



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SÜTÇÜ İNEKLERDE CİNSİYETİ BELİRLENMİŞ SPERMANIN KULLANIMI**

**Ebru KARAKAYA**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Bursa-2014**



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SÜTÇÜ İNEKLERDE CİNSİYETİ BELİRLENMİŞ SPERMANIN KULLANIMI**

**Ebru KARAKAYA**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Danışman: Prof. Dr. Ahmet GÜMEN**

**Bursa-2014**

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
BULGULAR.....	25
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	32
EKLER.....	36
KAYNAKLAR.....	37
TEŞEKKÜR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	49

## ÖZET

Bu çalışmada senkronizasyon protokolü uygulanmış sütçü ineklerde cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) ve normal semen (NS) ile yapılan tohumlamalardan elde edilen gebelik oranlarının karşılaştırılması amaçlandı. Çalışma Bursa bölgesinde yer alan 1000 başlık bir sütçü işletmede 302 adet Holştayn ırkı sütçü ineğin kullanılmasıyla yapıldı. Çalışmaya dahil edilecek ineklerin günlük süt verimleri, daha önceki reproduktif kayıtları, sağlık ve yönetim ile ilgili verileri her bir hayvan için Alpro 2000 (DeLaval, Tumba, Sweden) software sisteminden alındı. Çalışma grubuna sağlık problemleri olmayan inekler dahil edildi. Tüm ineklerin vücut kondüsyon skorları çalışmaya alındıkları gün, 1 ve 5 skorlama aralığında 0.25'lik artış katsayısı olan bir skorlama sistemine göre belirlendi ve kaydedildi. Çalışma grubundaki ineklerde kullanılacak olan Ovsynch senkronizasyon protokolüne ovaryumları üzerinde bir adet korpus luteum ile 10 mm ve üzerinde folikülü olan inekler alındı. Tohumlama zamanında 12-18 mm arasında folikülü olan ve temiz vajinal akıntısı tespit edilen inekler muhtemel ovulasyonun olacağı büyük folikülün bulunduğu ovaryum tarafındaki kornu uteriye spermanın bırakılması yöntemi ile tohumlandı. Çalışmadaki tüm ineklerin foliküler dinamikleri uygulanan senkronizasyon periyodu içerisinde belirli aralıklarla takip edilip kayıt altında tutuldu. Tohumlamalar rastgele bir dağıtım şeklinde cinsiyeti belirlenmiş sperma (n=148) ya da normal semen (n=154) ile yapıldı. Çalışmadaki gebelik oranları CBS'da %31.8, NS'de %40.9 bulundu (P=0.09). Sonuç olarak; yapılan çalışmada Ovsynch ile senkronize edilen ineklerde CBS ile elde edilen gebelik oranlarının NS'den daha düşük bulunmasına rağmen belirli kriterler eşliğinde tohumlamaların yapılması sonucunda özellikle dişi buzağı elde etmek isteyen sütçü işletmelerde kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** İnek, cinsiyeti belirlenmiş sperma, senkronizasyon

## SUMMARY

The aim of this study was to compare the pregnancy per artificial insemination (P/AI) with sex-sorted sperm or conventional semen in synchronized lactating dairy cows. The study was conducted with 302 Holstein-Friesian cows from a commercial dairy herd of approximately 1,000 milking cows located in Bursa. The daily milk yield and previous reproductive, health, and management information were collected from individual records within the Alpro 2000 software system (DeLaval, Tumba, Sweden). The healthy cows were included in the study. The body condition (BCS) of cows was scored by using a 1 to 5 scale with 0.25 increments. Only cows with a corpus luteum and at least one follicle with diameter equal or greater than 10 mm at the beginning of Ovsynch protocol were included the study. The cows with follicles with diameter between 12 and 18 mm and with clear vaginal mucus were inseminated which is a shallow uterine insemination in the uterine horn ipsilateral to the pre-ovulatory follicle. Ultrasonography examinations of the ovaries were performed during the synchronization protocol. Insemination of cows were randomized with either frozen-thawed sex-sorted sperm (sex-sorted; n=148) or conventional semen (conventional; n=154). Pregnancy rate was 31.8% in CBS and 40.9% in NS groups in the study. In conclusion, insemination with sex-sorted sperm reduced fertility of lactating dairy cows subjected to a TAI program than non-sorted semen. However, selection of cows that had a synchronized ovulation with specified follicle diameter at AI typical of cows that would increase to use of sexed semen in dairy which wants to get more heifers.

**Key words:** Cow, sex-sorted sperm, synchronization

## GİRİŞ

Hayvancılık sektörünün özellikle de süt sığırcılığı sektörünün yaşamış olduğu en büyük sorunlardan bir tanesi kaliteli damızlık hayvan teminidir. Bu nedenle doğacak yavruların cinsiyetlerinin önceden belirlenmesi yetiştiricilikte üretim stratejilerinin ve sürü içi büyüme programlarının planlanması gibi bazı avantajları beraberinde getirmektedir. Bakım ve besleme koşulları ne kadar iyi olursa olsun hayvanların süt verimlerinin yüksek olmasına bağlı olarak döl verimlerinin azalması ve gebe kalan ineklerden de doğan yavruların ancak %46-47'sinin dişi olması sürü içi büyümeyi belirli bir noktada baskılamaktadır.

Birçok canlıda doğacak yavrunun cinsiyeti fertilizasyon aşamasında belirlenen bir olaydır. Ovulasyon sırasında X kromozomu taşıyan ovum atılarak dişi genital sistemde fertilizasyonun şekilleneceği noktaya gelir. Ovum erkekten gelen X kromozomu taşıyan sperm ile birleştiğinde dişi (XX), Y kromozom taşıyan sperm ile birleştiğinde ise erkek (XY) cinsiyeti oluşur. Bu nedenle tohumlamada kullanılacak olan spermanın X ve ya Y kromozomuna göre sınıflandırılabilmesi cinsiyetin önceden tayinini sağlar. İlk cinsiyet kromozomu tayini Guyer (1) tarafından 1910 yılında mikroskopik olarak yapılmıştır. Bunu takip eden çalışmalarda, santrifügasyon, elektroforez, sedimentasyon, filtrasyon, immunolojik teknikler ve motilite kriterleri gibi yöntemler kullanılmıştır (2-7). Ancak bu yöntemler ile cinsiyete göre spermlerin ayrımı işleminin yeterince doğru yapılamamasından dolayı adı geçen tekniklerin pratikte kullanılmasının pek de güvenilir olmadığı bildirilmiştir (8). Son yıllarda, gelişen sperma teknolojisiyle birlikte, flow-sitometrik yöntem ile yaklaşık %90 kesinlikte spermanın istenilen cinsiyete göre ayrımı yapılabilmektedir (8, 9). Bu yöntem ile spermanın sınıflandırılması süreci masraflı ve uzun bir işlem olmakla birlikte makinaya giren semenin ancak %15'i X sperması olarak ayrılabilir. Bu nedenle sperm etkinliğinden yararlanmak amacıyla payetlere 2 milyon canlı sperm konulmaktadır (8). Flow-sitometri yöntemi ile elde edilen cinsiyeti belirlenmiş spermalar uygun şekillerde payetlenerek tüm dünyada ticari kullanıma sunulmaktadır. Günümüzde flow-sitometri ile cinsiyet tayini yapılmış sperma kullanımının pratik olarak yetiştiricilikte kullanılmasında artış görülmektedir. Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan tohumlamalar sonrasında doğan buzağuların doğum zamanı, doğum ağırlığı veya büyüme performansları bakımından normal semen ile elde edilen buzağulardan farklı olmadığı bilimsel olarak kanıtlanmıştır (10). Bununla birlikte cinsiyeti

belirlenmiş sperma kullanımı sürü içerisinde genetik meriti yüksek olan ineklerin çoğalmasını ve en iyi düvelerin sürü içerisinde sayıca artmasını sağlar (11)

Dejarnette ve ark. (12) cinsiyeti belirlenmiş spermanın Amerika'daki kullanım kayıtlarına dayanarak çıkarttığı sonuçlar gebelik oranlarının normal sperma ile yapılan tohumlamalar sonrasında elde edilen gebelik oranlarından daha düşük olduğu yönündedir. Bu değerlendirmede, cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan tohumlamalardaki gebelik oranı ortalama %45 (%27 ile %70) iken normal spermada bu oran %56 (%34 ile %83) bulunmuştur. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki semenin ayrılması sırasında yapılan bir takım işlemlerin sperma kalitesi üzerine olumsuz etkisi olurken ayırma işlemi için kullanılacak semenin alındığı boğanın da etkisi bulunmaktadır (13). Genel olarak gebelik oranlarındaki düşüş nedeniyle cinsiyeti belirlenmiş sperma düvelerde daha yaygın bir kullanım alanı bulurken sütçü ineklerle ilgili yapılan çalışmalar belirli sınırlar içerisinde kalmaktadır. Özellikle Türkiye gibi kaliteli düve sıkıntısı çeken ve yurtdışından düve ithal eden ülkelerin elinde bulundurduğu kaliteli damızlık ineklerden daha fazla dişi buzağı elde edebilmesi önemli bir husustur. Daha öncede belirtildiği gibi her bir tohumlamada dişi buzağı elde etme oranı %45-48 arasında değişmektedir. Bu nedenle de genetik özelliği iyi olan sütçü ineklerde cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı ile dişi buzağı elde edebilme ihtimali %90'lara kadar çıkarılabilmektedir.

Bu çalışmada özellikle son yıllarda sahadaki kullanımı artmaya başlayan cinsiyeti belirlenmiş spermanın sütçü ineklerdeki rolü irdelenmiştir. Buzağı cinsiyetinin önceden tayin edilebilmesi ülkemiz hayvancılığına ve ekonomisine önemli katkı sağlayacağı kaçınılmazdır. Bu nedenle, bu çalışmada sütçü ineklerde cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı sonrası yeterli gebelik oranlarının elde edilebilmesi ve ekonomik bir çerçevede kullanımının yaygınlaşabilmesi amacıyla uygun bir senkronizasyon protokolünün belirlenmesi hedeflenmiştir.

## GENEL BİLGİLER

### İneklerde Seksüel Siklus

İneklerde seksüel siklus foliküllerin gelişimi-büyümesi, ovulasyonu, korpus luteumun oluşumu ve korpus luteumun gerilemesi (luteolizis) evrelerinden meydana gelen bir takım olaylar zinciridir. Östrus siklusu foliküler ve luteal faz olmak üzere iki önemli bölümden oluşmaktadır. İneklerde östrus mevsime bağlı olmadığı için, bütün yıl östrus gösterebilirler. Östrus siklusu ile ilgili yapılan çalışmalarda ineklerin 17-26 gün arasında değişen fakat %82 oranında da 22 günlük inter-östrus aralığına sahip olduğu Olds ve Seath (14) tarafından 1951 yılında rapor edilmiştir. İneklerde östrus siklusu ve fazları McNutt (15) ve Cole'un (16) çalışmalarını takiben ilk olarak 1955 yılında Hammond (17) tarafından tanımlanmıştır. Rajokoski (18) yaptığı çalışma sonucunda ineklerin genellikle iki foliküller dalgaya sahip olduğunu belirtmiştir. Ultrasonografinin 1980'li yıllarda kullanılmaya başlamasıyla ineklerdeki foliküler dinamiğin ve seksüel siklusun anlaşılabilmesi daha iyi olmuştur. İneklerde seksüel siklus proöstrus, östrus, metaöstrus ve diöstrus olmak üzere dört evreden oluşmaktadır (19). Proöstrus evresi korpus luteumun (CL) yapısal ve fonksiyonel regresyonu ile başlayıp preovulator folikülden östrojenin salındığı 2-4 günlük bir süreçtir (20). Sütçü ineklerde plazmadaki östradiol konsantrasyonu luteolizisin başından östrusa kadar olan sürede yaklaşık 2,5 pg/ml den 7,9 pg/ml'ye kadar yükselir (21). Östradiol konsantrasyonu östrustan bir gün önce pik yaparak 9,7 pg/ml seviyelerine kadar ulaşır (20). Yapılan çalışmalarda ovulasyon öncesinde maksimum östrojen konsantrasyonunun sütçü ineklerde düvelerden düşük olduğu (9,7 pg/ml' ye karşın 11,3 pg/ml) tespit edilmiştir (20, 21). Progesteron seviyesinin düşmesinin yanı sıra artan östrojen konsantrasyonu sonucunda proöstrusun bitip östrusun başladığını gösteren seksüel davranışlar görülmeye başlar (21, 22). Östrus, seksüel belirtilerin başlamasından dominant folikülün ovulasyonuna kadar geçen süredir (19). İneklerde östrusun süresi diğer evcil hayvanlara göre kısadır ve ortalama 18 saat olabilen bu sürede proöstrus döneminde başlayan fizyolojik değişimler daha da artmıştır. Diğer ineklerin üzerine atlamasına izin verme, çara akıntısının görülmesi, vulva dudaklarında şişkinlik, aşırı hareketlilik, iştahta ve süt verimindeki azalma bu dönemde görülen bazı belirtilerdir. Bu belirtiler ovulasyon zamanıyla ilişkili olmayıp ovulasyonun yakın bir zamanda gerçekleşebileceğini gösterir (23). Dominant folikülden salınan östradiolün kandaki konsantrasyonu en üst noktaya geldiğinde luteinleştirici hormon (LH) salınımı indüklenir ve



bunu takip eden 24-32 saat içinde ovulasyon şekillenir. Sütçü ineklerde yapılan genetik seleksiyon sonucunda (24, 25) artan süt verimi ile birlikte östrus süresi arasında negatif bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (26). Süt verimi  $\geq 39,5$  kg/gün den fazla olanlarda östrus 6,2 saat iken bu oran süt verimi  $< 39,5$  kg/gün olanlarda 10,9 saat olarak saptanmıştır. Ayrıca yüksek süt verimli inekler düşük verimlilere kıyasla daha büyük dominant foliküle sahip olmalarına rağmen östradiol konsantrasyonları daha düşüktür (26). Foliküler fazdaki dominant folikülün ovule olmasından genç CL'un yeterli seviyede progesteron salgılamaya başlamasına kadarki geçen süreye metöstrus denir (19). Ovulasyondan sonraki 4. gün metöstrusun sonu olarak tanımlanır. Dolaşımdaki progesteron konsantrasyonundaki en önemli artış 4. Günden sonra meydana gelir (27). Diöstrus, inek östrus siklusu içerisindeki en uzun süren evredir yaklaşık 10-14 gün sürer ve progesteron konsantrasyonu 4. günden (1,5 ng/ml) 8. güne (5,5 ng/ml) kadar hızlı bir artış gösterir (27). Bu noktadan sonra progesteron konsantrasyonundaki artış yavaştır ve ovulasyondan sonraki 16. günde yaklaşık olarak maksimum 7 ng/ml seviyesine (6,1-10,2 ng/ml) ulaşır (26). Eğer gebelik şekillenmemiş ise siklusun 17. ve 19. günlerinde uterus endometriyumundan salınan prostaglandinF<sub>2α</sub>'nın (PGF<sub>2α</sub>) etkisi ile CL'un spontan luteoliziz süreci başlar (21, 28, 29).

### **Foliküler Gelişim ve Aşamaları**

Tüm türlerde olduğu gibi ineklerde de seksüel siklus beynin hipotalamus ve hipofiz bölgelerinden salınan hormonlarla, ovaryum ve uterustan salınan hormonların koordineli etkileşimi ile düzenlenmektedir. Ruminantlarda foliküler gelişim fetal dönemde başlayan endokrin, parakrin ve otokrin sistemlerin kontrolünde gelişen çok yönlü bir süreçtir (30). Foliküler gelişim prepubertal dönemde (31), gebelikte (32), postpartum dönemde (33) ve östrus siklusu süresince (34) görülebilir. İneklerde ovulasyonlar arası süre boyunca bir ile dört arasında foliküler dalga göstermekle birlikte genelde 2-3 foliküler dalgaya sahiptirler. Üç dalgalı foliküler siklusta CL'un yaşam süresi daha uzun olmasına rağmen dominant folikülün gelişimi ve dominantlıktan ovulasyona kadar olan süre üç foliküler dalgaya sahip ineklerde daha kısadır (35). İki dalgalı foliküler gelişimde dalgaların başlama zamanları 2. ve 11. gün iken bu süre üç dalgalı foliküler gelişimde 2., 9. ve 16. günlerde olur (36).

