

ARAŞTIRMA MAKALESİ

RESEARCH ARTICLE

# Horozların Testislerinde Yaşlanmaya Bağlı Olarak Şekillenen Apoptozisin Belirlenmesi<sup>►</sup>

Korhan ALTUNBAŞ,<sup>1</sup> Özlem ÖZDEN AKKAYA,<sup>1\*</sup>  
Artay YAĞCI,<sup>1</sup> Yasemin ÖZNURLU<sup>2</sup>

## Anahtar Kelimeler

Horoz  
Apoptozis  
Testis  
Yaşlanma  
TUNEL

## Key Words

Rooster  
Apoptosis  
Testis  
Aging  
TUNEL

<sup>1</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji AD  
Afyonkarahisar  
TÜRKİYE

<sup>2</sup> Selçuk Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji AD  
Konya  
TÜRKİYE

## \*Corresponding author

Tel: 0272 228 13 12  
Fax: 0272 228 13 49  
Email:  
ozlemozden\_06@hotmail.com

► Bu çalışmanın bir kısmı Uluslararası Katılımlı IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur  
Adana, TÜRKİYE

## Ö Z E T

İnsan ve laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalarda, yaşın ilerlemesi ile testosteron seviyesinde bir azalma ve buna bağlı olarak testis dokusunda histomorfolojik değişikliklerin meydana geldiği ve apoptozisin arttığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda Horozlarda yapılan çalışmalarda ise yaşlanmaya bağlı olarak fertilitede bir azalma saptanmasına rağmen, fark edilebilir bir seminifer tubul atrofiksi ve dejenerasyonu gözlenmemiştir. Bu nedenle yaşın kanatlı testisindeki apoptozis sıklığı üzerindeki etkisi belirsizliğini korumaktadır. Damızlık işletmelerinde horozların verimli ve ekonomik bir şekilde damızlık olarak kullanılacakları sürenin belirlenebilmesine katkı sağlamak amacıyla sunulan çalışmada testis dokusunun histolojik yönden incelenmesi ve seminifer tubul duvarındaki hücrelerde apoptotik indeksin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmada 5 haftalık ve 35 haftalık grupların verileri karşılaştırıldığında yaşlanmaya bağlı olarak testis ağırlığının azaldığı, seminifer tubullerde apoptotik indeksin arttığı belirlenirken, testis dokusunda histolojik bir farklılık gözlenmemiştir. Yaşlı horozlarda infertilitedeki azalmanın doğal hücre ölüm hızının artması sonucu ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır.



## Determination of the Age-Induced Apoptosis in the Rooster Testes

## S U M M A R Y

Experimental studies indicated that aging decreases testosterone level and causes to histomorphological changes in testicular structure along with an increase in apoptosis frequency in both human and laboratory animals. Although there is an age dependent decrease has been shown in the fertility of rooster, there is no morphological evidence of seminiferous tubular atrophy and degeneration. Besides, effects of the aging on testicular apoptosis frequency in birds remains obscure. In order to determine the reliable reproductive period of roosters, it is crucial to evaluate testicular histology and to determine apoptic index of spermatogenic cells. In this study, the parameters given above were investigated. The results have revealed that testicular decreased weight with aging, whereas apoptic index of seminiferous tubules decreased. However any significant histological differences in testes were not observed between 35 and 72 week old roosters. It was concluded that increased infertility rate in aged rooster might arise from increase of apoptotic cell frequency, but not from age related changes in testicular histology.

## GİRİŞ

Evcil horozlarda fertilitite yaklaşık 32-37 haftada pik (%96) seviyeye ulaşır ve takiben 70-72. haftalarda hızlı bir şekilde %68'e ve 110. haftada %5'e kadar düşer. Horozlar yaklaşık 10 yıl kadar yaşamalarına rağmen, 70. haftada fertiliteleri düşük olduğundan ve buna bağlı ekonomik nedenlerle sürüden çıkarılmaktadırlar.<sup>1-4</sup> Fertilitede ortaya çıkan bu hızlı düşüş, semedeki spermatozoa konsantrasyonunda oluşan düşüşün azalmanın doğal bir sonucudur.<sup>5,6</sup> Bununla birlikte, yaşlı horozların başarılı çiftleşme ve libidosunda da belirgin azalma gözlenir.<sup>7</sup>

