leptin, testosterone, and reproductive performance in ram lambs as affected by level and frequency of feeding. *Theriogenology*, 89, 79-85.
- Tan, D. Z., Chen, L. D., Poeggeler, B., Manchester, L. C., & Reiter, R. (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrinology*, 57-60.
- Thiéry, J. C., Chemineau, P., Hernandez, X., Migaud, M., & Malpoux, B. (2002). Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1-2), 87-100.
- Tilbrook, A. J., & Cameron, A. W. N. (1990). The contribution of the sexual behaviour of rams to successful mating of ewes under field conditions. *Reproductive Physiology of Merino Sheep*, 143-160.
- Toker, M. B., Alcay, S., Gokce, E., & Ustuner, B. (2016). Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology*, 72(3), 205-209.
- Tsili, A. C., Xiropotamou, O. N., Sylakos, A., Maliakas, V., Sofikitis, N., & Argyropoulou, M. I. (2017). Potential role of imaging in assessing harmful effects on spermatogenesis in adult testes with varicocele. *World Journal of Radiology*, 9(2), 34.
- Ungerfeld, R., Ramos, M. A., & Möller, R. (2006). Role of the vomeronasal organ on ram's courtship and mating behaviour, and on mate choice among oestrous ewes. *Applied Animal Behaviour Science*, 99(3-4), 248-252.

- Velasco, A., & Ruiz, S. (2020). New approaches to assess fertility in domestic animals: Relationship between arterial blood flow to the testicles and seminal quality. *Animals*, 11(1), 12.
- Venianaki, A. P., Barbagianni, M. S., Fthenakis, G. C., Galatos, A. D., & Gouletsou, P. G. (2023). Doppler Examination of the Testicular Artery of Beagle-Breed Dogs from Birth to Puberty. *Tomography*, 9(4), 1408-1422.
- Viana, J. H. M., Arashiro, E. K. N., Siqueira, L. G. B., Ghetti, A. M., Areas, V. S., Guimarães, C. R. B., ... & Fernandes, C. A. C. (2013). Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. *Animal Reproduction (AR)*, 10(3), 215-222.
- Vipond, J., & Greig, A. (2007). Management and care of rams. *Diseases of Sheep*, 61.
- Wilson, D. E., & Morrical, D. G. (1991). The national sheep improvement program: A review. *Journal of Animal Science*, 69(9), 3872-3881.
- Xia, Q., Di, R., He, X. Y., Wei, C. H., & Chu, M. X. (2020). Expression analysis of DIO2, EYA3, KISS1 and GPR54 genes in year-round estrous and seasonally estrous rams. *Archives Animal Breeding*, 63(2), 451-460.
- Yarney, T. A., Sanford, L. M., & Palmer, W. M. (1990). Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indices of postpubertal reproductive function. *Canadian Journal of Animal Science*, 70(1), 139-147.
- Yu, K., Deng, S. L., Sun, T. C., Li, Y. Y., & Liu, Y. X. (2018). Melatonin regulates the synthesis of steroid hormones on male reproduction: a review. *Molecules*, 23(2), 447.
- Zelli, R., Troisi, A., Ngonput, A. E., Cardinali, L., & Polisca, A. (2013). Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Research in Veterinary Science*, 95(2), 632-637.
- Zou, P., Wang, X., Chen, Q., Yang, H., Zhou, N., Sun, L., ... & Cao, J. (2019). Kisspeptin protein in seminal plasma is positively associated with semen quality: results from the MARHCS study in Chongqing, China. *BioMed Research International*.

## EKLER

### Ek 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : E-68489742-604.01.03-51893  
Konu : Hadyek izini hk

PROF.DR.MESUT ÇEVİK  
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ

Sahipli Çiftlik Hayvanları üzerinde Araştırma amaçlı çalışma yapmak üzere başvuran Prof. Dr. Mesut ÇEVİK'in 2021/16 Kabul nolu **"Koçlarda Sezon Dışı Melatonin uygulamasının Testis Fonksiyonları, Testis Arter Hemodinamisi ve Spermatolojik Parametreler ile İlişkisi"** başlıklı projesi 18.03.2021 tarihli Kurul toplantısında ÖMU- HADYEK'in yönergesi kapsamında değerlendirilmiş ve Hayvan Hakları ve Deney Etik İlkelerine Uygun bulunmuştur. Karar onayı ekte sunulmuştur.