## **Folikülogenezis**

Folikülogenezis primordial foliküllerin dominant folikül haline gelene kadar geçirdikleri değişim sürecidir (37, 38). Folikülün oosit büyüklüğündeki değişim, granuloza hücre morfolojisi ve oositi çevreleyen granuloza hücre katlarının sayısı (39) temel alınarak yapılan sınıflandırmada bir folikül primordial, primer, sekonder ya da tersiyer folikül olarak adlandırılabilir (40). Sığır primordial foliküllerinin aktive olup preovulator folikül haline gelene kadarki geçen süre yaklaşık 80-100 gündür (41). Oositler mitozun profaz I aşamasına kadar geldikten sonra primordial foliküller içerisinde sabit fazda beklemeye başlarlar (42). Primordial foliküller oositi çevreleyen tek katlı granuloza hücre katı ile karakterize 40µm'den küçük foliküllerdir. Bu aşamada kemik morfojenetik protein 6 (Bone morphogenetic protein, BMP-6) ve büyüme ve farklılaşma faktörü (Growth differentiating factor 9, GDF-9) gibi çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörlerinin etkisi olduğu görülmüştür (43). Ancak, primordial foliküllerin aktive olmasını sağlayarak büyüme fazına geçiren mekanizma kesin olarak anlaşılamamasına rağmen gonodotropik hormonların burada bir etkisi olmadığı konusunda hem fikir olunmuştur (44). Oositi çevreleyen granuloza hücrelerinin küboidal yapıya geçip sayıca artması aşaması primer folikülün gelişimi olarak adlandırılırken, büyüyen granuloza hücrelerinden folistatin için mRNA üretimi başlar (44). Salınan folistatin aktivin A'yi inhibe ederek büyüyen folikülü aktivin A'nin büyümeyi baskılayıcı etkisinden korur (44). Foliküler gelişim oosit (BMP-6, BMP-15, GDF-9), granuloza hücreleri (inhibin, folistin) ve teka hücreleri (transformik büyüme faktörü  $\beta 1$  ve 2, progesteronlar, androjenler) tarafından salgılatılan bir çok faktör tarafından kontrol edilir (43). Oositten salınan GDF-9 ve BMP-15 arasındaki interaksiyon sonucunda granuloza hücre değişimi hızlanır (45). Bu dönemde granuloza hücreleride kit ligand üretimini sağlayarak oositin büyümesini sağlar (46). Büyümeye devam eden oosit ikinci küboidal granuloza hücre katına sahip olduğunda sekonder folikül olarak adlandırılmaya başlar (46). Bu aşamada granuloza hücreleri ile oosit arasındaki gap junction şekillenirken zona pellucida gelişir (47) ve oosit transkripsiyonel olarak aktivite göstermeye başlar (48). Granuloza hücrelerinin çok katlı hale gelip folikül içerisinde bir boşluk (antrum) oluşmaya başladığı aşama tersiyer folikül olarak adlandırılır. Oluşan antrum foliküler sıvı ile dolmaya başlar ve folikül çapı giderek artmaya başlar. Tersiyer folikülün büyümesi ovule olabilecek graff folikülü haline gelene kadar devam eder. Bu aşamaya gelen folikül ya atreziye ya da ovule olacaktır (49). Graff folikülü aşamasına ulaşan foliküller için ön seçim, seçim ve dominantlık aşamaları başlar. Bir foliküler stimule edici hormon (FSH) dalgası sonucunda bir kaç küçük tersiyer folikül ön seçim aşamasına geçer. FSH konsantrasyonundaki azalmayla birlikte çok az sayıdaki folikül gelişimine devam

ederken diğeri atreziye olmaya başlar (50). Artan folikül çaplarına göre foliküller 3 sınıfa ayrılabilir: 1. sınıf  $\leq 5$  mm, 2. sınıf 6-9 mm ve 3. sınıf  $\geq 10$  mm olarak gruplandırılabilir. Folikülün programlı bir şekilde ölmesi atreziya olarak tanımlanırken bu süreç foliküler gelişimin herhangi bir aşamasında görülebilir ve bu bir çok folikül için ortak sondur (49). Austin ve ark. (50) yaptığı çalışma FSH pikinden 33 saat sonra sadece iki folikülün büyümeye devam ettiği 53. saatte ise sadece birinin dominant folikül olarak 8,5 mm çapına ulaştığı ve fark edilebildiğini göstermiştir. Seçim aşamasında geleceğin dominant folikülü 8,5 mm çapında ultrasonografik olarak tespit edilirken subordinant büyük folikül 7,2 mm olarak ölçülmüştür (51). Foliküllerin seçiminden sonra granuloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin sayısı artmaya başlar bu da folikülü FSH bağımlı halden kurtarıp LH'dan yararlanabilir hale getirir. Seçimden sonra folikülün büyümesi LH salınımlarına bağlı olarak devam eder. Erken luteal dönemde LH salınımları 24 saat içerisinde 9-16, diöstrus ortasında 6 ve proöstrusta 14-24 olarak görülmüştür (52). Progesteron konsantrasyonundaki azalma LH salınımlarının sayısal artışıyla sonuçlanır ve dominant folikülün maksimum boyuta ulaşmasını sağlar. Sonuçta foliküller seçim aşamasına kadar sadece FSH'a ihtiyaç duyarken bu aşamadan sonra LH salınımları önem kazanmaya başlar. Dominant folikül 12-20 mm çapına kadar gelişimini devam ettirirken östradiol ve inhibin üretimi de buna paralel olarak artarak FSH'yı yani yeni foliküllerin gelişimini baskılar fakat LH üzerine olumsuz bir etkisi olmaz (53). Granuloza hücrelerinden salınan değişiklik yapan beta büyüme faktörü ailesinin bir üyesi olan inhibinin konsantrasyonu foliküler büyüme aşamasında östradiolle birlikte artarken FSH konsantrasyonunda o seviyede azalır (54). İnhibin folikülün bütün aşamalarında salgılanırken östradiol sadece deviasyon aşamasından sonra dominant folikülün seçimi ile artmaya başlar (55). Östradiol tek başına FSH üzerine zayıf bir etkiye sahip iken inhibin ile birlikte çok güçlü baskılayıcı bir etkiye sahip olmaktadır. Genel olarak kabul edildiği üzere FSH konsantrasyonundaki düşüşle birlikte LH konsantrasyonundaki artış foliküler dominantlığı belirleyen en önemli olaydır. Sadece dominant folikül FSH bağımlı fazdan LH bağımlı faza geçebilme yeteneğine sahipken subordinant foliküllerin gelişimi durur ve atreziye olurlar. Folikülün dominant hale gelip final gelişimini tamamlamasında folikülün mikro çevresel özellikleride önemli rol oynar. İntra foliküler insülin benzeri büyüme faktör (IGF) sistemi dominantlığın belirlenmesine yardım eden en önemli faktörlerden birisidir. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) granuloza hücrelerinin proliferasyonunu, gonodotropinlere verilen yanıtın arttırılmasını ve östradiol, aktivin, inhibin, folistatin, ve vasküler endothel büyüme faktörü'nün (VEGF) artışına neden olurken bunlarla koordineli bir şekilde çalışarak hücrel değişimin ve folikülün final büyümesinde esas temeli oluşturur (56, 57). Deviasyon

aşamasında dominant folikül içerisindeki IGF-1 konsantrasyonu artmazken subdominant foliküllerde bu konsantrasyon düşmeye başlar ve eğer subdominant foliküllere intrafoliküler IGF-1 enjeksiyonu yapılırsa onların da dominant oldukları görülebilir (58). Foliküler IGF-1 etkinliği insülin benzeri büyüme hormonu bağlama proteini 4 ve 5 (IGFBP- 4 ve 5) tarafından kontrol edilir. Serbest formdaki IGF-1'in kullanılabilirliği ve kapasitesi reseptörünün sitümulasyonuna bağlıdır, serbest IGF-1 miktarı gebeliğe özgü plazma proteini-A (PAPP-A) enziminin proteolitik aktivitesi ile belirlenir. Bu proteaz IGFBP'lerin azalmasına ve serbest IGF-1'in artışından sorumludur (57, 59). PAPP-A aktivitesindeki artışın geleceğin dominant folikülünde gözlenen en erken modifikasyon olduğu iddia edilmektedir (59). FSH'ın indüklemesiyle granuloza hücrelerinde LH reseptörlerinin oluşumu IGF ile karşılaştırıldığı zaman foliküler dominantlık için daha sonra gelen bir aşama olabilir. Fakat bununla birlikte son yıllarda yapılan bir çalışma (60) granuloza hücreleri üzerindeki LH reseptörlerinin oluşumunun PAPP-A değişimi ve serbest IGF-1 artışından önce olduğunu savunmaktadır. Foliküler deviasyon aşamasından 12 saat önce dominant folikülün granuloza hücrelerinde LH reseptörlerinin ekspirasyonu görülmeye başlar, oysaki PAPP-A ekspirasyonundaki artış sadece foliküler deviasyon anında tespit edilmiştir (60). Aynı çalışmada gonodotropin antagonistinin kullanılması sonucu araştırmacılar, granuloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin oluşumunun LH sekresyonunun kendisi tarafından indüklendiğini iddia etmektedir. Ayrıca LH sinyalleri stereogenik enzim ekspirasyonunu teka (steroidogenic acute regulatory protein; StAR, Cholesterol side-chain cleavage enzyme; CYP11A1) ve granuloza (CYP19A1) hücrelerinde arttırmaktadır. Deviasyondan önce, LH reseptörleri yalnızca teka hücrelerinde görülür ve granuloza hücreleri tarafından üretilen östradiolün üretiminde kullanılmak için androjenlerin üretimi için gerekli olan steriogenik enzimlerin ekspirasyonunu sitümule eder. Deviasyondan sonra, granuloza hücrelerinde LH reseptörlerinin görülmeye başlamasıyla folikül LH'a yanıt verebilir hale gelir ve gelişimine devam eder (52, 60). Ekzojen gonodotropin salınım hormonu (GnRH) ya da LH ile ovulasyonun indüklenmesi deviasyon aşamasını geçmiş foliküller için başarılı bir şekilde sonuçlanır. Lv ve arkadaşlarının (61) yaptığı çalışma sonucunda atretik foliküllerde normal sağlıklı foliküle oranla daha fazla kokain ve amfetamin düzenleyici transkript (CARTPT) ve onun peptidi CART tespit edilmiştir. Ayrıca in vitro ortamda yapılan çalışma göstermiştir ki CART'in FSH ve IGF-1 etkinliği üzerine negatif etkisi vardır, in vivo çalışmalarda ise CYP19A1 ekspresyonu ve östradiol üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (61). İnek gibi tek ovulasyon yapan ırklarda her gebelikteki doğum sayısı önemli bir evrimsel süreç olarak nitelendirilen folikülün dominantlığı ile kontrol edilmektedir. İlginç olarak çoklu ovulasyon yapan ırklarda CARTPT

geni saptanamamaştır ve CART'ın tek ovulasyon yapan ırklarda tek bir dominant folikül seçim işlemi için fonksiyonel bir mediatör olduğu düşünülmektedir (62). Deviasyon aşamasından sonra dominant folikül son gelişim aşaması ve ovulasyona kadar LH bağımlıdır. Bununla birlikte, eğer progesteron seviyesi birinci ve ikinci foliküler dalga süresince yüksek ise üçüncü foliküler dalganın gelişimi görülür.

Dominant folikül 3-4 gün daha büyümesine devam ettikten sonra ovaryum üzerinde aktif bir CL'un olup olmamasına göre ovulasyona yada regresyona gidecektir. Progesteron konsantrasyonunun düşük olduğu dönemde artan östradiol pozitif feed back etki göstererek hipotalamustan pre-ovulator GnRH dalgasını uyarır ve buda hipofizden LH salgısının pik yapmasına neden olarak dominant folikülün ovulasyonu ile sonuçlanır. Östrusa yakın zamanda iki FSH dalgası şekillenir. Bunlardan bir tanesi GnRH/LH piki ile birlikte olarak ovulasyona yardımcı olurken diğeri ovulasyona yakın bir zamanda şekillenerek yeni bir foliküler dalganın başlamasına neden olur.

### **Korpus Luteum Oluşumu, Luteal Dönem ve Luteolizis**

Korpus luteum normal bir östrus siklusu içerisinde gebe olmayan ineklerde 16-18 gün süresince aktif olarak bulunan heterojen bir yapıdır (21, 28). En önemli görevi, östrus siklusunun kontrolü, embriyo/konseptus gelişimini desteklemek ve gebeliğin devamını sağlamak için progesteron üretmektir. Progesteron, foliküldeki teka ve granulosa hücrelerinin ovulasyondan sonra farklılaşarak küçük ve büyük luteal hücrelere dönüşmesi sonucunda CL'dan salınır. Bu nedenle büyük foliküllerin sahip olduğu hücre miktarından dolayı normallere göre daha büyük CL yapısına dönüştüğü ve daha fazla miktarda progesteron salgıladığı düşünülmektedir (63). Granulosa hücreleri büyük luteal hücrelere dönüşür ve bunlar taşıdıkları growth hormon reseptörleri sayesinde progesteron hormonu salgırlar (64). Diğer taraftan teka hücrelerinin farklılaşması ile oluşan küçük luteal hücrelerde ise LH tarafından progesteron üretimi uyarılır. Bazı çalışmalar göstermiştir ki büyük luteal hücreler küçük luteal hücrelere dönüşebileceği gibi küçük hücrelerde büyük luteal hücrelere dönüşebilir (65). Büyük luteal hücreler daha yoğun miktarda PGF reseptörü de taşıdıkları için öncelikle PGF'in etkinliği bu hücreler aracılığıyla olur (66). Ovulasyondan sonraki 2 ile 7 gün süresince CL'un yapısal özelliğini kazanabilmesi için pulslar halinde LH salınımına ihtiyacı vardır. Gebe olmayan ineklerde CL'um ovaryum üzerinde 6-12 gün arasında fonksiyonel olarak bulunurken bu sürede CL'un yaşamını devam ettirebilmesi için LH salınımı gerekli değildir (67). Corpus luteum anjiyogenesis özelliğine sahip bir kaç dokudan

bir tanesidir (68). Anjiyogenezis aşaması tamamlandıktan sonra CL kan akışı en iyi olan ve en yüksek seviyede vaskularizasyona sahip bir organ haline gelir (69).

İyi bilindiği üzere  $PGF_{2\alpha}$  en önemli luteolitik ajan olmakla birlikte CL'un gerilemesini başlatır. Endometriyumun 10 günden daha uzun bir süre progesteron (P4) salınımına maruz kalması sonucunda P4 endometriyum üzerindeki kendi reseptörlerinin gerilemesine neden olurken azalan P4 aktivitesi sonucunda östradiol ve oksitosin reseptörlerinde artış olur (69, 70). Ovaryum üzerinde var olan dominant folikülden salınan östradiol hipotalamik oksitosin salınım merkezini uyararak oksitosin salınımına olanak verir ve salınan oksitosin endometriyuma gelerek kendi reseptörlerine bağlanır. Oksitosin reseptörlerinin aktivasyonu  $PGF_{2\alpha}$ 'nin endometriyumdan salınımına öncülük eder. Östrus siklusunun sonlarına doğru uterus endometriyumundan aralıklı salınmaya başlayan  $PGF_{2\alpha}$  korpus luteum'un ovaryum üzerindeki işlevselliğini sonlandırır. Bunu takiben siklusun (16-19. günlerinde) kandaki progesteron seviyesi gerilemeye başlar ve progesteronun hipotalamus üzerine olan negatif feedback etkisi ortadan kalkarak östrus davranışları şekillenmeye başlar ve yeni bir ovulasyon gerçekleşir (71). Schams ve Berisha (64) yaptıkları *invivo* çalışmada östrus siklusundaki 12. günden önce progesteronun  $PGF_{2\alpha}$  salınımını baskıladığını göstermişlerdir. Bunun yanı sıra, progesteron endometriyumdan  $PGF_{2\alpha}$  salınımına neden olarak CL'un luteolizisini başlatır (72). Siklusun 12. gününden sonra luteal doku progesteron üretim etkinliğini kaybetmeye başlar ve sonuçta  $PGF_{2\alpha}$  daha fazla baskılanamaz. Progesteronun etkinliğinin artması sonucunda, progesteron endometriyumdaki kendi reseptörlerini baskılar ve buda östradiolun etkinliğinde artış ile sonuçlanır (73). Progesteron reseptörlerindeki azalmayla birlikte östrojen reseptörlerindeki artış oksitosin reseptörlerinin artmasına öncülük eder (74). Östradiolun artışı hipotalamustaki oksitosin salınım merkezinden düşük şiddette, yüksek sıklıkta oksitosin salınımına neden olurken uterustaki oksitosin reseptörlerindedeki artış şekillenmeye başlar (75). Oksitosin iki kaynaktan üretilmektedir biri hipofiz on lobu diğeri korpus luteumdur (76) ve uterustan  $PGF_{2\alpha}$ 'nın salınımını aktive eder. Uterustan salınan  $PGF_{2\alpha}$ , luteal hücrelerdeki PGF reseptörlerini etkiler ve sonuçta oksitosin salınımı daha da desteklenerek luteolizis indüklenir. Böylece CL'un regresyonu fonksiyonel ve yapısal olarak; progesteron, östradiol ve oksitosinin koordineli şekilde birbirlerini tetiklemesi sonucu endometriyumdan  $PGF_{2\alpha}$ 'nın salınımına bağlı olarak şekillenir (77). Ovulasyondan sonraki ilk 5 gün gelişmeye başlayan korpus luteum egzojen  $PGF_{2\alpha}$ 'ya yanıt vermez (77, 78). Siklusun 5-6. gününden önce  $PGF_{2\alpha}$ 'ya hiç yanıt vermezken 15. günden sonra da CL doğal gerileme sürecine girdiği için etkinliği önemli değildir. Erken dönemde egzojen  $PGF_{2\alpha}$  'ya yanıt alınamamasının sebebi CL üzerindeki PGF reseptör eksikliğinden olduğu düşünülürken Wiltbank ve ark. (79) yaptıkları

çalışmada gelişim aşamasındaki ya da aktif bir CL üzerinde benzer sayıda ve affiniteye sahip reseptör olduğunu göstermiştir. Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  yarı ömrü kısa olan parakrin ya da otokrin etkili yağ esteridir. Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  metabolizmada PGFM metabolitleri ile belirlenir. Sirkülasyondaki progesteron seviyesindeki önemli düşüşten önce düşük salınımlar halinde PGFM tespit edilmeye başlanır (80). Uterus endometriyumundan salınan  $PGF_{2\alpha}$ 'nin etki şekli uterus arteri vasıtasıyla doğrudan ovarian artere ulaşarak olmaktadır. Uterus ve ovaryum arteri arasındaki ilişki öncelikli olarak koyunlarda tanımlanmıştır (81). Daha sonra ineklerde yapılan çalışmalarda intrauterin  $PGF_{2\alpha}$  infuzyonunun ovarian arterde  $PGF_{2\alpha}$ 'nin luteolizis konsantrasyonunun da artış göstermesine rağmen karotid arterde buna rastlanmaması ile bu varsayım doğrulanmıştır (82).

