

Sığırlarda Swim-Up Yöntemi ile Sperma Separasyonunun Embriyo Cinsiyet Oranına Etkisi*

Bilal AKYÜZ¹, Ömer Orkun DEMİRAL², Murat ABAY³, Burcu ÜSTÜNER⁴

¹ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik ABD, Kocasinan, Kayseri-TÜRKİYE

² Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama ABD, Kocasinan, Kayseri-TÜRKİYE

³ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji ABD, Kocasinan, Kayseri-TÜRKİYE

⁴ Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama ABD, Görükle Kampüsü, Bursa-TÜRKİYE

Özet: Sunulan çalışmada sığır spermasında uygulanan farklı swim-up inkübasyon sürelerinin in vitro üretilen embriyolarda cinsiyet oranına etkisi araştırılmıştır. İn vitro mature edilen oositler üç gruba ayrıldı. Birinci, ikinci ve üçüncü gruptaki mature oositler sırasıyla 5, 10 ve 15 dakika süre ile swim-up işlemi yapılan spermalar ile fertilize edildi. Altmış dakika süre ile inkübasyon yapılan spermalarla yapılan tohumlamadan elde edilen embriyolar kontrol grubu olarak kullanıldı. Her bir gruptan elde edilen 10 embriyoda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak cinsiyet (erkek oranı) oranı belirlendi. İlk grupta hiç erkek embriyo elde edilemedi. İkinci grupta bir adet erkek embriyo elde edildi. Üçüncü ve kontrol gruplarında ise iki adet erkek embriyo elde edildi. Sonuç olarak bu çalışma sonunda in vitro embriyo üretiminde farklı sürelerde swim-up yapılmasının sığırlarda yavru cinsiyet oranı üzerine etkisi bulunamamıştır. Daha doğru sonuçların alınması için yeni in vivo ve in vitro çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cinsiyet preseleksiyonu, embriyo, sığır, swim-up

Effects of Sperm Separation by Swim-Up Method on Bovine Embryo Sex Ratio

Summary: This study investigates the effects of different swim-up incubation duration on the sex ratios of bovine embryos harvested in vitro. In vitro matured oocytes were divided into three groups. The mature oocytes in the first, second and third groups were fertilized with sperms processed with swim-up method for 5, 10 and 15 minutes respectively. The embryos produced through fertilization of sperms incubated for 60 minutes were used as the control group. Through polymerase chain reaction (PCR) method, the sex ratios (male ratio) of 10 embryos obtained from each group were determined. In the first group, there was no male embryo to have been obtained. In the second group one male embryo was obtained. In the third group and the control group, there were two male embryos. In conclusion, at the end of this study, applying swim-up methods for different duration for in vitro embryo production has been seen to have no effect on the sex ratios of bovine embryos. To obtain more conclusive result, more in vivo and in vitro studies are required.

Key Words: Cattle, embryo, sex preselection, swim-up

Giriş

Yavru cinsiyet oranı; erkeklerin dişilere oranı, erkek sayısının her 100 dişi yavruya oranı veya erkek yavru yüzdesi olarak tanımlanabilmektedir. Bununla birlikte; birincil, ikincil ve üçüncül cinsiyet oranı olarak da tanımlanmaktadır. Birincil cinsiyet oranı, fertilizasyon anında meydana gelen cinsiyet oranı, ikincil cinsiyet oranı ise doğum anında erkeklerin dişilere oranı ve üçüncül cinsiyet oranı ise doğum sonrası yavruların belli bir yaşa geldikleri andaki cinsiyet oranları olarak tanımlanmaktadır (10).

Çok eski yıllardan bu yana insanlar yavru cinsiyetini belirleme konusuna ilgi duymuş ve bu amaçla tek taraflı orşidektomi gibi ampirik yöntemlerin de bulunduğu bir çok yöntemin denendiği bilinmektedir. Gelişen teknolojiye paralel olarak insanlarda cinsiyet tayini, özellikle X kromozomuna bağlı olarak ortaya çıkabilen genetik hastalıkların eradikasyonu ve cinsiyet oranlarını dengelemek amacıyla yapılmaktadır (26, 27).

İnsanlarda farklı sperma manipülasyonlarının yavru cinsiyet oranları üzerine etkinliği hakkında farklı bildirimler mevcuttur. X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonların yüzme kabiliyetlerinin farklı olmasına dayalı yöntemlerin insanlarda yavru cinsiyetinin önceden tahmininde etkili olduğu bildirilmiştir (20).

Memelilerde, cinsiyetin mümkün olduğu kadar erken belirlenmesi için karyotip analizi, erkek spesifik antijen analizi, erkek ve dişi embriyolar arasındaki metabolik farklılıkların belirlenmesi, ultrasonografi

Geliş Tarihi/Submission Date : 16.05.2011

Kabul Tarihi/Accepted Date : 01.08.2011

* EUBAP-VA-06-04 Proje Koduyla Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenen "Sığırlarda Swim-Up Yönteminin Embriyo Cinsiyet Oranına Etkisi" Adlı Projeden Özetlenmiştir.

kullanılarak embriyolarda genital çıkıntının görülmesi ile cinsiyetin belirlenmesi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi yöntemler kullanılmaktadır (3, 9).