Bıldırcın, serçe, muhabbet kuşu gibi dişiler mevsimsel üreme siklusu gösteren kuşlarda, erkeklerin fertilitelerinde in aktif oldukları mevsimlerde azalma gözlenir ve hatta hayvanlar bu dönemde steril bile olabilirler. Fertilitedeki bu siklik azalma; anormal spermatozoa sayısının artması, spermatozoa üretiminin azalması ve durmasına yol açan semifer tubul regresyonu yada atrofisi ile birlikte seyredir.<sup>8-13</sup> Mevsimsel siklus gösteren kanatlılardan farklı olarak; düşük fertiliteli evcil horozlarda spermatozoa konsantrasyonunun azalmasına rağmen, fark edilebilir bir tubuler dejenerasyon ya da atrofi gözlenmediği, spermatogenesis ve spermatozoa ile ilişkili anormalliklerin bulunmadığı bildirilmektedir.<sup>7</sup> Horozlarda yaşlanmaya bağlı olarak histomorfolojik değişiklikler gözlenmezken yaşlı insanların testislerinde arteriosklerosis,<sup>14</sup> semifer tubul bazal membranında kalınlaşma<sup>15</sup> ve fitik benzeri çıkıntılılaşmanın şekillendiği,<sup>16</sup> spermatogenesisin bozulduğu ve spermatidlerde şekil bozukluğunun gözlendiği<sup>17</sup> bildirilmektedir.

Çok düşük fertiliteye sahip yaşlı horoz<sup>18</sup> ve insanlarda,<sup>18</sup> interstisyel dokuda Leydig hücrelerinin sayısı azalır. Yaşlı insanların Leydig hücrelerinde aynı zamanda lipofuksin pigment birikimi gerçekleşir.<sup>19</sup> Yaşlı Norveç Kahverengi sıçanların Leydig hücre sayısında değişiklik gözlenmezken, Leydig hücrelerinin steroidogenik fonksiyonu azalmaktadır.<sup>20</sup> Meydana gelen sayısal veya fonksiyonel azalma testosteron hormon seviyesini düşürmektedir.

Testiküler aktivite bir negatif feedback mekanizmasıyla hipotalamo-hipofizyel-testiküler eksen tarafından kontrol edilir.<sup>21</sup> Memeli hayvan türlerinde testosteron ve bu molekülün aromatisasyonu ile meydana gelen östradiol, negatif geri bildirim yoluyla LH'yı dolayısıyla testosteron üretimini geçici olarak baskılamak üzere hipotalamusu ve hipofiz bezinin söz konusu hormonları sentez faaliyetlerini baskılar. Düşen serum testosteron seviyesine yanıt olarak tekrar GnRH ve LH üretilir.<sup>22</sup> Horozlarda bu durum farklıdır, düşük fertiliteli yani 20 ve 72 haftalık horozlarda plazma östradiol seviyeleri yükselir ve LH seviyeleri düşer. Bundan dolayı yüksek fertiliteli horozlarda düşük östradiol seviyeleri, LH ve testosteronun plazma seviyelerinin yükselmesine yol

açar. Dolayısıyla, düşük fertiliteli horozlarda yüksek östradiol seviyeleri negatif geri bildirim mekanizması yoluyla hem LH hem de testosteronun plazma seviyelerini düşürür. Düşük fertiliteli horozların testislerinde normal spermatogenesis gerçekleşmekte ve ejakulata spermatozoa kalitesinde düşüş oluşmadığı halde, spermatozoa konsantrasyonunda bir azalma ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle spermatogenesisin kesin olarak LH ve testosteron seviyelerindeki azalmadan etkilenmediği bildirilmiştir.<sup>22</sup>

Testosteron, Sertoli hücre fonksiyonlarını parakrin yolla kontrol eder. Plazma LH ve testosteron hormonları ile testiküler testosteron hormon düzeylerinin azalması, Sertoli hücre fonksiyonunun bozulmasına ve sonuçta spermatozoanın Sertoli hücre membranlardaki invaginasyonlarda tutulumuna ve sonuç olarak da ejakulata spermatozoa konsantrasyonunda düşüşe neden olmaktadır.<sup>23</sup> Bozulan spermatogenesis, Sertoli hücrelerinin sitoplazma dışındaki özelleşmiş yapılarında yerleşen aktin benzeri filamentlardaki bozukluğundan kaynaklanır. Sertoli hücrelerine tutunan spermatidlerin akrozomlarını çevreleyen invaginasyonlarda bulunan bu özel yapılar semifer tubullerdeki olgun spermatozoonların serbeleştirilmesinde rol oynarlar. Bu özel yapıdaki bozukluklar Sertoli hücre membranında ki invaginasyonlardan hücrelerin salıverilmesini engellediğinden ejakulattaki spermatozoa konsantrasyonunu azalmaktadır.<sup>24</sup>