**Bilgilerinizi rica ederim.**

Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ  
HADYEK Başkanı

**Ek: ETİK KURUL KARARI 2021-16 M. ÇEVİK**

**Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.**

Belge Doğrulama Kodu : 8ZJ7-AK25-0MIY

Belge Doğrulama Adresi : <https://ebyssorgu.omu.edu.tr>

Adres: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Rektörlüğü

Telefon No :

Fax No :

e-Posta :

İnternet Adresi :

Bilgi İçin : Hayriye ÇELİK

Veri Giriş Personeli

Telefon No:



## ÖZ GEÇMİŞ

Melih Akar, Samsun Yeşilkent Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2018 tarihinde mezun oldu. 2018 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Dölerme ve Suni Tohumlama ABD'nde doktora programına girmiştir.

### İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-9160-5026

### Yayınlar:

1. Akal, E., Kaya, C., & Akar, M., (2019). Köpek ve Kedilerde İnfertilite. Türkiye Klinikleri - Dölerme ve Suni Tohumlama Özel Sayı (Pp.40-46), Ankara
2. Akar, M., Genç, M. D., Kaya, C. & Çevik, M. Spermatogonial Kök Hücre ve Transplantasyonu, 2019. International Black Sea Coastline Countries Symposium - 2.
3. Kaya, C., Akar, M., Genç, M. D., & Çevik, M. Reprodüktif Biyoteknolojide Kullanılan Gen Transfer Yöntemleri: Spermatozoon Aracılı Gen Transferi, 2019. International Black Sea Coastline Countries Symposium – 2
4. Kaya, C., Akar, M., Akal, E., & Çevik, M. (2021). Testiküler Doku Kriyoprezervasyonu. Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences. doi: <https://doi.org/10.35229/jaes.848376>
5. Akal E, Akar M, Kaya C. Mandalarda epididimal spermanın eldesi ve kriyoprezervasyonu. Selçuk M, editör. Mandalarda Reprodüktif Biyoteknoloji. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.16-22.
6. Akar M, Kaya C, Çevik M. (2021). Evaluation of Current Antioxidant Profile in Semen. Livestock Studies. 61(1), 37-45. <http://doi.org/10.46897/livestockstudies.610106>
7. Kaya C., Akar M. & ESİN, B. 2021. Diseases Transmission Via Semen: Importance and Control Strategies. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 6(3), 409-413.

8. Çevik, M., Akar, M & Kaya, C. Tatlısu balıklarında reproduksiyon. Yavaş İ, editör. Su Ürünlerinde (Akuakültür) Reprodüktif Biyoteknolojiler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.1-10.
9. Akal, E., Selçuk, M., Esin, B., Akar, M. & Kaya, C. (2021). Comparison of the effects of different thawing methods on post-thaw sperm characteristics of buffalo bull semen. *Thai J Vet Med*, 51(4), 697-704.
10. Esin B., Akar M., Tağrikulu MD., Kaya C., & Çevik M. The Effects of Fast and Slow Thawing on Spermatological Parameters and Detect of Chromatin Condensation by Toluidine Blue Staining in Frozen-Thawed Bull Sperm. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28(3).
11. Kaya, C., Esin, B., Akar, M. & Çevik, M. A Case Of Alopecia X In A Dog; Sterilization Request, Semen Freezing and Offspring, Sözlü Sunum, Ist INTERNATIONAL 10th NATIONAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION SCIENCE CONGRESS, 28 Eylül 2022, 01 Ekim 2022.
12. Kaya, C., Esin, B., Akar, M. & Çevik, M. The Use Of Different Staining Methods In The Evaluation Of Frozen-Thawed Cauda Epididymal Ram Sperm Morphology, *Spermova*, 2022, 2308-4928, 12, 1, 33-38.
13. Esin, B., Kaya, C., Akar, M. & Çevik, M., Evaluation of Chromatin Dispersion of Dog Spermatozoa with the Goldcyto Dna Kit: Factors Affecting the Analysis, Sözlü Sunum, Ist INTERNATIONAL 10th NATIONAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION SCIENCE CONGRESS, 28 Eylül 2022, 01 Ekim 2022.
14. Esin, B., Kaya, C. & Akar, M. Viral Diseases Transmission Via Semen and Their Control Strategies in Cattle , Poster Sunumu, International Congress on Biological and Health Sciences, 26 Şubat 2021, 28 Şubat 2021, 325 - 325.
15. Akar, M., Esin, B. & Selçuk, M. Control of Reproduction in Mares, Poster Sunumu, I. INTERNATIONAL EQUINE MEDICINE AND TRAINING CONGRESS, 21 Mart 2019, 24 Mart 2019, 121 - 122.,
16. Akar, M., Kocaman, A. & Çevik, M. Expression of the KISS1 Gene and Receptor Region (KISS1R) in Fresh and Frozen Ram Semen, Sözlü Sunum, EDUVET INTERNATIONAL CONGRESS OF VETERINARY SCIENCES, 25-27 Haziran 2021.