Sığırlarda yavru cinsiyet oranları üzerine yapılan in vitro çalışmalarda çoğunlukla fertilizasyon süresi, maturasyon süresi gibi faktörler araştırılmıştır (11). Oositlerin, maturasyon aşamasından sonra farklı zamanlarda (birinci polar cisimciğin atılmasından hemen sonra ve sekiz saat sonra) fertilize edilmesi ile elde edilen embriyoların cinsiyet oranları arasında (%50 ortalama cinsiyet dağılımına oranla) istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildiği bildirilmiştir (22). Ayrıca, cinsiyet oranlarının tohumlama ve ilk yarıklanma (cleavage) aşamasının zamanına bağlı olduğu bildirilmiştir. Buna benzer nitelikte, dondurulmuş boğa sperması ile 6 saatlik inkübasyon sonunda 9, 12 ve 18 saatlere oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde erkek embriyo elde edildiği bildirilmiştir (22).

Sığır yetiştiriciliğinde, yavrunun cinsiyetinin doğum öncesinde ve hatta embriyonal yaşamın ilk aşamalarında belirlenebilmesi işletmelerin kar payını arttıracaktır (8). Ayrıca doğacak yavru cinsiyetinin önceden belirlenmesi ıslah çalışmalarında önemli bir yer tutan ve uzun zaman isteyen, erkek damızlık adaylarının projeni test çalışmalarında hem kaynak hem de zaman kaybının engellenmesinde önemli yer tutabilecektir (15).

Son yıllarda, memelilerde X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoaların preseleksiyonu amacıyla pek çok değişik yöntem geliştirilmiştir. Bu teknikler albümin ve percoll gradient seperasyonları, sefadeks kolonları, swim-up/modifiye swim-up prosedürleri ve flow sitometridir. Hayvanlarda preseleksiyon amacıyla en başarılı tekniğin flow sitometri olduğunun bildirilmesine rağmen, bu sistem spermatozoaların boyanması ve özel bir ışık sisteminin (double-flourecent) kullanılması nedeniyle oldukça mutajeniktir ve küçü yavruların doğmasına neden olabilmektedir (17). Bu yöntemle tavşanlarda yapılan bir çalışmada, ayrılan spermalarla yapılan tohumlamalarda erkek yavru elde edilmesinde %81, dişi yavru elde edilmesinde ise %86 başarı elde edildiği bildirilmiştir (17). Swim-up prosedürü pahalı laboratuvar ve ekipman gerektirmemesi nedeniyle daha pratik ve ekonomik bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (9). Ayrıca diğer yöntemler hem pahalı hem de işlem sonrası spermanın motilitesi düşmektedir (21).

Swim-up prosedürü değişik kromozomal yapıya sahip spermatozoonların yüzme kabiliyetlerinin farklı olması ilkesini temel alarak yavru cinsiyetinin fertilizasyon sırasında belirlenmesi esasına dayalıdır.

Bu yöntemin yavru cinsiyet oranlarına etkisi hakkında farklı görüşler vardır. Khatemee ve ark. (20) tarafından insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada swim-up tekniği uygulanarak elde edilen spermalarla yapılan tohumlamalardan doğan oranla sırasıyla %86.7 ve %89.7 daha yüksek olduklarını bildirilmiştir. Ancak, düvelerde yapılan çalışmalarda ön seleksiyonu yapılmış spermalar ile yapılan tohumlamalardan elde edilen yavruların cinsiyet oranları ile kontrol gruplarından elde edilen yavruların cinsiyet oranları ile karşılaştırıldığında, yavruların cinsiyet oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir farka rastlanılmadığı bildirilmiştir (17, 26).

Bu çalışmada, boğa spermasında swim-up prosedürünün sürelerini değiştirerek fertilizasyon öncesi X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonların ayrılıp ayrılmadığını (preseleksiyon), bu spermalar kullanılarak yapılan in vitro fertilizasyondan elde edilen embriyoların cinsiyetlerinin PZR tekniği ile belirlenerek araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