Mevsime bağlı siklus gösteren bıldırcınlarda fertil erkeklerin testisleri çok sayıda Sertoli hücresi spermatozoa kompleksleri içermekle birlikte; bu komplekslerin sayısı düşük fertiliteli yaşlı bıldırcınlarda çok azdır.<sup>11</sup> Evcil horozlarda ise bu komplekslerin sayılarının 20 haftalıktan 110. haftalığa kadar sürekli artmaya devam ettiği bildirilmiştir.<sup>1</sup> İnsanlarda ise yaşlanmaya bağlı olarak Sertoli hücrelerinin sayı ve fonksiyonlarıyla, Sertoli hücre başına düşen spermatid sayısında azalma meydana gelmektedir.<sup>15,25,26</sup>

Kuşların da dahil olduğu mevsimsel seksüel siklus gösteren hayvanlarda üreme olaylarının zamanlaması ve düzenlenmesinde foto uyaranlar önemli bir rol oynamaktadır.<sup>27</sup> Sığırcıkların uzun süre kesintisiz 18 saat ışığa maruz kalması önce plazma testosteron seviyesinde önemli bir düşüşe, takiben cinsiyet hücrelerinde apoptozis frekansında artışa ve en son olarak da testiküler regresyona neden olmaktadır. Bununla birlikte, testiküler regresyonda semifer tubullerdeki yer alan Sertoli hücrelerinin çok azının apoptozise uğradığı sanılmaktadır.<sup>28</sup> Yaşlı erkeklerde, özellikle spermatogonial apoptozisin baskılandığı halde primer spermatositlerdeki apoptozisin arttığı,<sup>25</sup> yaşlı farelerde ise germ hücrelerinin apoptozis frekansında değişiklik olmadığı bildirilmiştir.<sup>29</sup>

Testosteron testiste cinsiyet hücreleri için yaşamsal bir faktördür. Testosteronun azalması veya yokluğu apoptotik hücre ölümünü artırır. Hipofizektomiye takiben cinsiyet hücrelerinde oluşan apoptozis artışı, ekzojen olarak testosteron verilmesiyle normale dönmektedir.<sup>30-32</sup> Sığırcıklarda testosteron seviyesinin fotoperiyoda bağlı olarak düşüşü, öncelikli olarak GnRH'nın dolayısıyla FSH ve LH'nın sentezi ve sekresyonundaki azalmadan kaynaklanmaktadır.<sup>33-35</sup> Bu endokrin değişiklikler de testiste apoptozis frekansının artmasına sebep olmaktadır.<sup>36</sup>

Evcil horozlarda yaşlanmaya bağlı olarak azalan fertilitede, testis dokusunda belirgin histolojik değişiklikler ortaya çıkmadığı halde, testis ağırlığı ve testosteron düzeyi azalmaktadır. Testis ağırlığındaki düşüşün spermatogenik hücrelerin apoptozisindeki artıştan kaynaklanabileceği düşünüldüğünden bu çalışmada anılan hücrelerdeki apoptozisin aktivitesi belirlenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### *Çalışmada Kullanılan Hayvanlar ve Bakım koşulları:*

Çalışmada 35 haftalık ve damızlık olarak çiftleşmesine izin verilen Ross ırkı etçi 5 adet horozlarla yine aynı ırktan ve damızlıktan çıkarılan 5 adet 72 haftalık horoz kullanıldı. Hayvanların bakım ve beslenmesi Bilecik ili Dodurga ilçesinde bulunan CP firmasına ait broiler damızlık işletmesinde gerçekleştirildi.