Gebelik şekillendiği zaman luteolitik dönem gerçekleşmez. Gebeliğin 15-17. günlerinde uzamaya başlayan konseptusun trophoctoderm hücrelerinden salınan interferon tau'nun (IFN-tau) parakrin etkisi ile endometriyumun luminal epitelyasında oksitosin ve östradiol reseptörlerinin artışı bloke edilir. Sonuç olarak uterus  $PGF_{2\alpha}$ 'nin pulsatil salınımı önlenir (83). Preimplantasyon döneminde konseptus uterus içerisinde serbest bir şekilde dolaşır ve uterus ile trafoblastik hücreler arasında direkt bir ilişki yoktur. Bu nedenle, luteolitik mekanizmayı bloke etmek için yeterli miktarda IFN-tau'nun konseptustan salınması gerekir bu da konseptusun yeterli uzaması ve gelişimine bağlıdır. Ovulasyon sonrasında progesteron konsantrasyonundaki artış embriyo gelişimi ve uzamasında önemli role sahiptir. Progesteron konsantrasyonundaki hızlı artış konseptusun uzaması ve IFN-tau üretimini destekler (84, 85). Progesteron konsantrasyonundaki artış luminal epitelyumda bulunan P4 reseptörlerini baskılayarak uterus konseptus arasındaki ilişkinin kurulmasını sağlar. Aksine, ovulasyon sonrası P4'un konsantrasyonundaki yavaş artış embriyo gelişiminin gerilemesine ve IFN-tau sekresyonunun preimplantasyon dönemi öncesinde gecikmesine neden olur (86). Tohumlama sonrasındaki 4-7. günlerdeki düşük progesteron konsantrasyonu sütçü ineklerde fertilitedeki düşüş ile karakterizedir. Küçük foliküllerin ovulasyonu ile şekillenen CL'lar az sayıda luteal hücre içerdikleri için progesteron üretimide o oranda düşük olmakta ve fertiliteye olumsuz etkisi olabildiği bildirilmektedir (63).

### **Östrus ve Ovulasyonun Senkronizasyonunda Hormonların Kullanımı**

Reprodüktif verimlilik yüksek verimli sütçü işletmelerde karlılığı etkileyen önemli bir etmendir (87). Bu nedenle kızgınlık tespitlerinin doğru bir şekilde yapılarak tohumlamalardan başarılı gebelikler elde etmek amaçlanmaktadır. Fakat yapılan çalışmalar göstermiştir ki

kızgınlık tespiti sütçü işletmelerde %50'den daha düşük oranda yapılabilmektedir (88). Ayrıca sağlık problemleri ve beslenme ile ilgili problemlerde işin içine girdiğinde östrusların tespiti daha da zor bir hale gelmektedir (89). Bu nedenlerden dolayı, östrus ve ovulasyonların senkronizasyonu östrusları belirli bir zamana toplayarak uygulanacak suni tohumlamanın etkinliğini artırarak reproduktif verimliliğe katkıda bulunacaktır. Hormonal tedaviler kullanılarak östrus siklusları çeşitli şekillerde düzenlenebilir. Doğal ve sentetik prostaglandinin geliştirilmesinden sonra senkronizasyon protokollerinin kullanımı yaygınlaşmaya başladı. Prostaglandin F<sub>2α</sub> uygulaması ile var olan luteal faz sonlandırılarak östrus indüklenebilir (90). Ancak inekler metöstrus döneminde ya da nonsiklik durumda iken PGF<sub>2α</sub>'ya çok az ya da hiç yanıt vermezler (91). ProstaglandinF<sub>2α</sub>'nın 10-14 gün aralıklarla yapılan çift doz uygulamasından sonra siklik ineklerin %90'dan fazlası ikinci uygulamaya yanıt verirken kızgınlık tespit oranı sadece %50-60'lar ile sınırlı kalır (92). Östrus siklusunun en iyi kontrol yolu foliküler ve luteal fazın bir arada senkronize edildiği yöntemdir. Foliküler dinamik GnRH uygulaması ile başarılı bir şekilde kontrol edilebilir. GnRH hipofizin ön lobuna etki ederek LH (93) ve FSH (94) salınımını başlatır. Zaman ayarlı tohumlamalarda östrus siklusunun herhangi bir aşamasındaki dominant folikülün ovule ya da atreziye olmasını ve 3-4 gün içerisinde yeni bir foliküler dalganın başlamasını sağlar (95) ve bu gelişen folikülün tohumlama anında ovulasyonunu garantilemek için kullanılır. Progestagenler, ilk izolasyon ve sentezi 1929 (96) yılında rapor edilmiş olup 1937 yılında Makepeace ve ark. (97) tavşanlarda yaptıkları çalışmalar sonucunda ovulasyon üzerine etkisi olduğu fark edilmiştir. Bu bilgilerden sonra egzogen progesteron östrus ve ovulasyonların kontrolünde kullanılmaya başlamıştır. Progestagenler senkronizasyon protokolünün içerisinde kullanıldığında luteal fazı uzatarak premature kızgınlıkları önleyebilir. Luteal yetersizlikleri gidermek amacıyla da kullanılırlar. İneklerde östrusların takibi iki temel yaklaşıma dayanır ki bunlar egzogen progesteron veya progestagen kullanılarak siklustaki luteal fazın uzatılması ya da prostaglandinlerin kullanımı ile siklusun kısaltılmasıdır (98).

Kızgınlık takibine gerek olmadan zaman ayarlı tohumla yapabilmeyi sağlayan Ovsynch protokolünün bulunması ile birlikte büyük işletmelerde sürünün reproduktif programı daha iyi bir şekilde yönetilmeye başlamıştır (99). Ovsynch protokolünde ilk uygulama GnRH enjeksiyonu ile başlayarak dominant folikülün ovule olmasına neden olur ve yeni bir foliküler dalganın başlaması sağlanır. Takiben 7. günde yapılan PGF<sub>2α</sub> ile yeni oluşturulan ya da var olan CL'un regresyonu sağlanır. Bunu takiben 48. saatte ya da 56. saatte yapılan ikinci GnRH uygulamasından 16 saat sonra suni tohumlama yapılır (99). Yapılan bir meta-analiz sonucunda östrus tespiti ya da zaman ayarlı tohumlama sonrası elde edilen



gebelik oranları arasında fark görülmemiştir (100). Senkronizasyon protokolleri ile elde edilebilecek gebelik oranını arttırmak ya da kullanılan iş gücünü azaltmak amacıyla yıllar içerisinde modifiye edilmiştir. Ovsynch protokolünde son GnRH uygulamasından 16 saat sonra yapılan suni tohumlamayı GnRH zamanına çekerek iş yükünü azaltmak amacıyla Cosynch programı geliştirilmiştir (101). Portaluppi ve Stevenson (102) yaptıkları çalışmada 72. saatte GnRH ile ST'nin aynı zamanda uygulandığında gebelik oranında artmanın yanı sıra gebelik kaybında azalma olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte Ovsynch ve Cosynch protokolünde benzer gebelik oranları bulunurken (103), bazı çalışmalarda ise Cosynch programında fertilitenin düşük olduğu gösterilmiştir (104). Ovsynch protokolünde ilk GnRH ve PGF<sub>2α</sub> enjeksiyonu arasındaki sürenin kısaltılması ile folikülün dominantlık süresi kısaltılarak daha iyi fertilite elde edilebileceği belirtilmiştir (105, 106). Santos ve ark. (106) yaptığı çalışma da iki hormonal uygulama arasındaki süre 7 günden 5 güne düşürülmüş ve çift doz PGF<sub>2α</sub> enjeksiyonu yapılarak yeni oluşan CL'un lize olması kontrol altına alınmıştır. Bu çalışma ile daha yüksek gebelik oranı elde ettiklerini belirtmişlerdir (106). Başka bir çalışmada ise bu süre 6 gün olarak tutulmuş ikinci GnRH'a daha yüksek yanıt alınmasına rağmen gebelik oranı normal Ovsynch programından biraz daha düşük bulunmuştur (107).

Senkronizasyon protokolünün siklusun hangi döneminde başladığı ovaryumların hormonal tedaviye vereceği yanıtı, ovulasyonun senkronizasyonunu ve elde edilecek gebelik oranını etkilediği bilinmektedir (108). Östrus siklusunun 5-9. günleri arasında Ovsynch protokolüne başlamak programın başarısını arttırmaktadır. Siklusun 10. gününden sonra başlatılan Ovsynch programında çoğunlukla PGF<sub>2α</sub> enjeksiyonundan önce CL'un spontan regresyonu görülüyor bu da fertilitede düşüşe neden oluyor (92). Östrus siklusunun 1-4. günlerinde başlatılan senkronizasyon protokolünde ise dominant folikülün ovulasyonu ve takiben şekillenecek yeni foliküler dalganın kontrolü başarılı olmayarak yine fertiliteyi olumsuz etkiliyor. İlk GnRH'a alınacak yanıtın yüksek olmasının senkronizasyonun etkinliğini arttırdığı bilinmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak Ovsynch öncesi hormonal uygulamalar ile siklus zamanı düzenlenerek ilk GnRH'a alınacak yanıt artırılarak yeni foliküler dalganın indüklenmesi amaçlanmıştır. Ovsynch öncesinde 14 ya da 12 gün ara ile yapılan PGF<sub>2α</sub> (Presynch-Ovsynch) enjeksiyonunun protokolün etkinliğini arttırarak daha yüksek gebelik oranı elde edildiği bildirilmiştir (109). Fertilitedeki artışın zaman ayarlı tohumlama uygulamasından önce siklik ineklerde CL'a sahip olma oranındaki artıştan olduğu düşünülmektedir. Ayrıca siklusun her hangi bir döneminde Ovsynch programına alınan inekler %53 oranında ilk GnRH'a yanıt verirken Presynch'te bu oran %70'lere çıkmaktadır (110). Yine bu çalışmada PGF<sub>2α</sub> ile yapılan presenkronizasyon sonrası Ovsynch protokolüne

alınan ineklerin daha yüksek progesteron konsantrasyonuna (%72'e karşın %59) sahip olduğu ve bunun da gebelik üzerine (%46,8'e karşın 37,5) olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (110). Ovsynch öncesinde 14 gün ara ile yapılan çift doz PGF<sub>2α</sub> enjeksiyonu gebelik oranını arttırmasına rağmen bu aralık yeteri kadar uygun bulunmadığı ve Ovsynch'deki ilk GnRH'a yanıt düşük olduğu için bu programda değişiklik yapılmıştır (92, 111). Sonuçta çift doz PGF<sub>2α</sub> enjeksiyonu arasındaki sürenin 11 güne düşürülmesi ile ilk GnRH'ya alınan yanıt artmış ve gebelik oranı olumlu olarak etkilenmiştir (111). Gümen ve ark. (112) 11 gün ara ile yaptıkları PGF<sub>2α</sub> uygulaması sonucu ilk GnRH'a alınan yanıtı Presynch (Presynch: %83,1, Ovsynch: %62,7) grubunda daha yüksek bulmuşlardır ki bu da Ovsynch'in etkinliğini arttırarak gebelik oranını yükseltmiştir.

Postpartum gönüllü bekleme süresinin sonuna doğru PGF<sub>2α</sub> ile başlatılan presenkronizasyon programının Ovsynch'e başlama zamanını siklusun ortalarına getirmesinin olumlu etkisinin yanı sıra uterus konsantrasyonlarını arttırarak uterus ortamının temizlenmesine yardımcı olur. Fakat bu program nonsiklik hayvanlarda yeteri kadar etkili olamamaktadır. Ayrıca PGF<sub>2α</sub> enjeksiyonları sonrasında kızgınlık gösteren hayvanların tohumlanabileceğini böylece zaman ayarlı tohumlama için daha uzun süre beklemeye ve hormon kullanımına gerek kalmayacağı düşünülmektedir. Bu şekilde elde edilecek gebelik oranını karşılaştıran bazı çalışmalar kızgınlık gösteren ineklerin tohumlanması ile daha düşük gebelik elde edildiğini bulurken (112) bazıları benzer sonuçlar bulmuştur (92). Presynch-Ovsynch (Ovsynch öncesi 14 gün ara ile PGF<sub>2α</sub> uygulaması) programının nonsiklik ineklerdeki yetersizliği düşünülerek Double-Ovsynch (arka arkaya iki defa Ovsynch uygulaması) programı geliştirilmiştir (113). Double-Ovsynch programı Presynch-Ovsynch ile karşılaştırıldığında sadece primiparus ineklerde (%65,2'e karşın %45,2) gebelik oranını arttırırken multiparoslarda (% 37,5'e karşın %39,3) benzer sonuçlar elde edilmiştir.

İntravaginal progesteron uygulaması, ovulasyonların senkronize edilebilme etkinliğini arttırarak ve düşük progesteron düzeyine sahip ineklerdeki açığı kapatmaya yardım ederek zaman ayarlı tohumlamalarda gebelik oranları üzerine olumlu etki gösterir (114, 115). Ayrıca intravaginal aygıttan salınan progesteron varlığında LH pikleri baskılanır bu da Ovsynch programında PGF<sub>2α</sub> uygulaması öncesinde görülebilecek erken kızgınlıkların oranını azaltır (116). Presynch uygulaması ile intravaginal progesteron uygulamasını kombine eden bazı çalışmalarda gebelik üzerine olumlu bir etki saptanamamıştır (110, 117). Bununla birlikte Ovsynch programı içerisinde intravaginal progesteron aygıtı kullanımını gebelik üzerine olumlu etki ettiği yapılan bazı çalışmalarda belirtilmiştir (118, 119).

## **Sütçü İneklerde Steroid Hormon Mekanizması**

Uzun yıllar boyunca daha verimli inekler elde etmek amacıyla yapılan ıslah çalışmaları sonucunda yüksek süt verimli ırklar elde edilmiştir (120). Bununla birlikte üreme performansı ve etkinliğinde önemli bir düşüş görülmüştür (121). Butler (122) artan süt verimi ve reproduktif verimlilik arasındaki ilişkiyi 1951 ve 1996 yılları arasında New York'daki Holstein sütçü işletmelerden elde ettikleri veriler ile şu şekilde göstermiştir. İlk servis gebe kalma oranı 1951'de %65 iken 1996'da %40'lara gerilerken süt verimide 4500 kg/yıl'dan 9000 kg/yıl'a yükselmiştir. Holstein sütçü inekleri ile ilgili diğer bir derlemede de açık gün süresinde ve gebelik başına düşen tohumlama miktarında artış olduğu belirtilmiştir. Ayrıca östrus tespitinde %50,9'lardan %41,5'lere bir gerileme olduğu tespit edilmiştir (123). Sonuç olarak reproduktif performanstaki gerileme ve artan süt verimi arasında negatif bir ilişki olduğu teorisi geliştirilmiştir (121, 124). Diğer çalışmalarda da yüksek verimli hayvanlardaki reproduktif değişimlerin sebebinin yem tüketimi ve buna bağlı olarak karaciğere giden kan akım hızındaki artıştan dolayı steroid hormon metabolizmasındaki dramatik artışın sorumlu olabileceği belirtilmiştir (125, 126). Lopez ve ark. (127) yaptığı çalışma da sütçü ineklerde süt verimi, östrus süresi ve reproduktif parametreler arasında korelasyon olduğunu göstermiştir. Yüksek verimli ineklerde östrus süresinin düşük verimlilere göre 4,7 saat daha kısa olduğunu ayrıca östrus zamanındaki östradiol konsantrasyonunun da yüksek verimli ineklerde 1,8 pg/ml daha düşük olduğunu bildirmiştir. Ayrıca yüksek verimli ineklerdeki dominant folikül çapının düşük verimlilerden daha yüksek olduğu ( 18,6 ve 17,4 mm, sırasıyla) tespit edilmiştir. Düşük östradiol konsantrasyonunun östrusun başlama süresinin uzamasına neden olarak foliküler çapta artışa neden olduğu düşünülmüştür (127). Bu gecikmeden dolayı da GnRH ve LH'nin ovulasyon artışının geciktiği ve büyük dominant folikülden yaşlı oositin ovule olması sonucunda fertilitenin olumsuz etkilendiği düşünülmektedir (126). Artan süt verimini desteklemek amacıyla artan kuru madde alımı karaciğerden geçen kan akım hızında artışa neden olarak östradiol ve progesteron gibi steroid hormonların hızlı metabolize olmasına neden olduğu bilinmektedir (125). Reproduktif steroid hormonların metabolizasyonundaki bu artış reproduktif verimliliğe olumsuz etki ediyor. Sonuç olarak gebelik oranında azalma, gebelik kayıplarının artışı, çoklu (ikizlik) ovulasyonların artışı ve östrus belirtilerindeki azalma sütçü işletmelerin problemi haline gelmektedir (126). Tüm bunlar düşünüldüğünde neden sütçü işletmelerde östrus ve ovulasyonların senkronizasyonuna ihtiyaç duyduğumuz sorusunu yanıtlayabiliriz.