In Vitro Maturasyon (IVM): Çalışmada kullanılacak ovaryumlar mezbahada kesilen ineklerden toplandı. Kesim sonunda toplanan ovaryumlar $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de %0.9 NaCl içeren termoslarda laboratuvara taşındı. Laboratuara getirilen ovaryumlar $30-35^\circ\text{C}$ 'de çeşme suyuyla yıkandı. Oositler 2-8 mm'lik folliküllerden 18 gauge'luk iğnelerle vakum sistemi kullanılarak toplandı. Aspire edilen folliküller sıvı, 100 mm'lik petri kaplarında ısıtma tablalı stereo mikroskopta incelendi. Oositlerden en az üç sıra kumulus hücre katmanına ve homojen sitoplazmaya sahip olanlar seçilerek 3 kez TL-HEPES'te yıkandı ve mature edilmek üzere her 10 oosit mineral yağ ile kaplanmış $50 \mu\text{l}$ 'lik doku kültürü medyumuna (TCM-199) aktarıldı. TCM-199 medyumuna kullanılacağı gün 0.2 mM Na-piruvat, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ follikül stimüle edici hormon (FSH), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ luteinleştirici hormon (LH), %10'luk fetal buzağı serumu (FCS; Gibco/Invitrogen) ve 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamisin ilave edildi. Maturasyon damlalarına aktarılan oositler 39°C 'de %5 CO_2 'li etüvde 24 saat boyunca inkübe edildi. Bu inkübasyon koşulları in vitro fertilizasyon (IVF) ve in vitro kültür (IVC) içinde aynı şekilde uygulandı.

Spermanın Hazırlanması ve In Vitro Fertilizasyon (IVF): Dondurulmuş boğa sperması 35°C 'de 30 saniye sürede çözündürüldü. Çözüm sonunda, spermalar Tyroe's Albumine Lactate Pyruvate (TALP) solüsyonu ile 1/1 (v/v) sulandırılarak santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant

atıldıktan sonra dipte kalan kısım tekrar 1/1 oranında TALP solüsyonu ile sulandırılarak yıkama işlemi tamamlandı. Yıkama işlemi yapılan spermalar 2 ml sperm TALP (sp-TALP) içeren tüplerin tabanına yerleştirilerek 5, 10, 15 ve 60 (kontrol grubu) dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda sperm hücrelerinin yüzdüğü üst 1 ml'lik kısım alındı. Sperma konsantrasyonu hemositometrik yöntem ile belirlendi. Sperma 50×10^6 /ml olacak şekilde TL-HEPES ile sulandırıldı. Mature edilen oositler 2 kez TL-HEPES'te yıkandı ve 10'lu oosit grupları mineral yağ ile kaplanmış 44 µl'lik fertilizasyon damlalarına transfer edildi. Fertilizasyon medyumunu taze olarak 0.2 mM Napiruvat, 6mg/ml yağ asidinden ari sığır serum albumini (BSA-FAF) ve 25 µg/ml gentamisin ilave edilen modifiye edilmiş Tyrode bazlı medyumdur. Mature edilen oositlerin aktarıldığı her bir fertilizasyon damlasına, her damlada final konsantrasyonu 1.0×10^6 /ml olacak şekilde 2 µl sperma süspansiyonu, 2 µl PHE (20 µM penisilamin, 10 µM hipotaurin ve 1 µM epinefrin) ve 2 µl heparin (2 µg/ml) ilave edildi. Oositler ve sperma 24 saat birlikte inkübe edildi.

İn Vitro Kültür (IVC): Fertilizasyondan 24 saat sonra, 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine aktarılan embriyolar en yüksek devirde 3 dakika boyunca kumulus hücrelerini uzaklaştırmak amacıyla vortekslendi. Kumulus hücreleri uzaklaştırılan embriyolar 3 kez TL-HEPES ile yıkanarak 20-30'luk gruplar halinde mineral yağ ile kaplanmış 50 µl'lik Charles Rosenkrans 1aa (CR1aa) kültür medyumuna aktarıldı ve inkübatöre kaldırıldı. Kültürün 3. gününde 4-8 hücreli embriyolar cinsiyet oranlarının belirlenmesi için her bir grup en az 10 adet olacak şekilde rastgele toplandı. Elde edilen embriyolar ultra distile su içerisinde donduruldu ve cinsiyet tayini aşamasına kadar saklandı.

DNA İzolasyonu: Elde edilen embriyolardan DNA, Lopes ve ark. (23) tarafından önerilen kaynatma yöntemi ile izole edildi. Bu yöntemle embriyolar 98°C'de 10 dakika tutularak DNA izolasyonu yapıldı. İşlem sonunda elde edilen genomik DNA'ların bulunduğu düşünülen üstteki sıvıdan 5 µl alınarak PZR işleminde kullanıldı.

Çalışmada Kullanılan Primerler: Sığır fötüs ve embriyolarının cinsiyet tayinlerinde 20 bç uzunluğunda Y kromozomuna özgü ve PZR işleminin çalışıp/çalışmadığının kontrolü için kontrol olmak üzere iki primer seti kullanıldı. Kullanılan primerlerin baz dizinleri: Y-kromozomuna özgü primerler, 5'-TGG ACA TTG CCA CAA CCA TT-3' ve 5'-GCT GAA TGC ACT GAG AGA GA-3'; kontrol amacıyla kullanılan primerler ise 5'-GCC

CAA GTT GCT AAG CAC TC-3' ve 5'-GCA GAA CTA GAC TTC GGA GC-3' dir.