### *Testis Ağırlığının Belirlenmesi ve apoptozisin histolojik Yöntemle Belirlenmesi Amacıyla Doku Örneklerinin Alınıp İşlenmesi*

Horozlar öldürüldükten sonra testisleri alındı ve tartıldı. Sağ testis dokuları Bouin tespit solusyonunda tespit edildi. Rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafinde bloklandı ve bloklardan 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Testis dokusunda genel histolojik yapının incelenebilmesi için doku kesitleri Mallory'nin Crossmann tarafından modifiye edilen üçlü boyama yöntemi ile boyandı. Apoptotik hücrelerin boyanması amacıyla DNA fragmentasyonunun belirlendiği TUNEL metodu (TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick end labelling) uygulandı. Bu amaçla ApopTag® Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Kit (Chemicon S7101) kullanıldı.

### *Boyama ve Mikroskopik Değerlendirme*

Ksilol serilerinden geçirilen kesitler takiben dereceli alkol serisinden (%100, 90,80,70) geçirilerek dehidre edildi. Kesitler proteinkinaz K uygulamasını takiben distile suda yıkandı ve endojen peroksidazın inaktivasyonu için %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 5 dk inkübe edildi. Tamponlu serum fizyolojikle (PBS) yıkanan kesitler TdT enzimiyle 1 saat süreyle 37°C de inkübe edildi. PBS'le yıkanan kesitler daha sonra anti-digoxigenin konjugatla nemli ortamda 30 dk süreyle inkübe edildi. PBS'le yıkanan kesitlerde kontrollü şekilde peroksidaz enzimi demostre edildi. Distile suyla yıkanan kesitlere metil

green ile 10-30 dk çekirdek boyası uygulandı. Kapatılan kesitler ışık mikroskopuyla incelendi ve gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları kaydedildi. Testiste seminifer tubullerin yuvarlak şekilli kesitlerinden rastgele 40 tanesi seçilerek, her bir seminifer tubul içerisindeki apoptotik hücre sayısı belirlenerek, her hayavanda seminifer tubul başına ortalama apoptotik hücre sayısı belirlendi.

## BULGULAR

Testis ağırlıkları ortalamaları genç (35 haftalık) grupta 13.02± 0.66g iken, yaşlı (72 haftalık) grupta 6.02 ± 0.41g olarak bulundu. Genç ve yaşlı grupların ortalama testis ağırlıkları arasındaki farkın p<0.001 düzeyinde önemli olduğu saptandı (Çizelge 1).

Genç ve yaşlı gruptaki horozların; testis dokuları arasında histolojik fark tespit edilmedi.

Seminifer tubul duvarındaki spermatogenezin değişik aşamalarındaki hücrelerde apoptozis gözlemedi (Şekil 1). İntertubuler alandaki içerisinde bulunan Leydig hücrelerinde ise apoptozis gözlemedi. Seminifer tubul başına düşen ortalama apoptotik hücre sayısı ortalaması 35 haftalık grupta 0.53 ± 0.06 iken 72 haftalık grupta 1.60 ± 0.12 olarak belirlendi. Genç ve yaşlı gruplar tubul başına düşen ortalama apoptotik hücre sayıları arasında istatistikî olarak önemli fark (p<0.001) olduğu saptandı (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Grupların Ortalama Seminifer Tubul Başına Düşen Apoptotik Hücre Sayısı ve Testis ağırlıkları

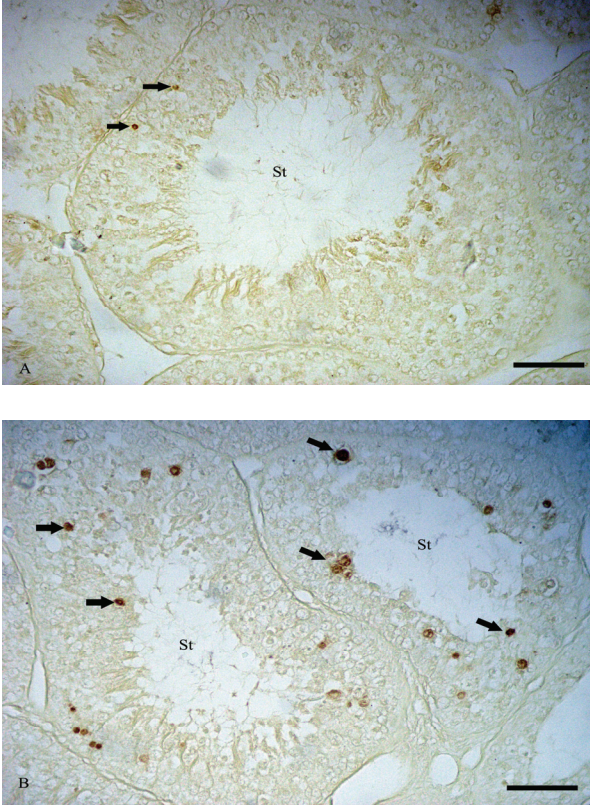
**Table 1.** The number of apoptotic cells per seminiferous tubule and testis weight between two groups