## **Spermanın Cinsiyete Göre Ayrılması**

Cinsiyeti belirlenmiş sperma teknolojisi 1980'li yıllarda keşfedilmiş ve XY şirketi tarafından 1990'larda geliştirilmiştir (128). Cinsiyeti belirlenmiş sperma teknolojisinde amaç dişi (X sperma) ve erkek (Y sperma) spermaların içerdiği DNA miktarındaki farklılıktan (~%4 farklılık) yararlanarak ayrılması ve suni tohumlama için uygun payetler halinde kullanıma hazırlanmasıdır (9, 129). Cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanım amaçlarından en önemlileri; genetik özelliği yüksek ve az sayıdaki ineklerden sütçü düvelerin elde edilmesi, sütçü inekler ile sütçü ya da etçi boğalar arasında melezleme yapma şansının ve kısa sürede sürüdeki dişi hayvan popülasyonunun artması, sürüden çıkarılacak hayvanların yerine yenilerinin getirilmesi ve projeni testini hızlandırarak maliyetinin de düşürülmesidir (11, 129-131). Bunların yanı sıra büyük sütçü işletmelerde erkek buzağının işletme için ekonomik kayıp olması cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımını teşvik etmektedir. Günümüzde en yaygın ve güvenilir olarak kullanılan sperma ayırma tekniği flow-sitometrik yöntem ile yaklaşık %90 oranında spermanın cinsiyete göre ayrımı yapılabilmektedir (3, 132). Bu yöntem esnasında kullanılan Hoechst 33342 boyasının sperma üzerinde genotoksik bir etkisi olmadığı (133, 134) ayrıca elde edilen yavruların doğum ağırlığı, ölüm oranı ya da kilo kazanımları arasında bir farklılık olmadığı saptanmamıştır (10).

## **Sperma Cinsiyetinin Belirlenmesinin Tarihçesi**

İlk cinsiyet kromozomu tayini Guyer ve ark. (1) tarafından 1910 yılında mikroskopik olarak yapılmıştır. Birçok araştırmacı bu gözlemden yola çıkarak sperma cinsiyeti belirlemek amacıyla 1960'li yıllardan beri, X ve Y spermaları arasındaki kütle ve hareketlilik farkını da temel alarak; içerdiği albumin derecesine göre ayırma (5), seks spesifik antikor kullanımı (4), yüzey değişkenliği (6), hacimsel farklılık (7) gibi çeşitli yöntemler geliştirmiştir. Sperma ayırma yönteminde X spermasının baş, boyun ve kuyruk yapısındaki morfolojik farktan ve kütleli olarak daha fazla DNA içermesinden (135, 136) dolayı bu özellikleri temel alınarak en güvenilir sperma ayırma yöntemi olan flow-sitometrik yöntem geliştirilmiştir. Son yıllarda bu teknik birçok sperma firması tarafından kesinlik derecesi en yüksek ve en güvenilir fertil sperma ayırma yöntemi olarak kullanılmaktadır. Bu teknik ile ilk cinsiyet tayini yapılmış yavru elde edilmesi tavşanda cerrahi yöntem ile oviductal tohumlama yapılarak olmuştur (137). Daha sonraki çalışmalar domuzlarda (138), ineklerde (139), atlarda (140) ve insanlarda (141) yapılmıştır.

## **Flow-sitometrik Yöntem**

Bu işlemde birinci basamakta sperma çok düşük miktara kadar sulandırılır ve genotoksik etkisi olmayan geçici özel bir boya olan Hoechst 33342 (40-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nükleik asidin adenin-tiamin bölgesine bağlanarak DNA'nın boyanmasını sağlar. Flow-sitometri makinesinden 40 mph basınç ve 60 Km/s hız kullanılarak geçirilen numunelere lazer ışın profili gönderilerek absorbe ettikleri ışın miktarına göre ayrılır. X sperması daha fazla DNA içermesinden dolayı floresan boyayı daha fazla absorbe etmektedir ve bu nedenle daha fazla ışını absorbe eder (8,142). Emilen ışının miktarına göre ışın miktarını ölçen alet hücreleri X, Y ya da tanımlanamayan ölü spermalar olarak ayırır (8). Bu teknolojiye ayırma işleminde kullanılan hıza göre, hız arttıkça güvenilirlik azalmakta, semeni %90 oranında X ve Y olarak ayırmaktadır (128). Fakat uygun bir şekilde ayırmak için, sperma laser ve floresan belirleyiciden düzgün bir şekilde geçmelidir. Boğa spermasının baş kısmının düz şekilde olmasından dolayı, ancak yaklaşık olarak %60-70 oranında sperma flow-sitometri makinesinden düzgün bir şekilde girer. Ayrıca normal semen % 48-49 oranında dişi sperma içermektedir. Bu yüzden makineye giren spermaların yalnızca %15'i cinsiyeti belirlenmiş ürün olarak makineden çıkar (143). Bu yöntem ile spermanın ayrılması işleminin güvenilirliği %90 oranında arzu edilen cinsiyete göre olmasına rağmen ayırma işleminin oldukça yavaş bir işlem olması ve elde edilen miktarın az olması nedeniyle cinsiyeti belirlenmiş sperma ( $2 \times 10^6$  milyon) payetleri normal payetlere ( $10-20 \times 10^6$  milyon) oranla daha az sperma içermektedir (144).

## **Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile Tohumlama Sonrası Elde Edilen Gebelik Oranları**

Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan birçok çalışma sonucu gösteriyor ki sütçü ineklerde gebelik oranı normal spermaya göre %20-30 daha düşük iken düvelerde bu oran %10-20 civarındadır. (12, 145, 146). DeJarnette ve ark. (12) Amerika Birleşik Devletlerin'de düvelerdeki cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanım kayıtlarına dayanarak gebelik oranının normal spermaya göre düşük olduğunu yaptıkları derlemede göstermişlerdir. Bu derlemede, cinsiyeti belirlenmiş spermada gebelik oranı (%27 ile %70 arasında) ortalama %45 iken normal spermada bu oran (%34 ile %83 arasında) %56 bulunmuştur. Gebelik oranının düşük

bulunmasının payetlerin düşük dozda sperma içermesinden ve ayırma sürecinde kullanılan boyanın (H33324), basıncın (40-60 mph) ya da lazer ışını vb. etmenlerin sperma kalitesini etkilemesinden meydana geldiği düşünülmektedir (147, 148). Maliyetinin yüksek ve elde edilen gebelik oranının düşük olmasına rağmen sürüdeki düve popülasyonunda artış sağlayarak sürünün genetik ilerlemesine yaklaşık olarak ilerlemede %15'lik bir katkıda bulunması nedeniyle flow-sitometrik yöntemle elde edilen cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı dişi buzağı elde etme konusunda en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir (144, 149). Düvelerin laktasyondaki ineklerden daha yüksek gebelik oranına sahip olması nedeniyle cinsiyeti belirlenmiş sperma'nin düvelerdeki kullanımı sütçü inekler ile karşılaştırıldığında daha yaygındır (145, 150). Cinsiyeti belirlenmiş spermanın kullanımı özellikle doğal kızgınlıklar sonrasında tavsiye edilmektedir (151). Ayırma işlemindeki olumsuzluklar düşünüldüğünde gebelik oranını arttırmak için muhtemel ovulasyonun olacağı kornu uteriye spermanın bırakılması (152), payetler içerisindeki cinsiyeti belirlenmiş sperma sayısının artırılması (147, 153), zaman ayarlı suni tohumlama tekniği (154), çalışmaları yapılmıştır. İneklerdeki gebelik oranını arttırmak amacıyla özellikle ilk laktasyonda, uterus problemi bulunmayan, ovaryumlarında siklik aktivite gözlenen, postpartum yaklaşık 84-98. günlerinde olan ineklerin tercih edilmesinin daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (147). Andersson ve ark. (152) yaptığı bir çalışmada kızgınlık takibi ile belirlenmiş 306 ineğin 157'si cinsiyeti belirlenmiş sperma ile 149'u ise normal semen ile doğal kızgınlıkta muhtemel ovulasyonun olacağı kornu uteriye spermanın bırakılması yöntemi ile tohumlanmıştır. Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile tohumlamalarda ortalama gebelik ve buzağılama oranı %21 ve %20 iken normal spermada bu oran %46 ve %45 olarak tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra elde edilen dişi yavru oranları ise cinsiyeti belirlenmiş sperma da %82 normal semen de ise %49 bulunmuştur. Holştan düvelerde cinsiyeti belirlenmiş sperma ve normal semen kullanılarak yapılan çalışmalar göstermiştir ki suni tohumlama yerinin (utero-tubal bağlantı noktasının yakınına, kornu uterinin ortasına ya da korpus uteri içerisine) gebelik oranı üzerine olumlu bir etkisi bulunmamaktadır (155). Benzer bir çalışmada Seidel ve Schenk (146) bilateral kornu uteri ortası ve korpus uteri tohumlamalarını karşılaştırmış olumlu bir etki saptamazken çok düşük doz sperma ( $1 \times 10^6$  sperma) kullanımının da negatif etkisini görmüşlerdir. Aynı çalışmada düveler östrus belirtisi gösterdikten 12-24 saat sonra farklı dozlarda sperma kullanılarak tohumlanmış ( $1-6 \times 10^6$  sperma/doz) fakat gebelik oranında artış saptanmamıştır (32). Bodmer ve ark. (40) cinsiyeti belirlenmiş sperma ve normal semen payetlerinde düşük doz semen kullanarak ( $2 \times 10^6$  milyon) yaptıkları çalışma sonuçlarında kızgınlık takibi ile tohumlanan inek (CBS: % 27,6 ve NS: %28,1) ve düveler (CBS: % 33,3 ve

NS: %59,3) arasındaki gebelik oranlarında önemli bir farklılık bulamamıştır. DeJarnette ve ark. (147) düve ve ineklerde yaptığı çalışmada farklı dozlarda ve farklı boğalardan elde ettikleri CBS kullanmış, düvelerde ve ineklerde gebelik oranı kullanılan spermanın dozundan etkilenmezken, düvelerdeki gebelik oranının boğaların farklı (A boğası: %46,4 ( $2,1 \times 10^6$ ), %52,2 ( $3,5 \times 10^6$ ), %59,5 ( $5,0 \times 10^6$ )) olmasından etkilendiği tespit edilmiştir. Boğalara bakılmaksızın düveler ve ineklerdeki gebelik oranlarına bakıldığında ise  $2,1 \times 10^6$ ,  $3,5 \times 10^6$ ,  $5,0 \times 10^6$  dozlar için oranlar sırasıyla düvelerde % 46,7, %51,2 ve %52,5, ineklerde % 27, %29,1, %30,3 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar göstermiştir ki boğa seçimi cinsiyeti belirlenmiş sperma teknolojisinde önemli bir ayrıntıdır. Frijters ve ark. (156) yaptıkları çalışmada  $2,1 \times 10^6$  CBS,  $2,1 \times 10^6$  NS ve  $15 \times 10^6$  NS karşılaştırmış ve gebelik oranları arasında önemli bir fark bulamamışlardır. Sperma dozu ile ilgili yapılan bütün çalışma sonuçları göstermiştir ki payetler içerisindeki sperma miktarının artırılmasının gebelik oranı üzerine etkisi bulunmamaktadır (156, 157). Schenk ve ark. (153) yaptığı çalışmada postpartum 40-58. günlerdeki inekler daha önce tohumlama yapıp yapılmadığı, güç doğum yapıp yapmadığı, genital kanala ilişkin herhangi bir probleminin olup olmadığı yönünden incelenerek Presynch-14 gün senkranizasyon protokolüne alınmışlardır. Bu çalışmadaki gebelik oranları normal sperma için %55,6 iken cinsiyeti belirlenmiş sperma için de %40,5 bulunmuştur (158). Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile elde edilen gebelik oranlarının düşük olmasına rağmen (147, 152) zaman ayarlı tohumlama tekniği ile özellikle ovulasyona yakın zamanda yapılacak olan tohumlamalardan daha iyi gebelik oranları elde edilmiştir (153, 154). Sa Filho ve ark. (157)'nin düvelerde cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı ile ilgili yaptığı çalışmada 4 farklı deneysel çalışma yer almaktadır. Elde edilen sonuçlar CBS ile tohumlama anında gonodotropin hormon kullanımının ya da çift doz payet kullanımının gebelik üzerine bir etkisi olmadığını gösterirken ovulasyona yakın zamanda yapılan tohumlamalardan daha iyi sonuçlar alındığını göstermiştir. Jersey ırkı düvelerde zaman ayarlı tohumlamanın kullanıldığı bir çalışmada ise progesteron kaynağının çıkarılmasından yaklaşık 54-60 saat sonra CBS ile yapılan tohumlamaların (%31,4; 32/102) 54. saatte yapılanlardan (%16,2; 17/105) daha iyi gebelik elde edilmesine rağmen NS' da böyle bir sonuç görülmemiştir (154). Sales ve ark.(154) *B. indicus* ırkı ineklerde de ovulasyona yakın zamanda CBS ile yapılan tohumlamalardan daha iyi gebelik sonuçları elde edildiğini bildirmişlerdir. Postpartum 84-98. günlerde cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan tohumlamalarda gebelik oranı <84 günden düşük olanlardan %7,9 daha iyidir ve 3.-4. laktasyondaki ineklerde gebelik oranı 1.-2. laktasyondakilerden %6 daha düşük saptanmıştır (147). Ayrıca bu ve benzeri çalışmalar gebelik oranının düşük olmasının sadece ayırma işlemi sırasında sperma kalitesinin

etkilenmesi (143, 158) ve payetlerin daha az miktarda sperma içermesine (159) bağlı olmadığını göstermektedir. Sütçü ineklerde fertilité doğum sayısı, sıcaklık stresi, süt verimi ve servis sayısı gibi birçok faktörden etkilenmektedir (158, 160). Bunun yanı sıra sürünün bakım ve besleme koşulları, tohumlama yapan kişilerin konu hakkında tecrübeli olması da özellikle cinsiyeti belirlenmiş sperma ile elde edilecek gebelik oranını etkileyen faktörler arasındadır (151,161). Embriyonik kayıp oranlarına bakıldığında Seidel ve Garner (128) gebelik kaybının cinsiyeti belirlenmiş spermada %1-2 oranında normal spermaya göre daha yüksek olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan diğer çalışmalarda görülen embriyonik kayıplar düvelerde %8,8 ile 23 arasında iken (151, 162) ineklerde %17,2 olarak gösterilmiştir (151).

Tumban ve ark. (10) yaptığı çalışmada cinsiyeti belirlenmiş sperma ya da normal spermadan doğan buzağular arasında doğum ağırlığı, buzağının dayanıklılığı, kilo kazanımı ve ölüm oranları arasında fark bulunmazken başka bir çalışma sonucu gösteriyor ki gebelik süresi, abort oranı açısından da bir fark bulunmamaktadır. Ayrıca dişi buzağuların erkeklerden yaklaşık 2 kg daha düşük doğum ağırlığına sahip olmasından dolayı güç doğum oranı daha düşük görülmekte ve bu da ilk doğumunu yapacak olan düvelerde güç doğum oranını düşürmektedir (10, 147).

Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan birçok çalışma sonucunda gebelik oranının normal semene göre düşük olmasına rağmen kullanılan teknolojinin geliştirilmesi, zaman ayarlı senkronizasyon protokollerinin kullanımı, kaliteli boğa seçimi ve sürünün bakım beslemesinin gebelik oranı üzerine olumlu yönde etkileri olduğu görülmüştür. Cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı sürülerdeki genetik ilerlemeye olumlu etki etmesinin yanı sıra kaliteli damızlık düve sıkıntısında azaltabilir. Bu çalışmada, ineklerde senkronizasyon uygulaması sonrasında CBS'nin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmaların sınırlı olmasından dolayı, senkronizasyon protokollerinin uygulandığı sütçü ineklerde CBS ve NS ile yapılan tohumlamalar sonrası elde edilecek gebelik oranlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.



## GEREÇ ve YÖNTEM

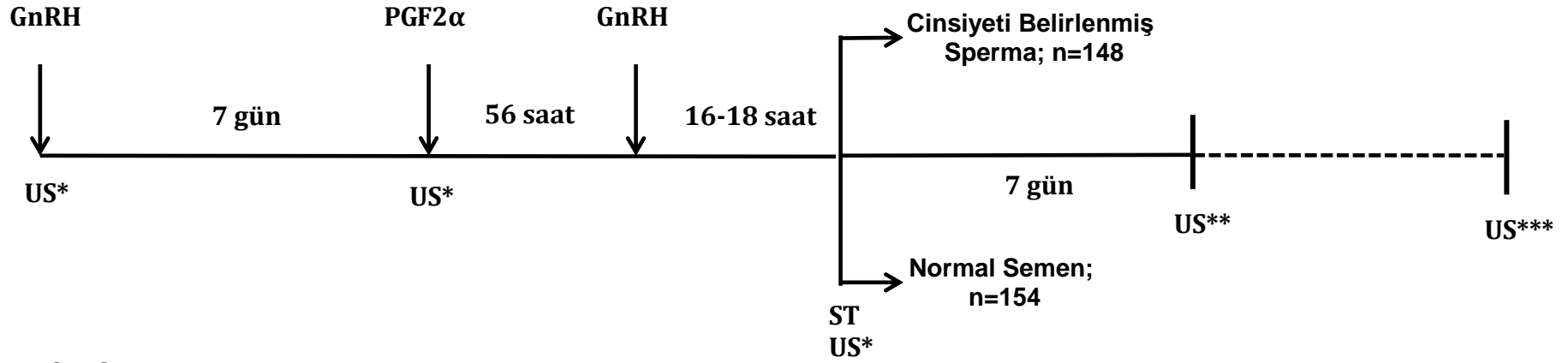
### Çalışmadaki Süt İnekleri, Bakımı, Beslemesi ve Çevresel Şartlar

Uludağ Üniversitesi Etik Kurul'unun 23.02.2010 tarihli toplantısı ve 2010-02/04 no'lu kararı ile etik açıdan uygun olduğu belirlenen bu çalışma Bursa'da yaklaşık 1000 başlık süt sığırı olan bir işletmede yapıldı. Çalışmada sağlık durumu iyi olan endometritis, metritis, mastitis, ayak problemi v.b. problemleri olmayan inekler kullanıldı. Çalışmada postpartum herhangi bir günde olan 302 Holştayn ırkı sütçü inek kullanıldı ve inekler süt verimlerine göre sınıflandırılmış yataklıklı, serbest dolaşım alanı olan ve yemleme alanında başkilidi olan bölmelerde bakılmaktaydı. Bölmeler hava sıcaklığının arttığı aylarda aktive olan pervane ve sulama sistemine sahipti. İşletmedeki inekler 8 saat aralıklarla günde 3 defa sağılmakla birlikte National Research Council (NRC)'nin (163) tavsiye ettiği rasyon ile günde 3 defa beslendi. Çalışmanın yapıldığı dönemde Haziran-Ağustos ayları sıcak dönem, Mart-Mayıs ve Eylül-Kasım ayları serin dönem olarak adlandırıldı. Çalışmanın yapıldığı zaman aralığındaki günlük sıcaklık ve nem değerleri Türk Meteoroloji Servisinden alınan bilgilere göre gözlemlendi. Günlük ortalama sıcaklık ve nem yüzdeleri sıcak dönemde  $25,1 \pm 3,8$  °C ile %66,6 serin dönemde ise  $16,0 \pm 2,7$  °C ile %72,4 olarak bulundu. Günlük süt verimleri ile daha önceki reproduktif, sağlık ve bakım bilgileri her hayvan için ALPRO 2000 software (DeLaval, Tumba, İsveç) programından alınarak kaydedildi. Sürünün 305 günlük ortalama süt üretimi 9880 kg/inek olarak saptandı. İstatistiki analiz için her bir ineğin süt verim kayıtları suni tohumlamadan 7 gün öncesi ve 7 gün sonrası olarak kaydedildi. Çalışmaya alınan her inek için vücut kondüsyon skoru (VKS) 0,25'lik artışlar içeren 1-5 arası skalada 1'in çok zayıf olduğu 5'in ise obez inek olarak tanımlandığı sistemle belirlendi (164).

### Senkronizasyon Protokolü

Çalışma grubunda uygulanan Ovsynch senkronizasyon (99) protokolüne (0. gün GnRH, 7. gün PGF2 $\alpha$ , 8. gün GnRH, 56. saatte zaman ayarlı tohumlama) bir korpus luteumu ve ovaryumlarında en az bir tane 10 mm ya da daha büyük folikülü olan inekler (n:302) alındı. Çalışmadaki her bir inek için protokolda yer alan hormon ve dozları, 10  $\mu$ g buserelin asetat kas içi (Receptal<sup>®</sup>, Intervet, İstanbul, Türkiye) ve 500  $\mu$ g kloprostenol sodyum kas içi (Estrumate<sup>®</sup>, CEVA-DIF, İstanbul, Türkiye) olarak kullanıldı. Hormonal uygulamalarda ikinci GnRH çiftlik veteriner hekimleri tarafından yapılırken diğer uygulamaların tamamı

tarafımızdan yapılmıştır. Hormonal uygulamaların tamamı,  $PGF_{2\alpha}$  sonrasındaki ikinci GnRH hariç, sabah uygulandı ve tohumlama ikinci GnRH'dan 16-18 saat sonra yapıldı. Çalışmanın ayrıntılı şeması Şekil 1'de gösterilmiştir.



ST: Suni Tohumlama

US: Ultrasonografik Muayene

\*Ovaryumların ultrasonografik muayenesi

\*\*Ovulasyon muayenesi

\*\*\*Gebelik muayenesi 31 ve 62. günlerde

**Sekil-1.** Çalışma grubundaki ineklerde kullanılan Ovsynch senkronizasyon protoklünün ve yapılan uygulamaların şeması.

## Ultrasonografik Muayeneler ve Tohumlamalar

Ultrasonografik muayenelerin tamamı 7,5 MHz'lik linear problu Honda HS 2000 ultrasonu kullanılarak yapıldı (Honda®, Vega Grup, İzmir, Türkiye). Çalışmada Ovsynch protokolünde ilk GnRH uygulaması öncesi (ineklerin siklik olup olmadığının belirlenmesi ve var ise en büyük folikülün çapının ölçülmesi), 7. günde PGF<sub>2α</sub> uygulamasından önce (ilk GnRH sonrasında ovulasyon olup olmadığına bakılması ve CL sayısının belirlenmesi) ve tohumlama zamanında (en büyük folikül çapının belirlenmesi amacıyla) ultrasonografik muayeneler yapıldı. Tohumlamalar sonrası ovulasyon kontrolü amacıyla yapılan muayenede ise daha önce var olan büyük folikül yerine korpus luteumun gözlenmesi sonucu ovulasyonun şekillendiğine karar verildi.

Çalışmada suni tohumlama öncesinde yapılan ultrasonografik muayene sonucunda ovaryum üzerinde 12-18 mm çapında folikülü ve yapılan çara çekme işlemi sonrasında temiz akıntısı olan inekler rastgele bir şekilde dondurulmuş-çözülmüş ticari tohumlama payetinin kullanıldığı cinsiyeti belirenmiş sperma (n=148) ya da normal semen (n=154) ile tohumlandı. Tohumlamalar da aynı boğaya (Alta Sylvester, 011HO06440, 0,25 ml/payet, Anadolu Hayvancılık, İstanbul, Türkiye) ait cinsiyeti belirlenmiş sperma ve normal semen payetleri kullanıldı. Çalışmadaki her inek tahmini ovulasyonun olacağı üzerinde büyük folikülün bulunduğu ovaryum tarafında ki kornu uteriye spermanın bırakılması yöntemi ile tohumlandı.

Çalışmada kullanılan cinsiyeti belirlenmiş sperma payetleri morfolojik olarak  $2,2 \times 10^6$  ve motilitesi  $1,9 \times 10^6$  olan sperma içermekte iken normal semen payetinde morfolojik olarak normal  $12 \times 10^6$  ve  $9 \times 10^6$  motil spermaya yer almaktaydı. Senkronizasyon protokolünde, tohumlama zamanında yapılan ultrasonografik muayenede ovaryumlarında 10 mm'den büyük folikül saptanamayan ineklerin erken ovulasyon yaptığı, tohumlamadan sonraki 7. gün ovulasyon muayenesinde de ovaryumlar üzerinde korpus luteumun saptanamaması senkronizasyonda başarısızlık olarak tanımlandı. Gebelik muayeneleri tohumlamadan sonraki 31. ve 62. günlerde iki defa transrektal ultrasonografik yöntem ile yapıldı. Gebe bulunan inek sayısının tohumlanan inek sayısına bölünmesi ile 31. günde ki gebelikler tespit edildi. Ultrasonografik muayene 62. günde tekrarlandı ve gebe bulunan hayvan sayısının tohumlanan hayvan sayısına bölünmesi ile 62. gündeki gebelik oranı tespit edildi. Embriyonik ölüm oranı ise 31 ve 62. günler arasında gebelik kaybı olan inek sayısının 31. günde gebe olan inek sayısına bölünmesi ile belirlendi.

## **İstatistiki Analizler**

Tüm istatistiki analizler SAS 9.3 (SAS/STAT 9.3, Cary NC, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. İkili değerler SAS'ın GLIMMIX lojistik regresyon modeli kullanılarak analiz edildi. Çalışmada kullanılan sperma (cinsiyeti belirlenmiş spermaya karşın normal semen), doğum sayısı (ilkine doğurana karşın çok doğum yapmış inekler),  $<2,75$  veya  $\geq 2,75$  e göre kategorize edilmiş VKS, süt verimi, postpartum gün sayısı, tohumlama sayısı (1 ya da  $>1$ ), mevsimin etkisi (sıcak ya da serin dönem) gibi değişkenler istatistiki modele eklenerek çalışma grupları ile kovaryant fktrler aralarındaki interaksiyonlara bakıldı.

Sürekli veriler Gaussian dağılımına göre düzenlenmiş SAS'ın GLIMMIX modelindeki ANOVA ile analiz edildi. Laktasyon sayısı ve tohumlama sayısı gibi sayısal değerler log değişimi ile Poisson dağılımında analiz edildi.

İstatistiki olarak  $p \leq 0,05$  olduğunda anlamlı olarak düşünülürken  $0,10 \leq p < 0,05$  arasında eğilimli olduğu düşünüldü.

## BULGULAR

### Genel Sonuçlar

Çalışma grubuna alınan ineklerde CBS ya da NS grupları arasında laktasyon sayısı, tohumlama sayıları, sağılan gün sayısı, VKS ve tohumlama haftasındaki süt üretimi gibi faktörler açısından fark saptanamadı (Tablo 1).

**Tablo-1.** Cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) ve normal semen (NS) grupları arasındaki genel parameterlerin karşılaştırılması.

	<b>CBS</b>	<b>NS</b>	<b>P</b>
Sağılan gün sayısı	145,7 ± 4,1	143,3 ± 3,9	0,67
VKS	2,68 ± 0,02	2,72 ± 0,02	0,18
Laktasyon sayısı	2,15 ± 0,10	2,20 ± 0,09	0,72
Tohumlama sayısı	1,02 ± 0,06	1,09 ± 0,06	0,42
Süt verimi (kg/gün)	36,3 ± 0,5	35,8 ± 0,5	0,52
Folikül çapı (mm) @ ST	14,92 ± 0,15	14,89 ± 0,14	0,89

### Senkronizasyon Protokolüne Alınan Yanıtlar

Senkronizasyon protokolüne alınan yanıtlarda ilk GnRH sonrası ovulasyon oranı (CBS: %70,2; NS: %74,7; P=0,38) farklı bulunmadı. Doğum sayısına bakıldığında da tek doğum yapmış inekler (primiparus; %73,9) ve birden fazla doğum yapmış inekler (multiparuslar; %70,7) arasında ilk GnRH'a alınan yanıtta fark saptanamadı (P=0,56). Suni tohumlama günü ovulasyon öncesi saptanan büyük folikül ortalama çapı CBS'de 14,92 ± 0,15 mm ve NS'de 14,89±0,14 mm idi ve fark saptanamadı (P=0,89). Folikül çapı üzerine

mevsimin etkisi olduğu saptandı ve serin dönemdeki ovulatör folikül çapının (15,11±0,12) sıcak dönemdekinden (14,7±0,17) daha büyük olduğu bulundu (P=0,05). Doğum sayısının ise folikül çapına bir etkisi olmadığı tespit edildi (P=0,95). Son olarak da, ikinci GnRH sonrası şekillenen ovulasyon oranları (tohumlamadan 7 gün sonra ultrasonografi ile yeni CL belirlenmesi) arasında fark (CBS: %96,6; NS: %97,4; P= 0,69) gözlenmedi.

### **Gebelik ve Embriyonik Ölüm Oranları**

Çalışmada cinsiyeti belirlenmiş sperma ile tohumlanan ineklerde saptanan 31. gün gebelik oranı normal semenle karşılaştırıldığında azalmaya eğilimli (P=0,09) bulundu. Gruplar arasında 62. gün gebelik muayeneleri arasında fark önemli bulundu (P=0,01) çünkü CBS grubundaki ebriyonik ölüm oranı NS'den daha fazla (P=0,02) saptandı (Tablo-2). Semen tipine ek olarak 31 ve 62. günlerde gebelik oranları üzerine doğum sayısı (P<0,003) ve mevsimin de (P<0,001) etki ettiği belirlendi. Tek doğum yapmış ineklerde saptanan gebelik oranı 31. gün (P<0,01) ve 62. günlerde (P=0,02) birden fazla doğum yapanlardan daha yüksek bulundu. Serin dönemde tohumlanan ineklerden hem CBS hem de NS gruplarında sıcak döneme oranla daha yüksek gebelik elde edildi.

Süt verimi, VKS, sağılan gün sayısı, tohumlama sayısının 31. gün gebelik oranları üzerine etkisi görülmedi. Gebelik oranları 31. günde değerlendirildiğinde semen tipi ile mevsim ya da tohumlama sayısı arasında interaksyon saptanmadı.

Embriyonik kayıplar üzerine semen tipine ek olarak tohumlama sayısının etki ettiği saptandı (P=0,05). İlk tohumlaması yapılan ineklerin bir ya da birden fazla tohumlananlara oranla gebelik kayıpları açısından daha yüksek risk (ARR= 3,45; %95 CI=1,28-9,29) taşıdığı görüldü. İlk tohumlaması yapılan ineklerde görülen gebelik kaybı %24 (6/25) iken 2 veya 3 tohumlaması olan ineklerde ise %7,1 (6/85) olarak bulundu.

**Tablo-2.** Cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) ve Normal semen (NS) ile elde edilen gebelik oranları

Gebelik	CBS	NS		DRR <sup>a</sup>	(95% GA) <sup>b</sup>	P
31 gün, % (n/n)	31,8 (47/148)	40,9 (63/154)		0,80	(0,60-1,06)	0,09
62 gün, % (n/n)	25,7 (38/148)	39,0 (60/154)		0,68	(0,49-0,94)	0,01
Embriyonik ölüm, %(n/n)	19,1 (9/47)	4,8 (3/63)		4,07	(1,20-13,81)	0,02

<sup>a</sup> DRR, Düzeltilmiş relatif risk.

<sup>b</sup> 95% GA, %95 Güven Aralığında.

### **Doğum Sayısının ve Tohumlama Sayısının Gebelik Oranları Üzerine Etkisi**

Sperma ayırt etmeksizin primiparus ve multiparus hayvanlardaki gebelik oranlarına bakıldığında primiparus ineklerden daha iyi gebelik sonuçları elde edildi ( $P<0,01$ ) (Tablo-3). Sperma tipine göre de değerlendirildiğinde cinsiyeti belirlenmiş sperma ya da normal semen ile tohumlanan primiparus ineklerde gebelik oranları multiparuslardan daha yüksekti (Tablo-4). Benzer sonuçlar 62. gün gebelik muayenesinde de tespit edildi.