PZR İşlemi: Reaksiyon PZR cihazında (termal cyler) yapıldı. PZR reaksiyonu her örnek için: 10 µl steril dH_2O , 10 µl 10XPZR buffer solüsyonu, 5 µl 25 mM $MgCl_2$, 50 mM dNTP mix 5 µl, 5µl 0.2 mM primer (her birinden 5 µl), 2 U (5 U/ µl) Taq polimeraz ve 5 µl genomik DNA olacak şekilde hazırlanan karışımla yapıldı. Hazırlanan karışımın PZR cihazında yerleştirilerek önce 94°C'de 5 dakika tutulduktan sonra her bir döngüsü; 94°C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika olacak şekilde 50 döngü yapıldı. Son döngünün bitiminde örnekler 72°C'de 10 dakika tutularak reaksiyona son verildi.

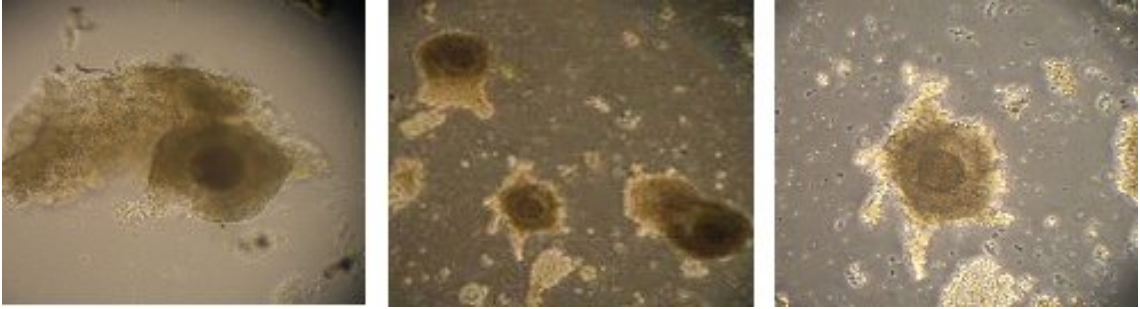
İstatistik Analiz: Cinsiyet dağılımları bakımından kontrol grubuna göre deneme gruplarının her biri arasındaki istatistik değerlendirmeler Ki-kare (Fisher Exact test) kullanılarak yapıldı.

Bulgular

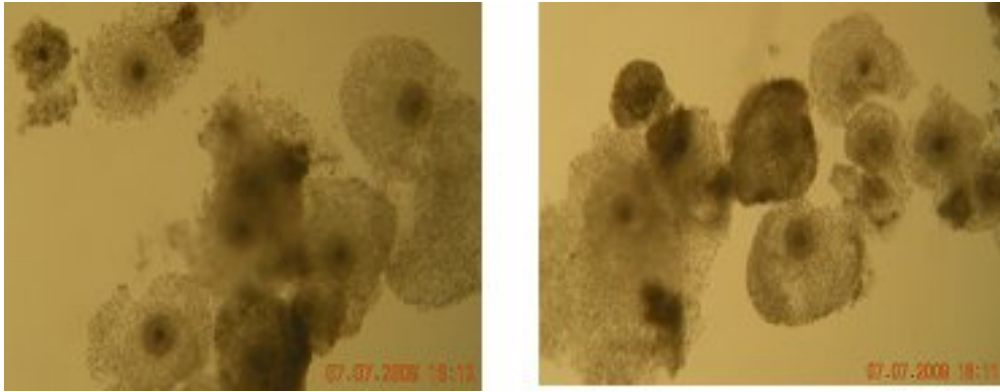
İn Vitro Fertilizasyon ve Embriyo Eldesi: Sunulan çalışmada, her bir uygulama grubunun oluşturulmasında kullanılan mature edilmiş oosit sayısı sırasıyla 21, 20 ve 22'dir. İn vitro fertilizasyon sonunda 48. saatte gruplarda bölünme elde edilmiş embriyo sayıları (2, 4 ve 8 hücreli) ise birinci grupta 14 (%66.7), ikinci grupta 10 (%50) ve üçüncü grupta 18 (%81.8) olarak belirlendi. Embriyo kültürü sonunda (48. saatte) cinsiyetin belirlenmesi amacıyla her bir gruptan; rasgele seçilen 10 embriyo ultra saf su içerisinde konularak PZR ile embriyoların cinsiyetleri belirlenene kadar saklandı. Yapılan çalışmada her bir grup için rasgele seçilen 10 embriyoda cinsiyet tayini yapıldı.

PZR İşlemi: Çalışma materyalini oluşturan 5, 10 ve 15 dakikalık swim up yöntemi uygulanan spermaların kullanılması ile elde edilen embriyolar ile 60 dakikalık swim up işleminin yapıldığı kontrol grubunu oluşturan spermaların kullanılmasıyla elde edilen embriyoların cinsiyetleri PZR yöntemiyle belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntüldü.