	Genç X±Sx	Yaşlı X±Sx
Testis ağırlığı	13.02 ± 0.66	6.02 ± 0.41*
Seminifer tubul başına düşen apoptotik hücre sayısı	0.53 ± 0.06	1.60 ± 0.12*

Aynı satırda \* taşıyan ortalama değerler arasındaki farklar istatistikî öneme sahiptir. (\*p<0.001).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Otuz beş haftalık horozların ortalama testis ağırlığıyla karşılaştırıldığında daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu biçimde<sup>21</sup> 72 haftalık horozların ortalama testis ağırlıklarının önemli derecede düşük olduğu belirlendi. Testis ağırlıklarındaki azalmaya rağmen, seminifer tubul duvarı ve inter tubuler alanlarda yaşlanmayla ilgili histolojik değişiklikler gözlemedi. Mevsimsel siklus gösteren kuşların



**Şekil 1.** Seminifer tubul duvarındaki apoptotik germ hücreleri (ok). A) Genç group, B) Yaşlı group, TUNEL (50µ)  
**Figure 1.** Germ cell in the wall of the seminiferous tubuli (arrow). A) Young group, B) Aged group, TUNEL (Bar: 50 µ)

siklus göstermedikleri mevsimlerde plazma testosteron düzeyi ve spermatozoa konsantrasyonunun düştüğü ve seminifer tubul atrofisinin şekillendiği belirtilmekle birlikte,<sup>8-13</sup> bu çalışmanın bulguları yaşlı horozlarda Leydig hücre sayısında dolayısıyla testosteron seviyesindeki azalma<sup>7</sup> ve spermatozoa konsantrasyonunun düşüşün, intratubuler regresyona ve dejenerasyona yol açmadığını, spermatogenesisin bozulmadığını bildiren araştırmacıların<sup>7</sup> sonuçlarıyla uyumludur bulgularımız uyumludur. Horozlarda, yaşlanmaya bağlı olarak seminifer tubul duvarında belirgin histomorfolojik değişiklikler gözlenmediği halde, yaşlı insanların testislerinde arteriosklerosis,<sup>14</sup> seminifer tubullerin bazal membranında kalınlaşma<sup>15</sup> ve fitık benzeri evaginasyon meydana geldiği,<sup>16</sup> spermatogenesisin aksadığı ve spermatidlerde şekil bozukluğunun meydana geldiği<sup>17</sup> bildirilmektedir.

Testosteron hormonu Sertoli hücre fonksiyonlarını parakrin yolla kontrol etmektedir. Horozlarda plazma ve testiküler testosteron hormon seviyelerinin azalması, Sertoli hücre fonksiyonunun bozulmasına ve sonuçta spermatozoanın Sertoli hücre invaginasyonları içindeki tutulumuna dolayısıyla ejakulatta spermatozoa konsantrasyonunda azalmaya neden olmaktadır.<sup>23</sup> Bozulan spermiyasyon Sertoli hücrelerinin ektoplazmik özelleşmiş yapılarında lokalize olan aktin benzeri filamanların şekil

bozukluğundan kaynaklanır. Bu özelleşmiş yapıların bozulması Sertoli hücre invaginasyonlarından spermatozoonların saliverilmesini engellemekte neticede, ejakulattaki spermatozoa konsantrasyonunu azaltmaktadır.<sup>24</sup> Yaşlanmaya bağlı olarak horozlarda spermatozoon konsantrasyonunda dolayısıyla infertilitede azalmanın insanlardaki gibi testiküler dejenerasyondan kaynaklanmadığı Sertoli hücrelerinin