Tohumlama sayılarına bakıldığında ise cinsiyeti belirlenmiş sperma ile ilk tohumlaması yapılan primiparus ve multiparus ineklerde 31. gün gebelik oranlarında fark görülmedi ( $P=0,37$ ). Bununla birlikte birden fazla tohumlaması olan ineklerde CBS ile yapılan tohumlamalarda multiparus ineklerin gebelik oranlarının primiparuslara göre düşme eğiliminde olduğu tespit edildi ( $P=0,06$ ). Normal semen grubunda ise multiparuslardaki gebelik oranı primiparuslardan daha düşük bulundu ( $P=0,03$ ) (Tablo-5).



**Tablo - 3.** Sperma tipine bakılmaksızın gebelik oranları üzerine doğum sayısının etkisi.

Doğum sayısı*	31. gün % (n/n)	62. gün % (n/n)
Primiparus	47,6 (60/126)	41,3 (52/126)
Multiparus	28,4 (50/176)	26,1 (46/176)
P	< 0,01	0,02

\*Doğum sayısı: Primiparus = inekler ilk laktasyonlarında, Multiparus = birden fazla laktasyonu olan inekler.

**Tablo-4.** Doğum sayısının cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) ya da normal semende (NS) 31 ve 62. günlerdeki gebelik oranları üzerine etkisi

	CBS			NS		
	31. Gün	62. Gün	P	31. Gün	62. Gün	P
Primiparus % (n/n)	41,7 (25/60)	33,3 (20/60)	0,34	53,0 (35/66)	48,5 (32/66)	0,60
Multiparus, % (n/n)	25,0 (22/88)	20,5 (18/88)	0,47	31,8 (28/88)	31,8 (28/88)	-
P	0,03	0,08	-	0,007	0,004	-

**Tablo-5.** Doğum sayısı ve tohumlama sayısının cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) ya da normal semende (NS) 31. günlerdeki gebelik oranları üzerine etkisi

	İlk Tohumlama			>1'den fazla Tohumlama		
	CBS	NS	P	CBS	NS	P
Primiparus % (n/n)	38,5 (5/13)	58,3 (7/12)	0,31	42,6 (20/47)	52,8 (28/53)	0,30
Multiparus, % (n/n)	24,0 (6/25)	26,9 (7/26)	0,81	25,4 (16/63)	33,3 (21/63)	0,33
P	0,37	0,06		0,06	0,03	

#### Mevisimin Gebelik Oranları Üzerine Etkisi

Cinsiyeti belirlenmiş sperma ya da normal semen gruplarında mevsimin 31 ve 62. günlerdeki gebelik oranları üzerine etkisi Tablo 6'da gösterilmektedir. Sıcak dönem olarak tanımlanan (Haziran-Ağustos) periyodunda gebelik oranları her iki semen tipi içinde düşük bulundu ( $P<0,002$ ). Serin dönem olarak tanımlanan (sıcak aylar dışında kalan aylar) periyod da ise her iki semen tipinde gebelik oranları daha yüksek bulundu. Cinsiyeti belirlenmiş sperma ya da normal semende mevsimin 31 ve 62. günlerdeki gebelik oranları üzerine etkisi Tablo-7 de verilmiştir.

**Tablo-6.** Mevsimin 31 ve 62. günlerdeki gebelik oranları üzerine etkisi

Mevsim**	31. gün, % (n/n)	62. gün, % (n/n)
Serin Dönem	43,6 (85/195)	38,5 (75/195)
Sıcak Dönem	23,4 (25/107)	21,5 (23/107)
P	< 0,01	< 0,01

\*\* Mevsim: Sıcak= yılın yaz ayları (Haziran-Eylül), Serin=Sıcak aylar dışında kalan dönem.

**Tablo-7.** Cinsiyeti belirlenmiş sperma ya da normal semende mevsimin 31 ve 62. günlerdeki gebelik oranları üzerine etkisi

	CBS			NS		
	31. Gün	62. Gün	P	31. Gün	62. Gün	P
Serin Dönem*, % (n/n)	38,1 (37/97)	30,9 (30/97) <sup>a</sup>	0,29	49,0 (48/98)	45,9 (45/98) <sup>b</sup>	0,66
Sıcak Dönem*, % (n/n)	19,6 (10/51)	15,7 (8/51)	0,60	26,8 (15/56)	26,8 (15/56)	-
P	0,01	0,03	-	0,004	0,01	-

\*Sıcak Dönem= yılın yaz ayları (Haziran-Eylül), Serin Dönem=Sıcak aylar dışında kalan dönem.

a, b; P=0,03

### **Tohumlama Yapılan Kornu Uterinin Gebelik Oranları Üzerine Etkisi**

Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan tohumlamalarda tohumlamaların yapıldığı kornu uterilere göre gebelik oranlarında fark olduğu tespit edildi. Bu şekilde bir fark normal semende tespit edilmedi (Tablo-8). Çalışmada, 5'i cinsiyeti belirlenmiş sperma 4'ü ise normal semen grubunda olmak üzere toplam 9 ineğin tohumlama anında ovaryumlarının ultrasonografik muayenesi yapılamamış olup bu ineklerin tohumlamaları spermanın korpus uteriye bırakılması yöntemi ile yapıldı.

**Tablo-8.** Farklı kornu uterilere CBS ya da NS ile yapılan tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları

	CBS			NS		
	31. Gün	62. Gün	P	31. Gün	62. Gün	P
Sol Kornu Uteri% (n/n)	43,8 (21/48)	39,6 (19/48)	0,67	45,2 (28/62)	43,5 (27/62)	0,86
Sağ Kornu Uteri% (n/n)	27,4 (26/95)	20,0 (19/95)	0,23	39,8 (35/88)	37,5 (33/88)	0,76
P	0,05	0,02		0,51	0,46	

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, cinsiyeti belirlenmiş sperma ve normal semen ile tohumlanan sütçü ineklerden elde edilen gebelik oranlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışma bir sütçü işletmede yapıldı. Elde edilen verilerin sonucunda çalışmanın, cinsiyeti belirlenmiş spermanın sütçü ineklerdeki kullanımı hakkında genel bir fikir vermesi hedeflendi.

Sperma cinsiyetinin belirlenmesi ile ilgili teknikler reproduktif biyoteknoloji alanında son yıllarda oldukça fazla rağbet görmektedir. Garner ve ark. (9) spermada cinsiyet tayini amacıyla kullanılabilir en güvenilir methodun flow-sitometrik yöntem olduğunu rapor etmiştir. Temelde semenden cinsiyetlerine göre spermaların ayrılması işlemi X ve Y kromozomlarının taşıdığı DNA içeriğinin kütleli olarak birbirinden farklı olmasına dayanmaktadır (8). Ayırma işlemi öncesi boyanan spermalar DNA içeriklerine göre boya almakta ve flow sitometriden geçme işleminde aldıkları boya yoğunluğuna göre %90 oranında kesin istenilen cinsiyete göre ayrılmaktadır. Sütçü işletmelerde doğan dişi buzağılar ekonomik olarak daha fazla önem arz etmektedir. Bu nedenle, cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı ile sürü içi büyümenin daha hızlı sağlanabilmesi, kaliteli damızlık ineklerden dişi buzağılar elde edilebilmesi, dişi buzağının doğum kolaylığı gibi bir takım olumlu etkilerinden söz etmek mümkündür (129). Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan tohumlamalar sonrasında elde edilen gebelik oranlarının normal semene göre daha düşük olduğu belirtilmektedir (145, 147, 152). Cinsiyeti belirlenmiş sperma sonrası fertilitedeki azalma bazı araştırmacılara göre ticari payetler içerisinde düşük dozda sperma olması (156) veya ayırma işleminin spermanın yaşama kapasitesi üzerine olumsuz etki etmesinden (128) dolaydır. Düvelerde elde edilen gebelik oranları normalden %10-20 arasında daha düşük iken bu oran sütçü ineklerde daha dramatik bir şekilde %20-30 azalmaktadır (146). Genel bir kanı olarak cinsiyeti belirlenmiş spermanın kullanımı, tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranının düvelerde daha makul sınırlar içerisinde olmasından dolayı, düvelerde daha yaygındır (145). Sütçü ineklerde gebelik oranlarındaki dramatik düşüş sebebiyle ineklerdeki kullanımı ve yapılan çalışmaların sayısı belirli sınırlar içerisinde kalmıştır. Düvelerden farklı olarak sütçü ineklerde fertilitayı etkileyen birçok faktör bulunmaktadır bunlar mastitis, metritis, ayak problemleri, doğum oranı, sıcaklık stresi v.b. olarak tanımlanabilir. Fertilitayı etkileyen bu faktörlerin ineklerdeki gebelik oranlarını normal semen kullanımında dahi düşürdüğü bilinen bir gerçektir. Bu şekilde görülebilecek negatif etkilerin giderilerek cinsiyeti belirlenmiş sperma ile daha olumlu

gebelik oranları elde edebilmek amacıyla bazı çalışmalarda farklı yöntemler denenmiştir. Bu yöntemler payetler içerisine konulan CBS sayısının artırılması (147), tohumlama anında spermanın kornu uteri içerisine verilmesi (152), zaman ayarlı tohumlama programının kullanımı (153) ya da doğal kızgınlıkta tohumlama yapılması (151) olarak sıralanabilir. Yapılan bazı çalışmalarda postpartum 80-100. günler arasında olan ve herhangi bir sağlık hastalıkları, metritis, mastitis, ayak problemi, abort, postpartum erken dönem rahatsızlıkları, bulunmayan ineklerde CBS ile yapılan tohumlamalar sonrasında makul gebelikler elde edildiği rapor edilmiştir (147, 153). Bu nedenlerden dolayı, çalışmaya alınan inekler sağlık problemi olmayan hayvanlardan seçildi. Ayrıca çalışmaya alınan ineklere uygulanan senkronizasyon protokolünün başlangıcında sıklık yani ilk hormon uygulamasında ultrasonografi ile tespit edilebilen bir korpus luteumu olanlar seçildi.

Şu ana kadar cinsiyeti belirlenmiş spermanın sütçü ineklerdeki kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda senkronizasyon protokolleri kullanılmamış olup doğal kızgınlıkların takibinde tohumlama işlemleri yapılmıştır (147, 152). Fakat, özellikle büyük işletmelerde sürünün reproduktif yönetiminin GnRH, PGF<sub>2α</sub> ve progesteron implantları gibi egzojen uygulanan hormonlar ile düzenlendiği bilinmektedir. Ülkemizde ve dünyada, Ovsynch senkronizasyon protokolü östrus siklusunun ve ovulasyon zamanının kontrol edilebilmesi ve kızgınlık takibine gerek olmaksızın zaman ayarlı tohumlamanın yapılabilabilmesine izin vermesi nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (99). İlk kullanılmaya başlandığı zamandan günümüze kadar Ovsynch'le ilgili yapılan çalışmalardaki gebelik oranlarının ortalamasına bakıldığında %30-50 arasında bir sonuç çıkmaktadır (100). Tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılan ve fertilitedeki başarısı kabul edilen Ovsynch senkronizasyon protokolü cinsiyeti belirlenmiş spermanın senkronizasyon protokolü ile kullanımı sonrasındaki başarısının tespit edilmesi amacıyla seçildi. Bu çalışmaya da dahil edilen 302 sıklık Holştayn cinsi sütçü inek östrus siklusunun herhangi bir aşamasında Ovsynch senkronizasyon protokolüne alındı. Ovsynch senkronizasyon protokolüne alınan ineklerin cinsiyeti belirlenmiş sperma ya da normal semen ile tohumlama öncesinde bir takım ön seçim işlemleri yapıldı ki bunlar daha önceki çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ışığında planlandı. Tohumlamaların muhtemel ovulasyonun olacağı kornu uteriye yapılması gibi fertiliteye olumlu etkisi olacağı düşünülen uygulamalar yapılarak bunların CBS ile elde edilecek gebelik oranlarını artırması hedeflendi. Bu sebeple, tohumlama anında preovülator folikül çapının 12-18 mm'ler (165) arasında seçilmesi, temiz çara akıntısının gözlenmesi (166) ve kornu uteri içerisine tohumlama (167) gibi bir takım gebelik oranına olumlu etki edecek seçim işlemleri uygulanmış olmasına rağmen CBS (%31.8) deki gebelik oranı NS (%40.9) ile karşılaştırıldığında gebelikte yaklaşık %9'luk bir düşme eğilimi saptandı

(P=0.09). Bu çalışmada ve daha önce yapılan çalışmalarda (147, 152) kullanılan bir takım seçim kriterleri olmasına rağmen CBS ile fertilitenin etkilendiği saptandı. Örneğin, Andersson ve ark. (152) yaptığı çalışmada doğal kızgınlık tespiti yapılan ineklerde kornu uteri içerisine yapılan tohumlamalarda CBS ( $2 \times 10^6$  sperma/payet) ile %21 oranında gebelik elde edilirken NS'de ( $15 \times 10^6$  sperma/payet) bu oran %46 bulunmuştur. Gebelik oranların arttırılması amacıyla payetler içerisinde bulunan spermanın dozunun arttırılması ile ilgili değişik çalışmalar yapılmış olup dozun iki katına çıkartılmasının da fertilité üzerine bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (147). DeJarnette ve ark. (147) gebelik oranında %12'lik bir düşüş saptamışlardır. Etçi ineklerde yapılan bir çalışmada aynı dozda CBS ve NS ( $2,5 \times 10^6$ ) ya da biraz daha yüksek dozda NS ( $4 \times 10^6$ ) kullanılmış. Sonuç olarak NS'de yüksek ya da düşük doz kullanılmasının fark ettmediği CBS ile elde edilen gebelik oranının daha düşük olduğu saptanmıştır (169). Sperma ayırma işleminin uzun ve maliyetli bir işlem olmasından dolayı CBS payetleri içerisindeki sperma dozunun normalden ( $2 \times 10^6$ ) yüksek kullanılmasının pratik olmayacağı yapılan çalışmalar sonucunda belirtilmiştir (145, 147). Garner (168) spermanın ayırma işleminde tabi tutulduğu değişen atmosferik basınçta ultraviyole ışına maruz kalma sürecinin, sulandırılmasının ve santrifüje edilmesinin fertilize olma kapasitesinde azalmaya neden olduğunu belirtmiştir. Buna ek olarak, CBS kullanımında dikkat edilmesi gereken başka bir noktanın da her boğanın spermasının bu ayırma işlemi için uygun olmadığıdır (13). Ayırma işlemindeki negatif etkileri azaltmak amacıyla bu çalışmada aynı boğaya ait CBS ve NS payetleri kullanıldı. Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen gebelik ortalamalarına göre sütçü ineklerde CBS kullanımı sonrasında gebelik oranlarında, doğal kızgınlıklarında tohumlanmış olsalar bile, %20-25'lik bir düşüş olabileceği belirtilmiştir (147, 151, 152). Bu çalışmada ise %9'luk bir fark tespit edildi.

Bu çalışmada saptanan 31. ve 62. günler arasındaki fark embriyonik ölümün CBS'de NS'dan daha fazla olmasından kaynaklandığı tespit edildi. Çalışmadaki sonuçlara benzer şekilde Bodmer ve ark. (151)'da CBS ile yapılan tohumlamalar sonrasında gebelik kayıplarında %17,2'lik bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan, Seidel ve Garner (128) düvelerde CBS tohumlamaları sonrasında NS ile karşılaştırdıklarında embriyonik ölümlerde yalnızca %1-2 oranında artış olduğunu ifade etmişlerdir. Gebeliklerin kontrolü amacıyla 62. günde yapılan ultrasonografik muayene sonucunda CBS'nin (%25,7) gebelik oranı NS'den (%39,0) düşük bulunmuştur (P=0.01). 31. ve 62. gündeki gebelik oranları karşılaştırıldığında CBS'nin (%19,2) embriyonik ölüm oranının NS'dan (%4,8) istatistiki olarak da daha fazla olduğu görüldü (P=0.02). Embriyonik ölümlerde farklılıklar saptanmasına rağmen CBS tohumlama kayıtlarına dayanan çalışmalar göstermiştir ki CBS'dan doğan buzağular ile NS

buzağuları arasında, spermanın ayrılması işleminde boyanması ve bir takım süreçlerden geçmesine rağmen, her hangi bir fark saptanmamıştır (10,161).