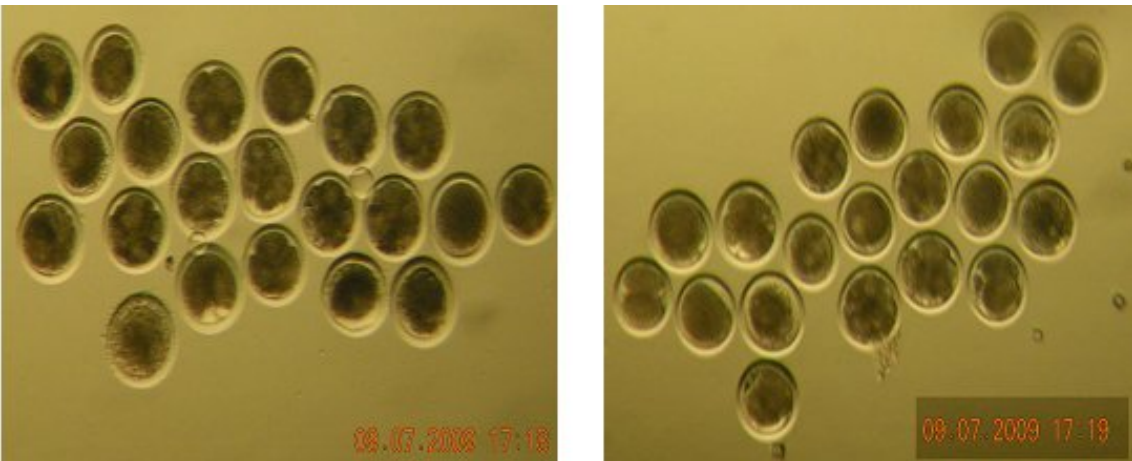
İşlem sonunda kontrol grubunu oluşturan 10 embriyonun iki tanesinin erkek diğerlerinin ise dişi oldukları belirlendi. Erkek embriyolarda 141 ve 216 baz çifti (bç) uzunluğunda iki bant, dişi embriyolarda ise 216 bç'lik tek bant elde edildi. Beş dakikalık swim up işleminin yapıldığı grupta hiç erkek embriyoya rastlanılmamışken, 10 dakikalık swim up işleminin yapıldığı grupta bir, 15 dakikalık swim up işleminin yapıldığı grupta ise iki embriyonun



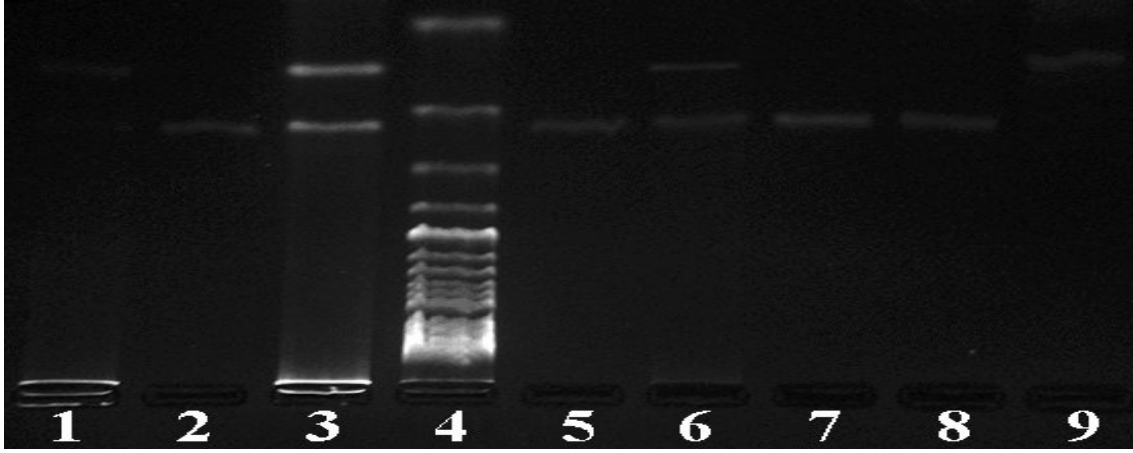
Resim 1. Aspirasyon ile elde edilen oositler



Resim 2. Oosit maturasyonu (kumulus ekspansiyonu)



Resim 3. Fertilizasyon sonrası 2, 4 ve 8 blastomerli embriyolar



Resim 4. PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri (4: 100 bç'lik DNA merdiveni; 2: dişi kontrol; 3: erkek kontrol; 1, 6, 9: erkek embriyolara ait PZR ürünleri; 5, 7, 8: dişi embriyolara ait PZR ürünleri)

Tablo 1. Farklı swim-up uygulamalarından elde edilen embriyoların cinsiyet oranları