olgun spermatozoonları salivermesindeki bozukluktan kaynaklandığı ileri sürülmesine rağmen, horozlarda infertilite düşüklüğünün spermatogonial apoptozisteki artıştan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Apoptozis, hücrelerin fizyolojik ölümüdür.<sup>37</sup> Cinsiyet hücreleri için yaşamsal bir faktör olan testosteron plazma düzeyinin düşmesi veya yokluğu apoptotik hücre ölümünü artırır. Hipofizektomiden sonra cinsiyet hücrelerinde görülen apoptozisteki artış, ekzojen olarak testosteron verilmesiyle normale dönmektedir.<sup>30-32</sup> Sığırcıklarda fotoperioda bağlı olarak GnRH'nın dolayısıyla FSH ve LH'nın sentezi ve sekresyonundaki azalmadan dolayı testosteron seviyelerinin düşmesine bağlı olarak da apoptozisin arttığı bildirilmektedir.<sup>33-35</sup> Bu çalışmamızda yaşlı horozlarda germ hücre apoptozisinin önemli derecede arttığını gözlemledik. Bizim bulgularımızla paralel olarak yaşlı insanlarda, apoptozisin arttığı gözlenirken,<sup>25</sup> aksine yaşlı farelerde germ hücre apoptozisinde önemli bir artışın görülmediği bildirilmektedir.<sup>29</sup>

*Kanatlıların testislerinde cinsiyet hücrelerinin apoptozisinin anormal olarak artması ve hızlanması hücre çoğalması ve ölümü arasında bir dengesizliğe ve spermatogenesisinde bir bozulmaya yol açacaktır. Bununla birlikte genetik olarak hasarlı işe yaramayan hücrelerin apoptozis ile uzaklaştırıldığı da bildirilmektedir.<sup>37</sup> Yaşlanmaya bağlı olarak vücut hücrelerinde çoğalma azalırken, doğal fizyolojik ölüm artmaktadır. Aynı şekilde horozların germ hücrelerinin çoğalmasının azaldığını ve apoptozisinin arttığını buna bağlı olarak da horozlarda fertilitenin azaldığını düşünmekteyiz. ■*

## KAYNAKLAR

1. **Akçapınar H** (1994) Türkiye koyun ırkları. In: Akçapınar H, editör. *Koyun yetiştiriciliği*, 1. Baskı, Medisan yayınları, Ankara, 108-123.
2. **Kaymakcı M, Oguz I, Un C, Bilgen G, Taksim T** (2001) Basic characteristics of some Turkish indigenous sheep breeds. *Pakistan J Biol Sci*, 4:916-919.
3. General breed information. <http://dagris.ilri.cgiar.org/display.asp?ID=1276> Erişim: 15 Mart 2009.
4. Sheep breed. <http://www.innvista.com/science/zoology/domestic/sheep.htm> Erişim: 20 Mart 2009.
5. **Kılıçarslan MG** (2001) Gebelik patolojileri. In: Alaçam E, editör. *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*, 3. Baskı, Medisan yayınları, Ankara, 121-130.
6. **Ünal EF** (2001) Küçük ruminantlarda infertilite sorunu. In: Alaçam E, editör. *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*, 3. Baskı, Medisan yayınları, Ankara, 311-315.
7. **Haziroğlu R, Milli ÜH** (1998) Dişi genital sistem. In: Haziroğlu R, Milli ÜH, editör. *Veteriner Patoloji*, II. Cilt, 1. Baskı, Tamer Matbaacılık, Ankara, 433-538.
8. **Daniel Givens M, Marley MSD** (2008) Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, 70:270-285.
9. **Dixon AB, Knights M, Winkler JL, Marsh DJ, Pate JL, Wilson ME, Dailey RA, Seidel G, Inskeep EK** (2007) Pattern of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. *J Anim Sci*, 85:1274-1284.
10. **Jonker FH** (2004) Fetal Death: Comparative aspects in large domestic animals. *Anim Reprod Sci*, 82:415-430.
11. **Parraguez VH, Atlagich M, Diaz R, Bruzzone ME, Behn C, Raggi L** (2005) Effect of hypobaric hypoxia on lamb intruterine growth: Comparison between high- and low-altitude native ewes. *Reprod Fert Develop*, 17: 497-505.
12. **Parraguez VH, Atlagich M, Diaz R, Cepeda R, Gonzalez C, De los Reyes M, Bruzzone ME, Behn C, Raggi LA** (2006) Ovine placenta at high altitudes: Comparison of animals with different times of adaptation to hypoxic environment. *Anim Reprod Sci*, 95:151-157.
13. **Rumball CWH, Harding JE, Oliver MH, Bloomfield FH** (2008) Effects of twin pregnancy and periconceptual undernutrition on maternal metabolism, fetal growth and glucose-insulin axis function in ovine pregnancy. *J Physiol*, 586:1399-1411.