İneklerde fertilitiyi olumsuz etkileyen doğum sayısı, sıcaklık stresi, süt verimi ve tohumlama sayısı gibi faktörler mevcuttur (158, 160). Bu çalışmada da sperma tipi fark etmeksizin doğum sayısı ve mevsimin gebelik üzerine etkisi olduğu saptandı. Dejarnette ve ark. (147) CBS ve NS kullanarak yaptığı çalışmada doğum sayısının fertilitite üzerine etkisinin olduğunu ve ilk laktasyon (%30,4) ile ikinci laktasyondaki (%31,1) ineklerde gebelik oranının 3. ve 4. laktasyondakilerden (%25,6) daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde, bu çalışmada da ilk laktasyondaki ineklerde gebelik oranları (%47,6) ikinci ya da daha fazla laktasyonda olanlardan (%28,4) daha yüksek bulundu. Laktasyon sayılarına göre CBS (%41,7'e karşın %25,0) ve NS'de (%53,0'e karşın %31,8) karşılaştırıldığında her ikisinde de ilk laktasyondaki hayvanlardaki gebelik oranları daha yüksek bulundu. İki'den fazla laktasyonu olan ineklerin ilk laktasyondakilere göre daha düşük gebelik oranlarının ve embriyonik ölümlerinin daha fazla olmasının sebebi olarak artan süt verimi, enerji dengesizlikleri, doğum sonrası görülen hastalıklar ve mastitis sayılabilir (170). Doğum sayısına ilave olarak, serin mevsimde tohumlanan ineklerin gebe olma ihtimali sıcak dönemde tohumlananlardan %66-73 daha fazladır. Sıcaklık stresinin fertilitiyi olumsuz etkilediği birçok çalışmada gösterilmiştir (171, 172). De Rensis ve Scaramuzzi (171) yaptıkları derlemede sıcak mevsimde yapılan tohumlamaların serin mevsimle karşılaştırıldığında %20-30 oranında daha düşük gebelik ile sonuçlanacağını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da sıcaklık stresinin gebelik üzerine olan olumsuz etkileri her iki grupta net bir şekilde görülmektedir. Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile serin dönemde yapılan tohumlamalardan %38,1 gebelik elde edilirken bu oran sıcak dönemde %19,6'lara kadar düşmektedir (P=0.01).

Sperma payetlerinin içerisinde düşük dozda sperma olmasından dolayı bazı araştırmacılar gebelik oranının etklendiğini belirtmesine (139) rağmen bazı araştırmacılar da dozun arttırılmasının gebelik oranları üzerine her hangi bir olumlu etkisi olmadığını (147) belirtmiştir. Yapılan çalışmada tohumlamaların muhtemel ovulasyonun olacağı kornu uteriye yapılması planlanarak düşük dozda sperma kullanımının olumsuz etkisinin önlenmesi düşünüldü. Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile sol kornu uteriye yapılan tohumlamalar sonrasında elde edilen gebelik oranlarının sağ kornu uteriye karşılaştırıldığında daha iyi olduğu görülmektedir (P=0,05). Daha önce yapılan çalışmalarda tohumlamaların yapıldığı kornu uteriler arasındaki gebelik oranları karşılaştırılmamış olup bu çalışmada da gebelik oranlarında gözlenen farkın neden kaynakladığı net bir şekilde ortaya konulamamıştır. Fakat elde edilen veriler göstermiştir ki kornu uteriye yapılan tohumlamalarında fertilitiyi arttırıcı yönde ciddi bir etkisi bulunmamaktadır.



Sonuç olarak, daha fertil inekler seçilebilmesi ve gebelik oranlarının daha iyi olması amacıyla bir takım ön seçim işlemleri yapılmasına rağmen sütçü ineklerde cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı sonrası elde edilen gebelik oranının normal semene göre %9'luk bir azalma eğiliminde olduğu tespit edildi. Buna rağmen, Türkiye'de özellikle de büyüme isteğinde olan sütçü işletmelerde cinsiyeti belirlenmiş spermanın sütçü ineklerde de kullanılabileceği bu çalışma ile gösterilmektedir.

## EKLER

### Kısaltma ve Tanımlama İndeksi

CBS	Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma
NS	Normal Semen
CL	Korpus Luteum
LH	Luteinleştirici Hormon
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
BMP-6	Kemik Morfogenetik Protein-6
GDF-9	Büyüme ve Farklılaşma Faktörü
BMP-15	Kemik Morfogenetik Protein-15
TGF β1	Transformik Growth Faktör β1
FSH	Foliküler Stimule Edici Hormon
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
VEGF	Vasküler Endothel Büyüme Faktörü
IGFBP-4 ve 5	İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu Bağlama Proteini 4 ve 5
PAPP-A	Gebeliğe Özgü Plazma Proteini-A
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
CYP11A1	Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme
GnRH	Gonodatropin Salınım Hormonu
CARTPT	Kokain Ve Anfitamin Düzenleyici Transkript
PGFM	Prostaglandin F <sub>2α</sub> metaboliti
IFN-tau	İnterferon Tau
P4	Progesteron
DAPI	40-6-diamidino-2-phenylindole
VKS	Vucüt Kondüsyon Skoru

## KAYNAKLAR

1. GUYER MF. Accessory chromosomes in man. *Biological Bulletin of Marine Biology Laboratory, Woods Hole*, 19: 219–234, 1910.
2. JOHNSON LA, FLOOK JP, ve LOOK MV. Flow cytometry of X- and Y chromosome bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Research*, 17: 203–212, 1987.
3. WELCH GR, JOHNSON LA. Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology*, 52: 1343–52, 1999.
4. WELCH GR, WALSBIESER GC, WALL RJ, JOHNSON LA. Flowcytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm. *Animal Biotechnology*, 6:131-139, 1995.
5. BLECHER SR, HOWIE R, LI S, DETMAR J, BLAHUT LM. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology*, 52: 1309-1321, 1999.
6. ENGELMANN U, KRASSNIG GF, SCHATZ H, SCHILL WB. Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. *Gamete*, 19: 151-160, 1988.
7. ERICSSON RJ, LANGEVIN CN, NISHINO MI. Isolation of fractions rich in Y spermatozoa. *Nature*, 246:421-424, 1973.
8. JAIN A, YATHISH HM, JAIN T, ve SHARMA A. Efficient production of sexed semen by Flow Cytometry: A Review, *Agricultural Review*, 32: 36–45. 2011.
9. GARNER DL, GLEDHILL BL, PINKEL D, LAKE S, STEPHENSON D, VAN DILLA MA, ve ark. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 28: 312–21. 1983.
10. TUBMAN LM, BRINK Z, SUH TK, SEIDEL GEJr. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *Journal of Dairy Science*, 82: 1029-1036, 2004
11. DE VRIES A, OVERTON M, FETROW J, LESLIE K, EICKER S, ROGERS G. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 91: 847-856, 2007.
12. DEJARNETTE JM, NEBEL RL, MARSHALL CE. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology*, 71: 49-58, 2009.
13. SEIDEL GEJr. Using sexed semen. *Applied Reproductive Strategies Conference Proceedings*, Nashville, TN, pp.71-75, 2010.
14. OLDS D, SEATH DM. Repeatability of the estrous cycle length in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 34: 626-632, 1951.
15. MCNUTT GW. The corpus luteum of pregnancy in the domestic cow (*Bos taurus*) and a brief discussion of cyclical ovarian changes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 72: 286–99, 1927.
16. COLE HH. A study of the mucosa of the genital tract of the cow, with special reference to the cyclic changes. *American Journal of Anatomy*, 46: 261–301, 1930.
17. HAMMOND J. The physiology of reproduction in the cow. Cambridge, London: Cambridge University Press; 1927; *Br Vet Bull.* 11:165. 1955.
18. RAJOKOSKI E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left–right variations. *Acta Endocrinology*, 34: 7–68, 1960.
- 19- PETER AT, LEVINE H, DROST M, BERGFELT DR. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*, 71:1343-1357, 2009.
20. WETTEMANN RP, HAFS HD, EDGERTON LA, SWANSON LV. Estradiol and Progesteron in blood serum during the bovine estrous cycle. *Journal of Animal Science*, 34: 1020-1024, 1972.

21. SARTORI R, HAUGHIAN JM, SHAVER RD, ROSA GJM, WILTBANK MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 87: 905-920, 2004.
22. ALLRICH RD. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 77: 2738-2744, 1994.
23. NEBEL RL. Components of a successful heat detection program. *Adv. Dairy Technology*, 15: 191-203, 2003.
24. CUNNINGHAM EP. Structure of dairy cattle breeding in western europe and comparisons with north america. *Journal of Dairy Science*, 66: 1579-1587, 1983.
25. BOETTCHER PJ, HANSEN LB, CHESTER-JONES H, YOUNG CW. Responses of yield and conformation to selection for milk in a designed experiment with a control population. *Journal of Dairy Science*, 76: 267-273, 1993.
26. LOPEZ H, SATTER LD, WITBANK MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 81: 209-223, 2004.
27. STABENFELDT GH, EWING LL, McDONALD LE. Peripheral plasma Progesteron levels during the bovine oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 19: 433-442, 1969.
28. SAVIO JD, BOLAND MP, ROCHE JF. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88: 581-591, 1990.
29. KINDAHL H, EDQVIST LE, GRANSTRISM E, BANE A. The release of prostaglandin f2alfa as reflected by l+keto- 13,14-dihydroprostaglandin f2alfa in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. *Prostaglandins*, 11: 871-878, 1976.
30. ROCHE JF. Follicular waves in cattle. *Veterinary Research Communications*, 28: 107-110, 2004.
31. ADAMS GP, EVANS AC, RAWLINGS NC. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100(1): 27-33, 1994.
32. RAJAMAHENDRAN R, TAYLOR C. Follicular dynamics and temporal relationship among body temperature, oestrus, the surge of luteinizing hormone and ovulation in Holstein Heifers treated with norgestomet. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2: 461-467, 1991.
33. MURPHY MG, BOLAND MP, ROCHE JF. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post- partum beef suckler cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90: 523-533, 1990.
34. ROCHE JF, AUSTIN EJ; RYAN M; O'ROURKE M; MIHM M; DISKIN MG. Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl 54: 61-71, 1999.
35. AHMAD N, TOWNSEND EC, DAILEY RA, INSKEEP EK. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Animal Reproduction Science*, 49: 13-28, 1997.
36. GINTHER OJ, KOT K, KULICK LJ, WILTBANK MC. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, 48(1): 75-87, 1997.
37. SENGER PL. Embryogenesis of the pituitary gland and the male or female reproductive system. In: *Pathways to pregnancy and parturition*. Current Conception Inc., 1st edition, 58-76, 1997.
38. KNIGHT PG, GLISTER C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, 121: 503-512, 2001.
39. BRAW-TAL R, YOSSEFI S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109: 165-171, 1997.

40. PEDERSEN T, PETERS H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17: 555-557, 1968.
41. BRITT JH. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *Dairy Session*, 1: 39-43, 1991.
42. HIRSHFIELD AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124: 43–101, 1991.
43. McNATTY KP, READER K, SMITH P, HEATH DA, JUENGEL JL. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a perspective. *Society of Reproduction and Fertility*, 64: 55-68, 2007.
44. BRAW-TAL R. Expression of mRNA for follistatin and inhibin/activin subunits during follicular growth and atresia. *Journal of Molecular Endocrinology*, 13(3): 253-64, 1994.
45. DUBE JL, WANG P, ELVIN J, LYONS KM, CELESTE AJ, MATZUK MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology*, 12: 1809-17, 1998.
46. BRAW-TAL R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular Cell Endocrinology*, 187(1-2): 11-8, 2002.
47. FAIR T, HULSHOF SCJ, HYTTEL P, GREVE T, BOLAND M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 46: 208–215, 1997a.
48. FAIR T, HULSHOF SCJ, HYTTEL P, GREVE T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*, 195: 327–336, 1997b.
49. FORTUNE JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*, 50: 225-232, 1994.
50. AUSTIN EJ, MIHM M, EVANS ACO, KNIGHT PG, IRELAND JLH, IRELAND JJ, ROCHE JF. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 64: 839–848, 2001.
51. GINTHER OJ, WILTBANK MC, FRICKE PM, GIBBONS JR, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 55(6): 1187-94, 1996.
52. AERTS JM, BOLS PE. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1): 171-9, 2010.
53. GINTHER OJ, BERGFELT DR, KULICK LJ, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology*, 52(6): 1079-93, 1999.
54. BLEACH ECL, GLENCROSS RG, FEIST SA, GROOME NP, KNIGHT PG. Plasma inhibin a in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biology of Reproduction*, 64: 743–752, 2001.
55. KULICK LJ, KOT K, WILTBANK MC, GINTHER OJ. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, 52: 913–921, 1999.
56. YANG MY and FORTUNE JE. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 74(9): 1095–1104, 2007.
57. BEG MA and GINTHER OJ. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, 132: 365–377, 2006.
58. GINTHER OJ, BERGFELT DR, BEG MA, MEIRA C, ve KOT K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biology of Reproduction*, 70: 99–105, 2004.
59. FORTUNE JE, RIVERA GM, YANG MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, 82–83: 109–126, 2004.

60. LUO W, GUMEN A, HAUGHIAN JM, WILTBANK MC. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 84(2): 369-78, 2011.
61. LV L, JIMENEZ-KRASSEL F, SEN A, BETTEGOWDA A, MONDAL M, FOLGER JK, LEE KB, IRELAND JJ, SMITH GW. Evidence supporting a role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CARTPT) in control of granulosa cell estradiol production associated with dominant follicle selection in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(3): 580-6, 2009.
62. SMITH GW, SEN A, FOLGER JK, IRELAND JJ. Putative role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CARTPT) in dominant follicle selection in cattle. *Society for Reproduction and Fertility*, 67: 105-17, 2010.
63. VASCONCELOS JL, SARTORI R, OLIVEIRA HN, GUENTHER JG, WILTBANK MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56(2): 307-14, 2001.
64. SCHAMS D, BERISHA B. Regulation of corpus luteum function in cattle: an overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 39: 241–251, 2004.
65. MEIDAN R, GIRSH E, BLUM O ve ABERDAM E. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. *Biology of Reproduction*, 43(6): 913-921, 1990.
66. PATE JL, JOHNSON-LARSON CJ and OTTOBRE JS. Life or death decisions in the corpus luteum. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4): 297–303, 2012.
67. PETERS KE, BERGFELD EG, CUPP AS, KOJIMA FN, MARISCAL V, SANCHEZ T, WEHRMAN ME, GROTTJAN HE, HAMERNIK DL, KITTOK RJ, ve ark. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. *Biology of Reproduction*, 51(6): 1248-54, 1994.
68. WILTBANK MC, GALLAGHER KP, CHRISTENSEN AK, BRABEC RK AND KEYES PL. Physiological and immunocytochemical evidence for a new concept of blood flow regulation in the corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 42(1): 139-149, 1990.
69. SPENCER TE ve BAZER FW. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biology of Reproduction*, 53(6), 1527-1543, 1995.
70. HANSEL W, CONCANNON PW, LUKASZEWSKA JH. Corpora lutea of the large domestic animals. *Biology of Reproduction*, 8: 222-245, 1973.
71. THATCHER WW, CHENAULT JR. Reproductive physiological responses of cattle to exogenous prostaglandin F<sub>2</sub> alfa. *Journal of Dairy Science*, 59(7): 1366–1375, 1976.
72. GORDON D, NISWENDER JL, JUENGEL PJ, SILVA M, KEITH R, ve ERIC WM. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, 80: 1, 2000.
73. ROBINSON RS, MANN GE, LAMMING GE, WATHES DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, 122(6): 965-79, 2001.
74. VALLET JL, LAMMING GE, BATTEN M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90(2): 625-634. 1990.
75. LAMMING GE, ve MANN GE. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F<sub>2α</sub> production in cows by progesterone and oestradiol. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103: 69-73, 1995.
76. MCCRACKEN JA, CUSTER EE, LAMSA JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, 79(2): 263-323, 1999.
77. MIYAMOTO A, SHIRASUNA K, SASAHARA K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Domestic Animal Endocrinology*, 37(3): 159-69. 2009.