Deneme Grupları	Cinsiyet		Toplam
	Erkek	Dişi	
5 dakika	n	0	10
	%	0	100
10 dakika	n	1	9
	%	10	90
15 dakika	n	2	8
	%	20	80
Kontrol	n	2	8
	%	20	80

erkek olduğu diğer embriyoların ise dişi oldukları belirlendi. Fischer Exact testi ile cinsiyet dağılımları bakımından kontrol grubuna göre deneme gruplarının her biri arasındaki istatistik değerlendirme sonucuna göre; kontrol grubunda elde edilen embriyoların cinsiyetleri ile 5, 10 ve 15 dakikalık swim-up deneme gruplarından elde edilen embriyo cinsiyetleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($P>0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Sunulan bu çalışma ile farklı cinsiyet kromozomları taşıyan spermatozoonların sahip olduğu fiziksel (ağırlık) ve fizyolojik (hareket) özelliklerin kullanıl-

ması ile yapılacak tohumlamalarda elde edilecek primer cinsiyet oranlarının farklı olması gerektiği hipotezinin test edilmesi amaçlanmıştır. X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonların yüzme hızlarının farklı olmasından dolayı yavru cinsiyet oranlarının değiştirilebileceğine dair başarılı sonuçlar bildirilmiştir (20).

Süt sığırın yetiştiriciliğinde, her yıl çeşitli nedenlerden dolayı ayıklanarak sürüden çıkartılan hayvanların yerine yenilerinin konulması gereklidir. Bu da iki yolla temin edilebilir; biricisi, başka işletmelerden hayvan temini; ikincisi ise, her yıl işletmede doğan hayvanların, ayıklanan hayvanların yerine konmasıdır. Sürüye dışarıdan hayvan alımı, alınan hayvanların genetik yapılarının bilinmemesi, hasta-

lık nakli ve sürüye dışarıdan hayvan alımının maliyetinin yüksekliği gibi nedenlerden dolayı tercih edilen bir yöntem değildir. Diğer taraftan, işletmedeki hayvanların dişi yavrularının sürü büyüklüğünün sabit kalması için kullanılması hem daha ucuzdur hem de daha az risk taşır. Bu nedenle özellikle süt sığırı işletmelerinde her yıl doğacak yavruların önemli bir kısmının dişi olması istenir. Diğer taraftan pazar gereklerine göre et fiyatlarının yüksek olduğu dönemlerde ise doğan yavruların çoğunun erkek olması ve besiyeye alınması istenir. Bu sebeplerden dolayı sürülerde doğacak yavruların cinsiyet oranlarının manipüle edilmesi ve mümkünse istenen cinsiyetteki yavru sayısının artırılması yetiştiriciler için önemlidir (8, 25).

Süt sığırı yetiştiriciliğinde suni tohumlama ve özellikle embriyo transferi uygulamalarının bir örnek sürü oluşturulması ve ıslah çalışmalarının sürelerini kısaltmadaki önemi son yıllarda hızla artmaktadır (18). Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde ıslah çalışmalarında hızlı bir genetik ilerlemenin sağlanması için her geçen gün daha etkili ve daha kısa sürede sonuç verebilecek yöntemler üzerine çalışılmaktadır. Cinsiyet preseleksiyonu, işletmelerde ıslah ve genetik ilerlemenin hız kazanması açısından en önemli kilometre taşlarından biridir. Memelilerde yavru cinsiyetinin tahmini ve cinsiyet preseleksiyonu üzerine yapılan çalışmalar 2500 yıl öncesine kadar dayanmaktadır. Cinsiyet preseleksiyonu işlemleri özellikle insanlarda cinsiyete bağlı kalıtsal hastalıkların engellenmesi amacıyla yapılmaya başlanmış ve geliştirilmiş bir uygulamadır. Yapılan çalışmalar ile yavru cinsiyet oranları üzerine etkin faktörler araştırılmıştır. Tüm cinsiyet preseleksiyonu uygulamalarının temeli X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonların fiziksel ve fizyolojik özellikleri arasındaki farkların kullanılması temeline dayanmaktadır (16).

Uzun süredir prenatal dönemde embriyo cinsiyetinin belirlenmesi sığır yetiştiriciliğinin önemli amaçlarından biri olmuştur. Burada iki yaklaşım mevcuttur. İleri döllenme sonucu oluşan embriyolarda cinsiyet belirlenmesi, diğeri ise daha embriyo oluşmadan spermalara müdahale ederek oluşacak embriyolarda cinsiyetlerin önceden belirlenmesidir (19).

Sığır yetiştiriciliğinde embriyo transferi ve moleküller genetik yöntemlerin birleştirilmesi, üreme ve yetiştiriciliğin etkinliğini önemli ölçüde iyileştirmiştir (13). Doğal şartlarda bir inekten reproduktif yaşamı boyunca beş veya altı yavru alınabilirken bu sayı süper ovulasyon ve embriyo transferiyle artırılabilir (12). Veteriner reproduksiyon alanındaki son gelişmeler, embriyolara uterusu implante olmadan önce müdahale edilmesini olası kılmıştır.

Sığırlarda rutin in vitro fertilizasyon uygulamalarında swim-up yöntemi uygulaması yaklaşık bir saatlik inkubasyonu gerektirmektedir (5, 6). Swim-up uygulamalarında, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonların; ağırlık farkı veya metabolizma hızlarının farklı olması nedeniyle yüzme hızlarının farklı olması hipotezine dayalı olarak memelilerde yapılan bazı in vitro ve in vivo çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir (7, 10, 20, 24).

Demiral ve ark. (10) tavşanlarda swim-up işlemi uygulayarak elde ettikleri spermalarla yapılan tohumlamalarda; 15 dakikalık swim-up uygulanan spermalarla yapılan tohumlamalarla %33.30, 30 dakikalık inkubasyon ile elde edilen spermalarla yapılan tohumlamalarla %22.20, 45 dakikalık inkubasyonla elde edilen spermalarla yapılan tohumlamalardan ise %50 oranında gebelik elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada birinci grupta fertilizasyon oluşma oranı %66.66, ikinci grupta %50 ve üçüncü grupta ise %81.81 olarak belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar uygulanan bu yöntemle elde edilen yavru cinsiyetlerinin değiştirilebileceğini bildirmişlerdir (10). Sunulan çalışmada elde edilen sonuçlara göre sığırlarda, in vitro embriyo üretiminde yapılan farklı inkubasyon süreleri uygulanan spermalarla yapılan in vitro fertilizasyon sonucu elde edilen embriyoların cinsiyetleri arasında istatistiksel bir farklılığın oluşmadığı belirlenmiştir. Ancak örnek sayısının artırıldığı yeni in vitro ve in vivo çalışmalarla daha kesin sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir.

Buna karşılık; insanlarda ovulasyon senkronizasyonu ve swim-up yönteminin birlikte kullanıldığı bir çalışmada cinsiyet oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde değiştirilebildiği bildirilmiştir (20). Bunu destekler nitelikte, tavşanlarda yapılan farklı sürelerde swim-up uygulaması sonunda elde edilen yavruların cinsiyet oranları arasında istatistiksel olarak fark bulunduğu bildirilmiştir (10). Ancak insanlarda 15, 30, 45 ve 60 dakikalık inkubasyonlarla yapılan swim-up uygulamasından sonra 15 ve 60 dakikalık uygulamalardan elde edilen yavruların cinsiyetlerinde bir fark belirlenmediği, 30 ve 45 dakikalık uygulamalardan elde edilen yavruların cinsiyetlerinde bir değişim olduğu; ancak, bu değişiminde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir (7). Yapılan bu çalışmada da in vitro fertilizasyon ile elde edilen sığır embriyolarının cinsiyetleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniğinin keşfi sayesinde erkek cinsiyet kromozomuna özel primerler kullanılarak embriyoların cinsiyetlerinin belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir araç ol-

muştur (14). Alınan biyopsiyi takiben yapılan PZR ile embriyo cinsiyetlerinin iki saatte ve % 93-98 doğrulukta belirlenebileceği bildirilmiştir (13). PZR ile yapılan cinsiyet belirleme işlemi biri amelogen ve ZFY genleri gibi Y kromozomuna özel diğeri ise her iki cinsiyet için ortak olan lokusların belirlenmesine olanak veren iki primer seti kullanılarak yapılır (1, 2). Sığırlar ve diğ er türlerde embriyoların cinsiyetlerinin belirlenmesi için kullanılacak genomik DNA ya 2-4 blastomer kadar küçük embriyolardan ya da fötal sıvılardan elde edilebilir (2). Ancak cinsiyet belirlenmesi için dondurulmuş embriyo kullanılmasının, embriyoların canlılığını azaltabileceği ve amnion sıvısı alınımının ise, gebeliğin devamını ve anne sağlığını tehdit edebileceği bildirilmektedir (4).

İnsan (20) ve tavşanlarda (10) yapılan swim-up yöntemi ve embriyo cinsiyeti arasındaki ilişki göz önünde tutulduğ unda çiftlik hayvanlarında bu yöntemin uygulanabilirliği hakkında daha çok çalışma yapılması gerektiğini düşünölmektedir. Yapılacak yeni çalışmalarla farklı swim-up uygulamaları ile elde edilecek embriyoların cinsiyet oranlarının değıştirilebileceği düşünölmektedir.

Yapılan bu çalışmada farklı sürelerde swim-up işleminin uygulandığı spermalar kullanılarak yapılan in vitro fertilizasyon ile elde edilen embriyolardan kaynatma yöntemi ile başarılı bir şekilde DNA izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lar kullanılarak yapılan PZR işlemi sonunda embriyoların cinsiyetleri beş saat içinde belirlenebilmiştir. Buda şu anda çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde pek fazla kullanım alanı olmamasına rağmen, yakın gelecekte PZR yöntemi kullanılarak gerek transfer edilecek embriyoların gerekse uterus içindeki embriyoların cinsiyetlerinin belirlenmesi işlemlerinin yaygınlaşacağına dair inancı güçlendirmektedir.

Kaynaklar

1. Almodin CG, Moron AF, Kulay LJr, Minguetti-Câmara VC, Moraes AC, Torloni MR, 2005. A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. *Fertil Steril*, 84(4): 895-899.
2. Alves BCA, Hossepian de Lima VFM, Teixeira CM, Moreira-Filho CA, 2003. Use of primers derived from a new sequence of the bovine Y chromosome for sexing *Bos taurus* and *Bos indicus* embryos. *Theriogenology*, 59(5-6): 1415-1419.
3. Bredbacka P, Bredbacka K, Peippo J, 1991. Experiences of using PCR for sexing bovine embryos. *Reprod Dom Anim*, 26: 75-77.
4. Bredbacka P, 2001. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology*, 55: 23-34.
5. Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, Alberio RH, 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*, 66: 1185-1193.
6. Chohan KR, Hunter AG, 2004. In vitro maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology*, 61: 373-380.
7. De Jonge CJ, Flaherty SP, Barnes AM, Swann NJ, Matthews CD, 1997. Failure of multitube sperm swim-up for sex preselection. *Fertil Steril*, 67(6): 1109-1114.
8. Demiral ÖO, Ün M, Canoğ lu E, Abay M, Bekyürek T, Öztürk A, 2007. Buzağı cinsiyet oranı üzerine boğanın etkisi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 4(2): 61-63.
9. Demiral ÖO, Ün M, Abay M, Bekyürek T, 2007. The effect of artificial insemination timing on the sex ratio of offspring and fertility in dairy cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 31: 21-24.
10. Demiral ÖO, Bekyürek T, Ün M, Abay M, Atabay NÖ, 2007. Tavşanlarda swim-up yönteminin yavru cinsiyet oranları üzerine etkisi. *Erciyes Üniv Sağlık Bil Derg* 16(3): 145-151.
11. Dominko T, First NL, 1997. Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. *Theriogenology*, 47: 1041-1050.
12. Ekici H, Turan N, Sontas BH, Helps CR, Senunver A, Yılmaz H, 2006. Sex determination of bovine embryos using polymerase chain reaction (PCR). *Revue Méd Vét*, 157: 441-444.
13. Hasler JF, Cardey E, Stokes JE, Bredbacka P, 2002. Non-electrophoretic PCR sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology*, 58: 1457-1469.

14. Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Hirano T, Sugimoto Y, Kobayashi N, Inaba M, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A, 2004. Genetic diagnosis of claudin-16 deficiency and sex determination in bovine preimplantation embryos. *J Reprod Dev*, 50 (6): 613-618.
15. Hohenboken WD, 1999. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology*, 52: 1421-1433.
16. Hylan DA, 2007. In utero and in vitro sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries. Thesis, Doctor of Philosophy. Louisiana State University, Department of Animal Science (Animal, Dairy, & Poultry Sciences). Alexandria.
17. Johnson LA, Flok JP, Hawk HW, 1989. Sex preselection in rabbits live births from X and % sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod*, 41: 199-203.
18. Kageyama S, Yoshida I, Kawakura K, Chikuni K, 2004. A novel repeated sequence located on the bovine, Y chromosome: its application to rapid and precise embryo sexing by PCR. *J Vet Med Sci*, 66(5): 509-514.
19. Kamimura S, Nishiyama N, Ookutsu S, Goto K, Hamana K, 1997. Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. *Theriogenology*, 47: 1563-1569.
20. Khatamee MA, Horn SR, Alvin W, Farooq T, Jaffe SB, Jewelewicz R, 1999. A Controlled study for gender selection Using swim up separation. *Gynecol Obstet Invest*, 48: 7-13.
21. Kaygısız A, Vanlı Y, Çakmak L, 2003. Siyah alaca sığırlarda cinsiyet oranını ilişkin genetik ve fenotipik parametre tahminleri. *Üçüncü GAP Tarım Kongresi*, Ekim, 02-03, Şanlıurfa-Türkiye.
22. Kochbar HS, Kochbar KP, Basrur PK, King WA, 2003. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, 77: 33-49.
23. Lopes RFF, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL, 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*, 56: 1383-1392.
24. Manzur A, Cárdenas I, Macaya R, Almendra C, Gajardo G, Bianchi M, Durruty G, 2004. Unbalanced sex ratio in newborns obtained by intrauterine inseminations. International Congress Series, 1271: 341– 344.
25. Pala A, Tölü C, 2010. Keçilerde oğlak cinsiyetine etkili faktörlerin belirlenmesi. Erişim Tarihi: 19 Mart 2010. Erşim: http://4uzbk.sdu.edu.tr/4UZBK/HYB/4UZBK_008.pdf.
26. Seidel GE, Sche JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Gren RD, Cran DG, 1999. Insemination of heifer with sexed sperm. *Theriogenology*, 52: 1407-1420.
27. Sureau C, 1999. Gender selection: a crime against humanity or the exercise of fundamental right? *Hum Reprod*, 14(4): 867-868.

Yazışma Adresi :

Doç. Dr. Bilal AKYÜZ
 Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 Genetik Anabilim Dalı, Mevlana Mah.
 Barış Manço Cad. No. 1
 Kocasinan/KAYSERİ
 Tel: 0352 3380006-175
 E-mail: bakyuz@erciyes.edu.tr