78. SHRESTHA HK, GINTHER OJ. Increase in progesterone and luteal blood flow without a luteolytic response after prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment in early luteal-phase heifers. *Animal Reproduction Science*, 124(1-2): 7-11, 2011.
79. WILTBANK MC, SHIAO TF, BERGFELT DR, GINTHER OJ. Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptors in the early bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 52(1): 74-8. 1995.
80. GINTHER OJ, SHRESTHA HK, FUENZALIDA MJ, SHAHIDUZZAMAN AK, BEG MA. Characteristics of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin f<sub>2</sub>alpha before, during, and after spontaneous luteolysis and temporal intrapulse relationships with progesterone concentrations in cattle. *Biology of Reproduction*, 82(6): 1049-56, 2010.
81. MCCRACKEN J. Prostaglandin F-2 alpha and corpus luteum regression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 180: 456-72, 1971.
82. HIXON JE, HANSEL W. Evidence for preferential transfer of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha to the ovarian artery following intrauterine administration in cattle. *Biology of Reproduction*, 11(5): 543-52, 1974.
83. SPENCER TE, JOHNSON GA, BAZER FW, BURGHARDT RC. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Society of Reproduction and Fertility*, 64: 379-96, 2007.
84. CLEMENTE M, DE LA FUENTE J, FAIR T, AL NAIB A, GUTIERREZ-ADAN A, ROCHE JF, RIZOS D, LONERGAN P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, 138(3): 507-17, 2009.
85. DORNIK P, BAZER FW ve SPENCER TE. physiology and endocrinology symposium: biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *Journal of Animal Science*, 91(4): 1627-1638, 2013.
86. FORDE N, CARTER F, FAIR T, CROWE MA, EVANS ACO, SPENCER TE, BAZER FW, MCBRIDE R, BOLAND MP, O'GAORA P, LONERGAN P ve ROCHE JF. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(4): 784-794, 2009.
87. DE VRIES A. Economic value of pregnancy in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(10): 3876–3885, 2006.
88. SENGER PL. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *Journal of Dairy Science*, 77: 2745-53, 1994.
89. SANTOS JEP, RUTIGLIANO HM, SA FILHO MF. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 110: 207–221, 2009.
90. LAUDERDALE JW, SEGUIN BE, STELLFLUG JN, CHENAULT JR, THATCHER WW, VINCENT CK ve LOYANCANO AF. Fertility of cattle following PGF<sub>2</sub> $\alpha$  injection. *Journal of Animal Science*, 38(5): 964-967, 1974.
91. MOREIRA F, ORLANDI C, RISCO CA, MATTOS R, LOPES F, THATCHER WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84: 1646–1659, 2001.
92. CHEBEL RC, SANTOS JEP, CERRI RLA, RUTIGLIANO HM, BRUNO RGS. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *Journal of Dairy Science*, 89: 4205–4219, 2006.
93. BRITT JH, KITTOCK RJ, ve HARRISON DS. Ovulation, estrus and endocrine response after GnRH in early postpartum cows. *Journal of Animal Science*, 39(5): 915-919, 1974.
94. FOSTER JP, LAMMING GE, PETERS AR. Short-term relationships between plasma LH, FSH and progesterone concentrations in post-partum dairy cows and the effect of Gn-RH injection. *Journal of Reproduction and Fertility*, 59(2): 321-7, 1980.
95. TWAGIRAMUNGU H, GUILBAULT LA, DUFOUR JJ. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 73(10): 3141-51, 1995.

96. CORNER GW, ALLEN WM. Physiology of the corpus luteum. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193(4): 1574, 2005.
97. MAKEPEACE AW, WEINSTEIN GL, FRIEDMAN MH. The effect of progestin and progesterone on ovulation in the rabbit. *American Journal of Physiology*, 119(3): 512-516. 1937.
98. DISKIN MG, AUSTIN EJ, ROCHE JF. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1-2): 211-228, 2002.
99. PURSLEY JR, MEE MO, WILTBANK MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*, 44(7): 1995.
100. RABIEE AR, LEAN IJ, STEVENSON MA. Efficacy of ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: A Meta-Analysis. *Journal of Dairy Science*, 88(8): 2754-2770, 2005.
101. SMALL JA, AMBROSE JD, MCCAUGHEY WP, WARD DR, SÜTHERLAND WD, GLOVER ND, RAJAMAHENDRAN R. The effects of gonadotropin releasing hormone in prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -based timed insemination programs for beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 81: 335-343, 2001.
102. PORTALUPPI MA, STEVENSON JS. Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the ovsynch protocol. *Journal of Dairy Science*, 88(3): 914-921, 2005.
103. DEJARNETTE JM, MARSHALL CE. Effects of pre-synchronization using combinations PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and (or) GnRH on pregnancy rates of Ovsynch- and Cosynch-treated lactating Holstein cows *Animal Reproduction Science*, 77: 51-60, 2003.
104. BRUSVEEN DJ, CUNHA AP, SILVA CD, CUNHA PM, STERRY RA, SILVA EPB, GUENTHER JN, WILTBANK MC. Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during ovsynch affects pregnancies per ai in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 1044-1052, 2008.
105. BLEACH ECL, GLENCROSS RG, KNIGHT PG. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrus cycles. *Reproduction*, 127: 621-629, 2004.
106. SANTOS JEP, NARCISO CD, RIVERA F, THATCHER WW, CHEBEL RC. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93: 2976-2988, 2010.
107. YILMAZBAS-MECITOGLU G, KARAKAYA E, KESKIN A, ALKAN A, GUMEN A. Reducing the duration between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment in the Ovsynch protocol to 6 days improved ovulation to second GnRH treatment, but inclined to reduce fertility. *Journal of Dairy Science*, 96(6): 3817-24, 2013.
108. VASCONCELOS JL, SILCOX RW, ROSA GJ, PURSLEY JR, WILTBANK MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52(6): 1067-78, 1999.
109. MOREIRA F, ORLANDI C, RISCO CA, MATTOS R, LOPES F, THATCHER WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84: 1646-1659, 2001.
110. EL-ZARKOUNY SZ, CARTMILL JA, HENSLEY BA, STEVENSON JS. Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and Progesterone. *Journal of Dairy Science*, 87: 1024-1037, 2004.
111. GALVÃO KN, SÁ FILHO MF, SANTOS JEP. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90: 4212-4218, 2007.
112. GUMEN A, KESKIN A, YILMAZBAS-MECITOGLU G, KARAKAYA E, ALKAN A, OKUT H, WILTBANK MC. Effect of presynchronization strategy before Ovsynch on fertility at first service in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 78: 1830-1838, 2012.



113. SOUZA AH, AYRES H, FERREIRA RM, WILTBANK MC. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 70(2): 208–215, 2008.
114. LIMA JR, RIVERA FA, NARCISO CD, OLIVEIRA R, CHEBEL RC, SANTOS JE. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(11): 5436-46, 2009.
115. YILMAZBAS-MECITOGLU G, KARAKAYA E, KESKIN A, ALKAN A, OKUT H, GÜMEN A. Effects of presynchronization with gonadotropin-releasing hormone-prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  or progesterone before Ovsynch in noncyclic dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(12): 7186-94, 2012.
- 116.- RATHBONE MJ, KINDER JE, FIKE K, KOJIMA F, CLOPTON D, OGLE CR, BUNT CR. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50: 277–320, 2001.
117. GALVÃO KN, SANTOS JE, JUCHEM SO, CERRI RL, COSCIONI AC, VILLASEÑOR M. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*, 82(12): 3508-17, 2004.
118. STEVENSON JS, PURSLEY JR, GARVERICK HA, FRICKE PM, KESLER DJ, OTTOBRE JS, WILTBANK, MC. Treatment of cycling or noncycling lactating dairy cows with Progesterone during the Ovsynch. *Journal of Dairy Science*, 89: 2567-2578, 2006.
119. YILMAZBAS-MECITOGLU G, KARAKAYA E, KESKIN A, GUMEN A, KOC V, OKUT H. Comparison of synchronisation and fertility after different modifications of the ovsynch protocol in cyclic dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarica*, 62(1): 64-73, 2014.
120. BOETTCHER PJ, HANSEN LB, CHESTER-JONES H, YOUNG CW. Responses of yield and conformation to selection for milk in a designed experiment with a control population. *Journal of Dairy Science*, 76(1): 267-273, 1993.
121. LUCY MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science*, 84(6): 1277–1293, 2001.
122. BUTLER WR. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in Dairy Cattle, 81:2533–2539, 1998.
123. WASHBURN SP, SILVIA WJ, BROWN CH, MCDANIEL BT, MCALLISTER AJ. Trends in reproductive performance in southeastern holstein and jersey DHI Herds. *Journal of Dairy Science*, 85: 244–251, 2002.
124. HANSEN JB. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. *Journal of Dairy Science*, 83: 1145–1150, 2000.
125. SANGSRITAVONG S, COMBS DK, SARTORI RF, ARMENTANO LE ve WILTBANK MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of Progesterone and estradiol 17 $\beta$  in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85: 2831-2842, 2002.
126. WILTBANK M, LOPEZ H, SARTORI R, SANGSRITAVONG S, GUMEN A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65:17–29, 2006.
127. LOPEZ H, SATTER LD, WILTBANK MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 81: 209–223, 2004.
128. SEIDEL JR GE, GARNER DL. Sexing mammalian sperm by flow cytometry. *Reproduction*, 124: 733–43, 2002.
129. HOHENBOKEN WD. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology*, 52(8): 1421–1433, 1999.
130. JOHNSON LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art. *Animal Reproduction Science*, 60–61: 93–107, 2000.

131. WEIGEL KA. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. *Journal of Dairy Science*, 87: E120-E130, 2004.
132. MAXWELL WMC, EVANS G, HOLLINSHEAD FK, BATHGATE R, DEGRAAF SP, ERIKSSON BM, ve ark. Integration of sperm sexing technology into the art toolbox. *Animal Reproduction Science*, 82–83: 79–85, 2004.
133. PARILLA I, VASQUEZ JM, CUELLO C, GIL MA, ROCA J, DI BERARDINO D, ve ark. Hoechst 33342 stain and UVexposure do not induce genotoxic effect in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction*, 128: 615–21, 2004.
134. SCHENK JL, SUH TK, CRAN DG, SEIDEL JR GE. Cryopreservation of flow-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, 52: 1375–91, 1999.
135. KEELER KD, MACKENZIE NM and DRESSER DW. Flow microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. *Journal Reproduction and Fertility*, 68: 205-212, 1983.
136. CUI KH. Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis. *Molecular Human Reproduction*, 23: 11-20, 1997.
137. JOHNSON LA, FLOOK JP, HAWK HW. Sex pre-selection in rabbits: live birth from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction*, 41: 199–203, 1989.
138. RATH D, JOHNSON LA, DOBRINSKY JR, WELCH GR, NIEMANN H. Production of piglets pre-selected for sex following in vitro fertilization with X and Y Chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology*, 47: 795–800, 1997.
139. SEIDEL JR GE, ALLEN CH, JOHNSON LA, HOLLAND MD, BRINK Z, WELCH GR, ve ark. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 48: 1255–64, 1997
140. BUCHANAN BR, SEIDEL JR GE, MCCUE PM, SCHENK JL, HERICKHOFF LA, SQUIRES EL. Inseminations of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 53: 1333–44, 2000.
141. FUGGER EF, BLACK SH, KEYVANFAR K, SCHULMAN JD. Birth of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 13: 2367–70, 1998.
142. SHARPE JC, EVANS KM. Advances in Flow Cytometry for sperm sexing. *Theriogenology*, 71: 4–10, 2009.
143. SEIDEL GEJr. Overviwe of sexing sperm. *Theriogenology* 68, 443-446, 2007.
144. GARNER DL, SEIDEL GE. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian Journal of Animal Science*, 83: 375-384, 2003.
145. SEIDEL JRGE, SCHENK JL, HERICKHOFF LS, DOYLE SP, BRINK Z, GREEN RD, CRAN DG. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, 52: 1407-1420, 1999.
146. SEIDEL JRGE, SCHENK JL. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science*, 105: 129-138, 2008.
147. DEJARNETTE JM, NEBEL RL, MARSHALL JF, MORENO F, MCCLEARY CR, LENZ W. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 1778-1785, 2008.
148. SUH TK, SCHENK JL, SEIDEL GEJr. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*, 64: 1035–48, 2005.
149. JOHNSON LA, WELCH GR. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, 52: 1323–1341, 1999.
150. BORCHERSEN S, PEACOCK M. Danish A.I. field data with sexed semen *Theriogenology*, 71: 59–63, 2009.
151. BODMER M, JANETT F, HASSIG M, DEN DAAS N, REICHERT P, THUN R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and nonsorted sperm under field conditions. *Theriogenology*, 64: 1647-1655, 2005.

152. ANDERSSON M, TAPONEN J, KOMMERI M ve DAHLBOM M. Pregnancy rates in lactating holstein-friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reproduction of Domestic Animal*, 41: 95-97, 2006.
153. SCHENK JL, CRAN DG, EVERETT RW, SEIDEL GE Jr. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*, 71: 717-728, 2009.
154. SALES JNS, NEVESA KAL, SOUZAA AH, CREPALDIA GA, SALAA RV, M. FOSADO, CAMPOS FILHO EP, DE FARIAC M, SÁ FILHO MF, BARUSELLIA PS. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology*, 76: 427-435, 2011.
155. KURYKIN J, JAAKMA U, WALDMANN A, JALAKAS M, AIDNIK M, MAJAS L, PADRIK P. Low semen dose intracornual insemination of cows at fixed time after PGF2 $\alpha$  treatment or at spontaneous estrus. *Animal Reproduction Science*, 95: 116-124, 2006.
156. FRIJTERS ACJ, MULLAART E, ROELOFS RMG, VAN HOORNE RP, MORENO JF, MORENO O, MERTON JS. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*, 71: 64-67, 2009.
157. SÁ FILHO MF, AYRES H, FERREIRA RM, NICHI M, FOSADO M, CAMPOS FILHO EP, BARUSELLI PS. Strategies to improve pregnancy per insemination using sexed semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology*, 74: 1636-1642, 2010.
158. SANTOS JEP, THATCHER WW, CHEBEL RC, CERRI RLA, GALVÃO KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, 82-83: 513-535, 2004.
159. DEJARNETTE JM, LEACH MA, NEBEL RL, MARSHALL CE, MCCLEARY CR AND MORENO JF. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *Journal of Dairy Science*, 94: 3477-3483, 2011.
160. KESKIN A, YILMAZBAS-MECITOGLU G, GUMEN A, KARAKAYA E, DARICI R, OKUT H. Effect of hCG vs. GnRH at the beginning of the Ovsynch on first ovulation and conception rates in cyclic lactating dairy cows. *Theriogenology*, 74: 602-607, 2010.
161. NORMAN HD, HUTCHISON JL, MILLER RH. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal of Dairy Science*, 93: 3880-3890. 2010.
162. SEIDEL JRGE, SCHENK JL, HERICKHOFF LS, DOYLE SP, BRINK Z, GREEN RD, CRAN DG. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, 52: 1407-1420, 1999.
163. National Research Council. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC, page 3-13, 2001.
164. FERGUSON JD, GALLIGAN DT, THOMSEN N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 77: 2695-2703, 1994.
165. WILTBANK MC, SARTORI R, HERLIHY MM, VASCONCELOS JLM, NASCIMENTO AB, SOUZA AH, AYRES, H, CUNHA AP, KESKIN A, GUENTHER JN, GUMEN A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 76: 1568-1582, 2011.
166. DUBUC J, DUFFIELD TF, LESLIE KE, WALTON JS, LEBLANC SJ. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94: 1339-1346, 2011.
167. HUNTER RHF. Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to exploit new sperm technologies in cattle. *Animal Reproduction Science*, 79: 157-170, 2003.
168. GARNER DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, 65: 943-957, 2006.
169. DOYLE SP, SEIDEL JR, GE, SCHENK JL, HARRICKHOFF LA, CRAN DG, GREEN RD. Artificial insemination of lactating Angus cows with sexed semen. pp. 203-205 in *Proc American Society of Animal Science Provo, Utah*, 1999:

170. SANTOS JEP, THATCHER WW, CHEBEL RC, CERRI RLA, GALVÃO KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, 82–83: 513–535, 2004.
171. DE RENSIS F, SCARAMUZZI RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow-a review. *Theriogenology*, 60: 1139-1151, 2003.
172. HERNÁNDEZ-CERÓN J, CHASE JR, CC, HANSEN PJ. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. *Journal of Dairy Science*, 87: 53-58, 2004.

## TEŞEKKÜR

Bu tez konusunun seçimi, y¼r¼t¼lmesi, yazılmasında ve ayrıca doktora hayatım boyunca maddi ve manevi yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen tez danışmanım Sayın hocam Prof. Dr. Ahmet G¼MEN'e, çalışmanın deneysel kısmında, yazımında yardımcı olan ve her konudaki manevi desteklerinden dolayı Sayın hocam Doę. Dr. Abdulkadir KESKİN ve Doę. Dr. G¼lnaz YILMAZBAŐ-MECİTOğLU'na, bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde yardımcı bulunan Sayın Prof. Dr. Jose P. SANTOS'a, ve bu günlere gelmemi sağlayan aileme desteklerinden dolayı teŐekk¼r¼ bir borę bilirim.

Tez çalışmamda kullandığım hayvan materyalinin temini için TARFAŐ ailesine ve tez çalışmam s¼resince yardımlarını esirgemeyen çalışanlarına desteklerinden dolayı teŐekk¼r¼ ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimlerimi Adana’da tamamladım. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’ne 2002 yılında girmeyi hak kazandım. 2007 yılında fakülteden mezun oldum ve 2008 yılında aynı fakülte’nin Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimime başladım. 2010 yılında U.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nden Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı adına Araştırma Görevlisi kadrosu aldım. Halen aynı görevi devam ettirmekteyim.

## ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

## TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

YAZAR ADI SOYADI	Ebru KARAKAYA
Tez Adı	Sütçü İneklerde Cinsiyeti Belirlenmiş Spermının Kullanımı
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Doğum ve Jinekoloji
Tez Türü	Araştırma
Tez Danışma(lar)ı	Prof.Dr. Ahmet GÜMEN
Çoğaltma (Fotokopi Çekim)İzni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum. <input type="checkbox"/> Tezimden sadece içindekiler,özet, kaynakça ve içeriğinin %10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum. <input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum.
Yayımlama İzni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum. <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum. 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmırsa izin vermiyorum.

Hazırlamış olduğum tezimin yukarda belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: .../.../20..

İmza: