Enes SERİM

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ
ANABİLİM DALI

SAĞMAL SÜTÇÜ İNEKLERDE CİNSİYETİ BELİRLENMİŞ SPERMANIN KULLANIMI

ENES SERİM

DOKTORA TEZİ

BURSA-2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

SAĞMAL SÜTÇÜ İNEKLERDE CİNSİYETİ BELİRLENMİŞ SPERMANIN KULLANIMI

ENES SERİM

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Gülnaz YILMAZBAŞ-MECİTOĞLU

BURSA-2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "**Sağmal Sütçü İneklerde Cinsiyeti Belirlenmiş Spermanın Kullanımı**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Enes SERİM
../../….
İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Enes SERİM

Anabilim Dalı: Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Sağmal Sütçü İneklerde Cinsiyeti Belirlenmiş Spermanın Kullanımı

ÖZELLİKLER	**UYGUNDUR**	**UYGUN DEĞİLDİR**	**AÇIKLAMA**
Tezin Boyutları	●	❑	
Dış Kapak Sayfası	●	❑	
İç Kapak Sayfası	●	❑	
Kabul Onay Sayfası	●	❑	
Sayfa Düzeni	●	❑	
İçindekiler Sayfası	●	❑	
Yazı Karakteri	●	❑	
Satır Aralıkları	●	❑	
Başlıklar	●	❑	
Sayfa Numaraları	●	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	●	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	●	❑	
Kaynaklar	●	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr.
Gülnaz YILMAZBAŞ-MECİTOĞLU

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYAN……II

KABUL ONAY……III

TEZ KONTROL BEYAN FORMU……...IV

İÇİNDEKİLER……..V

TÜRKÇE ÖZET……..……..VIII

İNGİLİZCE ÖZET……...……...IX

1. GİRİŞ……...1

2. GENEL BİLGİLER……4

2.1. Cinsiyeti Belirlenmiş Spermanın Süt Sığırı Yetiştiriciliğindeki Önemi...……4

2.2. Dünden Bu Güne Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Teknolojisi……...…….5

2.2.1. Flow Sitometri Tekniği……...….....8

2.3. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Kullanımının Avantajları…..……...…….11

2.4. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Kullanımının Dezavantajları……....…….…..12

2.5. Sütçü İneklerde Üreme Fizyolojisi…….……...……..13

2.5.1. Östrus Siklusu……..…….....13

2.5.2. Östrus Siklusunun Hormonal Düzeni……...……13

2.5.3. Östrus Siklusu Boyunca Foliküler Dinamik……..…….…..…14

2.5.4. Östrus Siklusunda Korpus Luteumun Şekillenmesi ve Görevleri……...….16

2.5.6. Östrus Siklusunun Evreleri……...……17

2.5.6.1. Proöstrus ……..……...……17

2.5.6.2. Östrus……...…….….17

2.5.6.3. Metöstrus…….…….…..18

2.5.6.4. Diöstrus……...…..…18

2.6. Sütçü İneklerde Reprodüktif Yönetim……..…….……..18

2.6.1. Östrus Tespiti……..……..18

2.6.1.1. Sürü Bazında Kullanılan Östrus Tespit Yöntemleri……..…19

2.6.1.1.1. Kayıtlar ve Gözlem Yoluyla Östrus Tespiti……19

2.6.1.1.2. Pedometre ile Östrus Tespiti …….……..19

2.6.1.1.3. Kuyruk Boyama Yöntemi ile Östrus Tespiti……..……...20
2.6.1.1.4. Atlama Dedektörü ile Östrus Tespiti……..……...20
2.6.1.1.5. Aktivite-Ruminasyon Takip Sistemi ile Östrus Tespiti……..20
2.6.1.1.6. Süt Verimi ile Östrus Tespiti……..……21
2.6.1.2. Bireysel Östrus Tespit Yöntemleri……...…22
2.6.1.2.1. Progesteron Seviyesinin Değerlendirilmesi ile Östrus Tespiti…..…..…..22
2.6.1.2.2. Vajinal Mukus Direnci ile Östrus Tespiti…….…….…22
2.6.1.2.3. Vücut Isısı ile Östrus Tespiti……...……22
2.6.2. Sütçü İneklerde Reprodüksiyonun Farmakolojik Kontrolü ve Senkronizasyon Kavramı……..……23
2.6.2.1. Senkronizasyonun Tarihçesi…..……...…….24
2.6.2.2. Zaman Ayarlı Suni Tohumlama Protokolleri…...…….……....26
2.6.2.2.1. Ovsynch Protokolü ……...……..27
2.6.2.2.2. Cosynch Protokolü ……...……..29
2.6.2.2.3. Progesteron Tabanlı Ovsynch Protokolü……..……..29
2.6.2.2.4. Presynch Ovsynch Protokolü…….……30
2.6.2.2.5. Double Ovsynch Protokolü…….……31
2.6.2.2.6. PG-3-G Protokolü…….……..32
2.6.2.2.7. G-6-G Protokolü…….32
2.7. Sütçü İneklerde Gebeliğe Etki Eden Faktörler……....33
2.7.1. Laktasyon Yükü ve Negatif Enerji Dengesinin Etkisi……..34
2.7.2. Vücut Kondisyon Skorunun Etkisi……...35
2.7.3 Gönüllü Bekleme Süresinin Etkisi…….35
2.7.4. Sağlık Durumunun Etkisi……..36
2.7.5. Tohumlama Stratejisinin Etkisi…….37
2.7.6. Oosit ve Embriyo Kalitesinin Etkisi…….38
2.7.7. Sperm Kalitesinin Etkisi……...38
2.8. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Kullanımında Gebeliğe Etki Eden Faktörler…...39
2.8.1.Flow Sitometrik Yöntem ile Sperma Cinsiyetinin Belirlenmesinin Etkisi……39
2.8.2. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Konsantrasyonunun Etkisi…..…….…….39
2.8.3. Boğa Fertilitesinin Etkisi……...…...40

2.8.4. Östrus ve Tohumlama Protokolünün Etkisi…….....….41
2.8.5. Folikül Çapının Etkisi……...…….……..42
2.8.6. Tohumlama Sayısının Etkisi…….……42
2.8.7. Tohumlama Zamanının Etkisi…….…..43
3. GEREÇ VE YÖNTEM……46
3.1. Hayvan Materyali, Bakım, Besleme ve Çevresel Şartlar…….46
3.2. Senkronizasyon Protokolü…….……..46
3.3. Gruplandırma ve Zaman Ayarlı Suni Tohumlama……..47
3.4. Ultrasonografik Muayeneler……....47
3.5. İstatistiki Değerlendirme……...……...48
4. BULGULAR…….....51
4.1. Genel Bulgular…….....51
4.2. Gebelik Oranları ve Embriyonik Kayıp Oranları…….....52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ……...……..……..56
6. KAYNAKLAR……...…….……...…...65
7. SİMGELER VE KISALTMALAR……...……..82
8. EKLER…….…….....83
9. TEŞEKKÜR……...……..…….89
10. ÖZGEÇMİŞ……...…….90

TÜRKÇE ÖZET

Bu çalışmada senkronizasyon protokolü uygulanan sağmal ineklerde cinsiyeti belirlenmiş sperma ile farklı zamanlarda tohumlamanın gebelik oranları üzerine etkisini belirlemek amaçlandı. Bu amaçla doğum sonrası 43-49. günler arasında ilk tohumlama için pre-senkronizasyon protokolüne (G7G;$PGF_{2\alpha}$-2g-GnRH-7g-GnRH-7g-$PGF_{2\alpha}$-56s-GnRH) alınan ikinci laktasyon Holstein ırkı inekler (n=611), tohumlamadan önce rastgele 4 gruba ayrıldı. Protokolün son GnRH uygulamasından sonra kontrol grubundaki inekler (KON, n=154) 12,0-16,0. saatler arasında konvansiyonel sperma ile; CBS grubundaki inekler (n=152) 12,0-16,0. saatler arasında; CBS4 grubundaki inekler (n=153), tohumlama zamanı 4 saat ertelenerek, 16,1-20,0 saatler arasında; CBS8 grubundaki inekler ise (n=152) tohumlama zamanı 8 saat ertelenerek 20,1-24,0. saatler arasında cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma (CBS) ile tohumlandı. Tüm tohumlamalarda aynı boğaya ait sperma kullanıldı. Tüm ineklerde, protokole alınan ovaryan yanıtın değerlendirilmesi amacıyla kritik kabul edilen noktalarda ve gebelik tespiti için tohumlama sonrası 36±3. ve73±3. günlerde ultrasonografik muayeneler gerçekleştirildi. Gruplar arasında VKS, süt verimleri, protokol başındaki siklik durum, protokole yanıt oranları ve tohumlama günü folikül çapları yönünden fark saptanmadı. Gebelik oranları, konvansiyonel sperma ile KON'da %50,0 (77/154), cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma ile CBS'de %42,8 (65/152), CBS4'te %48,4 (74/153) ve CBS8'de %43,4 (66/152) olarak tespit edildi. Embriyonik kayıp oranları KON'da %5,2, CBS'de %9,2, CBS4'te %4,1 ve CBS8'de %13,6 olarak tespit edildi. Sonuç olarak, sağmal ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokolleriyle birlikte cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı söz konusu olduğunda, tohumlama zamanının 4 saat ertelenerek, son GnRH uygulamasından sonra 16-20. saatlerde uygulanması ile sayısal olarak daha iyi gebelik oranları elde edilmiş ve neredeyse konvansiyonel sperma ile benzer elde edilen gebelik oranlarına ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma, Senkronizasyon, Tohumlama Zamanı, Sütçü İnek

İNGİLİZCE ÖZET

Using Of Sex Sorted Semen in Lactating Dairy Cows

The aim of this study was to determine the effect of insemination with sex sorted semen at different times on pregnancy rates in dairy cows that underwent synchronization protocol. For this purpose, second lactation Holstein cows (n=611), which were taken into pre-synchronization protocol (G7G;$PGF_{2\alpha}$-2d-GnRH-7d-GnRH-7d- $PGF_{2\alpha}$ -56h-GnRH) for the first insemination on postpartum 43-49. days and all cows were randomly divided into 4 groups before insemination. In KON group, cows were inseminated 12.0 to 16.0 h after the last GnRH administration in synchronization protocol with conventional semen. After the last GnRH administration in synchronization protocol; cows were inseminated 12.0 to 16.0 h in CBS group (n=152), 16.1 to 20.0 h in CBS4 group (n=153), 20.1 to 24.0 h in CBS8 group (n=152) with sexed semen. Semen from the same bull was used in all inseminations. All cows were ultrasonographically examined at critical points (beginning of the protocol, insemination time, ovulation control etc.) throughout the study to individually assess the ovarian responses to the protocol. First pregnancy detection was performed around 36 days and second pregnancy detection was performed around 73 days after insemination. There was no statistical difference between the groups in terms of body condition score, milk yields, cyclicity at the beginning of the protocol, response rates to the protocol and follicle size on the day of insemination. Conception rates were detected 50.0 % (77/154) in KON group with conventional semen, 42.8% (65/152) in CBS, 48.4% (74/153) in CBS4 and 43.4% in CBS8 (66/152) with sexed semen. Embryonic loss rates were determined as 5.2% in KON, 9.2% in CBS, 4.1% in CBS4 and 13.6% in CBS8. As a conclusion, in case of using sex sorted semen in synchronization protocols in dairy cows, delaying insemination time by 4 hours and performing insemination 16-20 hours after the last GnRH administration in synchronization protocol resulted with numerically better pregnancy rates and almost achieved similar pregnancy rates with conventional semen.

Key words: Sex-Sorted Semen, Synchronization, Time of Insemination, Dairy cow

1. GİRİŞ

Süt sığırı işletmelerinde karşılaşılan ve karlılığı önemli derecede etkileyen en büyük problemlerden birisi, sürüdeki hayvanların verim ömürlerinin azalması ve buna bağlı olarak sürüden çıkarma oranlarının artmasıdır. İşletmelerin bu büyük problem ile başa çıkabilmesi, sürü büyüklüğünü ve karlılığı optimum seviyede tutabilmek için yeterli sayıda damızlık düve sağlanabilmesine bağlıdır. Yeterli sayıda damızlık düve temini için de işletmede doğacak kaliteli dişi hayvan varlığının arttırılması hem ekonomik hem de biyogüvenlik açısından öne çıkan bir seçenektir.

Cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) üretimini mümkün kılan günümüz teknolojisi, hem süt hem de et üretimi yapılan işletmelerde doğacak buzağı cinsiyetinin %90 doğrulukta belirlenebilmesine olanak sağlamıştır (Holden, & Butler, 2018). Cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı ile sürü dışından hayvan almadan, daha düşük maliyetlerle ve bulaşıcı hastalıklardan da korunarak yeterli hatta daha fazla sayıda damızlık düve üretimi mümkündür. Cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma ile sürüdeki genetik ilerleme hızlandırılabilir ve elde edilen çok sayıda damızlık düvelerden en iyi genetik potansiyele sahip olanları seçebilme imkanına sahip olunabilir (Joezy-Shekalgorabi, Maghsoudi, & Mansourian, 2017; Weigel, 2004). Ayrıca süt işletmelerindeki istenmeyen erkek buzağı sayısını ve erkek buzağılardan kaynaklanan güç doğum oranının azaltılmasında cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma kullanımının büyük ölçüde yardımı olmaktadır (Hötzel, Longo, Balcao, Cardoso, & Costa, 2014; Norman, Hutchison, & Miller, 2010; Seidel, 2003).

Cinsiyeti belirlenmiş sperma üretimi için X ve Y kromozomu içeren sperm hücrelerinin ayrıştırılması gerekmektedir. Bu ayrıştırma işlemi sırasında, membran stabilizasyonlarını sağlamak amacıyla kullanılan solüsyonların spermlerin hareket kabiliyetini etkilemesi ve azaltması, spermlerin basınç ve ultraviyole radyasyona maruz kalmaları sonucu kromatin stabilizasyonuna zarar vermesi, ayrıştırma, dondurma ve çözme işlemleri sırasında kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarının hızlanması sonucu spermlerin yaşam ömürlerinin kısalması gibi dezavantajlar oluşmaktadır (Garner, 2006; Schenk, Cran, Everett, & Seidel, 2009). Ayrıştırma işlemi sırasındaki hasar sonucu yaşam ömrü kısalan CBS, konvansiyonel sperma ile karşılaştırıldığında daha düşük gebelik oranları elde edilmektedir (Garner ve ark., 2006; Gosálvez ve ark., 2011; Moce,

Graham & Schenk, 2006; Maxwell ve ark., 2004). Ayrıca sperma ayrıştırma işlemi sırasında oluşan hasarın yanında, ejekülattan sadece %30 oranında istenilen cinsiyette sperma elde edilebilmesi, CBS üretim hızının yavaş ve maliyetli olmasından dolayı konvansiyonel spermaya göre daha pahalıdır. Cinsiyeti belirlenmiş sperma üretimi için birçok metot vardır ancak ticari üretim bakımından flow sitometrik yöntem daha başarılı bulunmuştur (Hamano, 2007; Seidel, 2007). Son derece hızlı ve etkili olan bu yöntem ile saniyede 40.000 X ve Y kromozomu içeren sperm hücresi ayrıştırma işlemine tabi tutulur iken, saniyede 8000 istenilen cinsiyette ve yüksek saflıkta sperm hücresinin ayrıştırılabilme imkanı sunulmaktadır (Sharpe, & Evans, 2009). Son on yılda, ayrıştırma öncesi ve ayrıştırma sırasında sperm hücrelerine uygulanan teknikler dikkate değer şekilde geliştirilmiştir. Ayrıca ayrıştırma işlemi sırasında kullanılan dijital ve otomatik sistemlerin geliştirilmesi de ayrıştırma işleminin istenilen cinsiyette sperma hücresi elde edilmesinde daha etkili olmasını sağlamıştır (Vishwanath, & Moreno, 2018).

Üretim aşamasındaki işlemlerden dolayı fertilizasyon yeteneği azalan ve maliyeti yükselen CBS, metabolik yük, doğum sonrası siklik aktivitelerinin geç başlaması, zayıf östrus bulguları ve östrusların yeterince belirlenememesi gibi fertiliteyi azaltan durumlara sahip ineklere göre daha yüksek fertiliteye sahip olan düvelerde daha çok kullanım alanı bulmuştur, ancak kullanım oranı yine de %5 ten az olarak bildirilmektedir (Seidel, 2014). Ancak CBS'nin düvelerin yanında genetik olarak iyi olan ineklerde de kullanılması, daha yüksek karlılığı ve daha hızlı bir genetik ilerlemeyi mümkün kılacaktır (De Vries ve ark., 2008; Seidel, 2003). CBS kullanımının geliştirilmesi amaçlanan çalışmalarda düvelerde daha yüksek gebelik oranları elde edildiği gibi, doğal östrus gösteren hayvanlarda göstermeyenlere göre daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir (DeJarnette ve ark., 2010). Bu da CBS kullanımının günümüze kadar sadece düvelerde ve östrus takibi sonrası kullanılmasını yaygınlaştırmış, zaman ayarlı suni tohumlama protokollerinde ve ineklerde kullanımını önemli ölçüde sınırlandırmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, gerek CBS teknolojisinde yapılan iyileştirme çalışmaları ile üretim ve fertilite kapasitesinin arttırılması gerekse sahadaki kullanımına yönelik fertiliteyi arttırma amaçlı tohumlama zamanın ve zaman ayarlı tohumlama

protokollerinin belirlenmeye çalışılması ile CBS kullanımı sonucu daha iyi sonuçlar alınmaya başlanmış ve bu yöndeki çalışmalar hız kazanmıştır.

Konu ile ilgili güncel araştırmalarda, CBS'nin ayrıştırma esnasında maruz kaldığı fiziksel ve kimyasal hasardan dolayı yaşam ömrü kısaldığı ve ayrıca işlem sırasında kapasitasyon sürecinin de başladığı göz önünde bulundurulduğunda CBS'nin konvansiyonel sperma için tavsiye edilen zamana göre, ertelenerek ovulasyon zamanına daha yakın zamanda kullanılmasının gebelik oranlarının yükseltilebileceği fikri güncelliğini korumaktadır. CBS ile yapılan öncü çalışmalarda, östrus başlangıç zamanı esas alınıp tohumlamanın ertelenerek yapılmasıyla hem düvelerde (Guner ve ark., 2020) hem de ineklerde (Bombardelli, Soares, & Chebel, 2016) fertilitenin iyileştirilebileceği bildirilmektedir. Ancak sağmal ineklerde CBS kullanımı için rutin protokoller arasından en uygununun belirlenmesi (Karakaya-Bilen ve ark., 2019) ve zaman ayarlı tohumlama protokollerinde CBS ile tohumlamanın ovulasyona yaklaştırılarak uygulanmasının gebelik oranlarına etkisini değerlendirmeyi amaçlayan çalışmalar (Drake ve ark., 2020; Lauber, McMullen, Parrish, & Fricke, 2020) oldukça sınırlı sayıdadır.

Bu çalışmada, sağmal ineklerde, ovsynch protokolü temelli bir zaman ayarlı tohumlama protokolü kapsamında CBS ile tohumlama zamanının ertelenerek, tohumlamanın ovulasyona yaklaştırılması ile daha yüksek gebelik oranlarının elde edilebileceği hipotezi araştırılmıştır. Bu sayede, sağmal ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokolü kapsamında CBS ile daha yüksek gebelik oranlarının elde edilebileceği optimum tohumlama zamanının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Cinsiyeti Belirlenmiş Spermanın Süt Sığırı Yetiştiriciliğindeki Önemi

Cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı, süt ve et endüstrisinde doğacak buzağı cinsiyetinin %90'dan fazla güvenilirlikle belirlenmesini sağlar. Sığırlarda ırklara göre değişmekle birlikte, X sperm hücresi, Y sperm hücresinden oratalam %4 daha fazla DNA içeriğine sahip ve bu sayede ayrıştırma işlemi yapılabilmektedir. Bu ayrıştırma işlemi için bir çok yöntem bulunmuştur ancak ticari üretim bakımından en başarılısı flow stometrik yöntem olarak belirlenmiştir (Seidel, 2007).

Cinsiyeti belirlenmiş dişi spermanın Holstein inek ve düvelerde kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Lauber ve ark., 2020). Ancak cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma ile elde edilen gebeliklerin, konvansiyonel sperma ile elde edilen gebelik oranlarından %5-10 daha düşük olması cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma kullanımını sınırlandıran ana faktörlerden biridir (Maicas ve ark., 2020; Perry ve ark., 2020; Seidel, 2014). Sperma ayrıştırma teknolojisinde yapılan bazı modifikasyonlar sperma hücrelerindeki, işlem sırasında gerçekleşen hücresel zararı azaltsa da fertilite oranları konvansiyonel spermaya göre hala düşüktür. Bu nedenle de sütçü işletmelerde, ineklerde gebelik oranlarının daha düşük olmasından dolayı, cinsiyeti belirlenmiş sperma düvelerde daha çok kullanım alanı bulmuştur (DeJarnette, Nebel, & Marshall, 2009; Healy, House, & Thomson, 2013). Yapılan bazı çalışmalar cinsiyeti belirlenmiş spermanın hem düvelerde hem de ineklerde kullanılmasının ekonomik olarak faydalı olabileceğini ve hatta kullanılması gerektiğini ortaya koymuştur (Butler, Hutchinson, Cromie, & Shalloo, 2014; Xu, 2014). Ancak CBS kullanımında unutulmamalıdır ki, fertilideki herhangi bir düşüklük karlılığı etkileyecektir ve bu nedenden dolayı düşük fertiliteye sahip işletmeler CBS kullanımında daha dikkatli olmalıdır (Holden, & Butler, 2018).

Süt sığırı endüstrisinde, dişi buzağılar sürünün büyütülmesi ve damızlık ihtiyacının karşılanması için son derece önemlidir. Ayrıca fazla sayıda üretildiklerinde diğer işletmelere satılarak ek gelir kaynağı olarak da değerlendirilebilirler (De Vries ve ark., 2008).

Konvansiyonel sperma kullanımı, sütçü işletmelerde genellikle istenmeyen erkek buzağı (yaklaşık %50 oranında) sayısında artışa neden olur. Bazı işletmeler erkek buzağıları besi hayvanı olarak değerlendirmeye çalışsada, sütçü erkek buzağılar ekonomik olarak karlı değildirler (Hötzel ve ark., 2014). Cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma kullanımı işletmelerdeki istenmeyen erkek buzağı sayısını ve bu erkeklerin karşılaştığı refah problemlerini azaltmaya yardımcı olacaktır (Holden, & Butler, 2018).

Dişi buzağılar erkek buzağılardan daha küçük doğum ağırlığına sahip olduğu için, cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma kullanımı sonucu güç doğum oranları %20 düzeyinde azaltılabilir (Norman ve ark., 2010). Güç doğum oranının azaltılması ile buzağı kaybı, retensiyo sekundinarum, uterus hastalıkları, siklik aktivitenin geç başlaması ve gebelik oranlarının düşmesi gibi problemlerin azaltılması sağlanabilmektedir. Problemsiz doğum ve doğum sonrası dönem ile hayvanlar kısa zamanda yüksek fertiliteye ulaşabilir ve iki buzağılama arası süre istenilen düzeyde tutulabilir (Holden, & Butler, 2018).

Embriyo transfer çalışmaları, sürüde genetik olarak üstün olan hayvanlardan daha fazla yavru alabilme şansı doğurarak sürü kalitesini arttırmaya yardımcı olabilir. Embriyo transferi çalışmalarında cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı ile istenilen cinsiyette daha fazla yavru elde edilmesinin mümkün olması ile işlemin etkinliği artmaktadır. Şüphesiz ki, CBS kullanımı, suni tohumlama ve embriyo transfer çalışmaları ile birlikte yapıldığında sürüdeki genetik ilerleme hızlanacaktır (Hayakawa, Hirai, Takimoto, Ideta, & Aoyagi, 2009).

2.2. Dünden Bugüne Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Teknolojisi

Hayvancılık endüstrisinde yapılan üretim modeline göre erkek ya da dişi buzağı cinsiyeti, diğerine göre daha değerli olmaktadır. Üretim modeli çeşidine bağlı olarak istenilen cinsiyette buzağıya sahip olmak 300 Amerikan Doları daha fazla kazanç sağlamaktadır (De Vries, 2015). Doğacak buzağı cinsiyetinin belirlenmesi, süt üretimi yapan işletmelerde damızlık ihtiyacını karşılayacak dişi buzağı, et üretimi yapan işletmelerde ise et ihtiyacını karşılayacak erkek buzağı sayısının daha hızlı artmasına olanak sağlamaktadır (De Vries, 2015).

Doğacak yavru cinsiyetini belirlemenin en etkili yolu, fertilizasyondan önce X ve Y kromozomu içeren sperm hücrelerinin ayrıştırılmasıdır. Bu doğrultuda spermlerin hız,

yoğunluk, yüzeysel elektrik yükü ve immünolojik özellik farkları kullanılarak sperma ayrıştırma çalışmaları yapılmıştır. Ancak bu yöntemlerden hiç birisinde dikkate değecek miktarda fertil sperm ayrıştırılamamıştır (Klinc, & Rath, 2006). Sperm ayrıştırma teknolojisinde şimdiye kadar bilinen en etkili yöntem, X ve Y sperm hücrelerindeki DNA yoğunluk farkını kullanarak ayrım yapan flow sitometri tekniğidir (Seidel, 2007). Bu yöntem en hızlı, en güvenilir ve ekonomik olarak en uygunudur (Seidel & Garner, 2002).

1981 yılında William Goddard, Kolorado Üniversitesi'nden sperm hücrelerinin ayrıştırılmasını incelemek üzere yardım istemiş ancak o zamana kadar başarılı bir ayrıştırma tekniği olmadığı için üniversite teklifi reddetmiştir. Daha sonrasında Dr. Seidel ve Dr. Amann Warwick Land şirketinin sponsorluğu ile cinsiyeti belirlenmiş sperma teknolojisi üzerine çalışmaya başlamıştır. Daha sonrasında Dr. Daniel Pinkel, sperm hücrelerinin içerdiği DNA içeriğini ölçebilen ilk flow sitometriyi geliştirmiştir (Loggan, 2019).

1982 yılında, Dr. Duane Garner flow sitometrik yöntem ile X kromozomu ve Y kromozomu içeren sperm hücrelerinin ayrıştırılabileceğini fikrini sunmuş ve proje Oklahoma Üniversitesi ve Amerikan Tarım Bakanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje sürecinde sığır, tavşan, domuz ve koyun spermalarının cinsiyete göre farklı miktarlarda DNA içerdiği ortaya konmuş ancak sperm hücreleri ayrıştırma sırasında ölmüştür. Bu teknik ile sığır cinsine bağlı olarak X ve Y sperm hücreleri arasında %3.73-4.98 DNA içeriği dolayısıyla ağırlık farkı olduğu ortaya konmuştur (Garner, & Seidel, 2008).

Daha sonra sperm ayrıştırma işlemi teknolojisi geliştirilmeye devam edilmiş ancak sperm hücrelerinin boyama işlemi sırasında hala canlılığını sürdüremediği görülmüştür. Çözüm olarak Hoechst 33342 boyası kullanılmış ve bu boyanın sperm hücrelerini öldürmediği tespit edilmiştir (Garner & Seidel, 2008)

1989 yılında tavşanlarda yapılan çalışmada, cinsiyeti belirlenmiş Y kromozomu taşıyan sperma ile %81, X kromozomu taşıyan sperma ile %94 oranında canlı yavru elde edilmiştir. Sperma ayrıştırma işlemi sonucu canlı yavru alındıktan sonra başka bir problem olan ayrıştırma işleminin hızıyla alakalı çalışmalara başlanmıştır. Saatte 400.000 sperm hücresi ayrıştırabilen sistemin tek bir payet üretmesi için geçen süre 25

saattir. Araştırmacılar bu üretim kapasitesinin suni tohumlama uygulamaları için yeterli olmadığı kanaatına varmışlar ve in vitro fertilizasyon yöntemiyle embriyo elde edilip kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (Loggan, 2019).

1993 yılında, Mastercalf şirketi modifiye ettikleri flow sitometri cihazı ile %70 saflıkta Y kromozomu içeren sperm hücrelerini ayrıştırmış ve elde edilen embriyolar dondurulmuştur. Dondurulmuş embriyoların kullanımı sonucunda %90 oranda erkek buzağı elde edilmiştir (Garner & Seidel, 2008).

Yapılan çalışmalar ve elde edilen gebelik oranlarından dolayı Amerikan Tarım Bakanlığı, şirketleri cinsiyeti belirlenmiş sperma üretimine teşvik etmeye ve lisans vermeye başlamıştır. Sığır sperm hücresi ayrıştırmada flow sitometriyi geliştiren 4 şirket vardır. Bunlar ABS Global, Genex, Mastercalf ve Sexing Teknoloji şirketleridir.

2003 yılında, Sexing Teknoloji şirketi sığır sperması için cinsiyeti belirleme teknolojisinin patentini almış ve birçok şirket için üretim yapmaya başlamıştır (DeJarnette ve ark., 2009). Piyasaya sunulan cinsiyeti belirlenmiş sığır sperması 2004 yılından 2006 yılına kadar istenilen seviyedeki kullanım rakamlarına ulaşamamış ancak 2006 yılında Monsanto şirketinin üretmiş olduğu 16 nozüle sahip flow sitometri cihazı ile üretim hızı arttırılmıştır (Garner & Seidel, 2008). Ayrıca cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı sonucu gebelik oranlarının, konvansiyonel sperma ile elde edilen gebelik oranlarının %80'i kadar olduğu ve dişi yavru elde etme oranının %89 olduğu tespit edilmiştir (DeJarnette ve ark., 2009).

Flow sitometri cihazında, 2008 yılında birçok iyileştirme ve geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Daha iyi sensörler ve daha iyi yazılım programları kullanılarak cinsiyeti belirlenmiş spermaların ayrıştırma hızı ve güvenilirliği arttırılmıştır. Böylece bir flow sitometri cihazından 2×10^6 sperm hücresi içeren bir payet yaklaşık 9 dakikada üretilebilir hale gelmiştir (Garner & Seidel, 2008).

Sexing Teknoloji, 2017 yılında SexedULTRA^{TM}4M ürününü piyasaya sunmuştur. Şirket, yapılan çalışmalar ile desteklendiği üzere SexedULTRA^{TM}4M teknolojisinin sperma hücrelerine daha az zarar verdiğini duyurmuştur (Thomas ve ark., 2017). Bu yeni ürün 4×10^6 canlı cinsiyeti belirlenmiş sperma içermektedir. Bu içerik, XY metodu ile üretilen standart dozun iki katıdır. Düveler ile yapılan büyük bir çalışmada,

SexedULTRA™ ile elde edilen cinsiyeti belirlenmiş spermalar ile XY teknolojisi sonucu elde edilen spermalardan elde edilen gebelikler arasında %4,5 (%46,1-41,6) fark bulunmuştur (Hall ve ark., 2017).

Yapılan geliştirme çalışmalarının son noktası olan SexedULTRA™ teknolojisinde, sperm ayrıştırma işlemi sırasında kullanılan sulandırıcı maddesini geliştirerek sperm hücrelerinin işlem boyunca daha az strese girmesini ve yaşam ömürlerinin artması sağlandığı bildirilmiştir (Vishwanath & Moreno, 2018). Ayrıca bu teknoloji bünyesinde farklı sperma dozlarının gebelik oranları üzerine etkileri araştırılmıştır ve payet başına 4 milyon sperm hücresi kullanıldığında 2 milyon sperm hücresine göre daha iyi sonuç elde edilirken, konvansiyonel sperma ile elde edilen sonuçlara yaklaştığı tespit edilmiştir (DeJarnette ve ark., 2010).

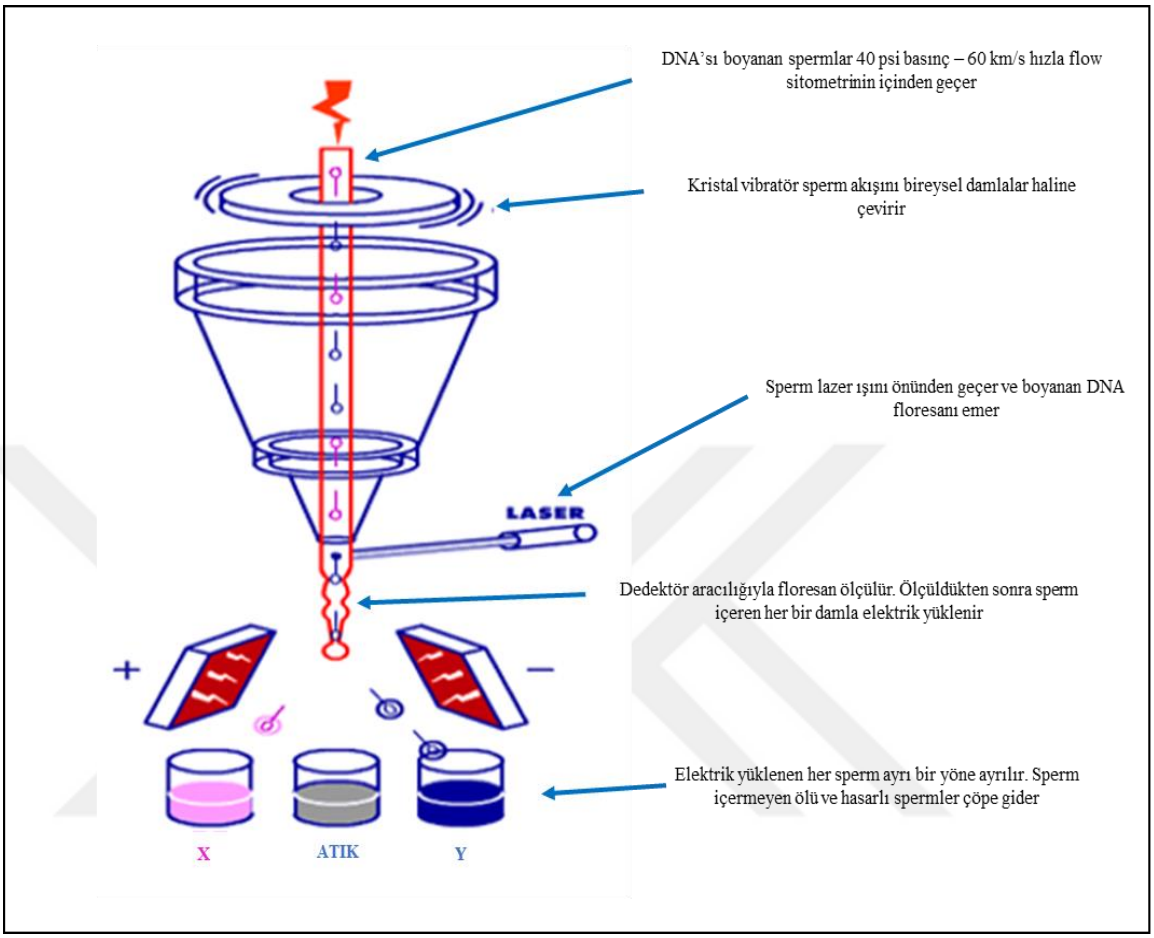
Şu an cinsiyeti belirlenmiş sığır sperması için flow sitometrik yöntem ile üretim yapma hakkına sahip tek şirket Sexing Teknojidir. Piyasada kullanıma sunulan cinsiyeti belirlenmiş spermalar, 2×10^6 ya da 4×10^6 adet canlı sperma içeren dozlardadır. Ayrıca son zamanlarda yapılan teknoloji iyileştirme çabaları ile şimdiye kadar %90 istenilen cinsiyette buzağıya sahip olma oranının %96-97 seviyelerine çıkarabilecek ürün satışa sunulmuştur.

2.2.1. Flow Sitometri Tekniği

Erkek damızlıktan elde edilen sperma ilk olarak sulandırılarak konsantrasyonu düşürülür (Jain, Yathish, Jain, & Sharma, 2011). Daha sonra sperm hücreleri, hücre zarına penetre olarak DNA'yı boyayan özel bir floresan boya (Hoechst 33342) ile boyanır. X sperm hücresi ortalama %4 daha fazla DNA içerdiğinden dolayı, Y hücresine göre daha fazla boyanır. Daha fazla boya alan X sperm hücresi ultraviole ışık altında daha fazla floresan verir ve bu da sistemdeki dedektörler tarafından tespit edilebilmesini sağlar (Seidel, 2007).

Boyanan sperm hücreleri sistemdeki pompa sayesinde floresan detektörlere yönlendirilir. Sistemdeki lazer, sperm hücrelerinin DNA'sına zarar vermeyecek şekilde uygun dalga boyunda ışık göndererek hücrelerin floresan vermelerini sağlar ve bu veriler bilgisayar tarafından analiz edilir.

Boyanan ve analiz edilen sperm hücreleri ayrıştırma işlemi için vibratör yardımıyla damlacıklara ayrılarak flow sitometri cihazından çıkar. Saniyede çıkan 70.000-80.000 damlacıktan 1/3 ü sperm hücresi içerirken geriye kalan kısmı sperm hücresi içermez. Bilgisayar tarafından analiz edilen X sperm hücresi içeren damlacık pozitif yükle, Y sperm hücresi içeren damlacık ise negatif yükle yüklenir. Eğer damlacık sperm hücresi içermiyor, birden fazla sperm hücresi içeriyor ya da hasarlı hücre içeriyorsa herhangi bir yükle yüklenmez. Saatte 80 km hızla flow sitometri cihazını terk eden bu pozitif, negatif ya da elektrik yüksüz damlacıklar, bir tarafta pozitif diğer tarafta negatif yüklü plakalar arasından geçer. Zıt kutupların birbirini çekme prensibi göz önünde bulundurulduğunda pozitif yükle yüklenen X sperm hücresini taşıyan damlacıklar negatif yüklü plaka tarafına, Y sperm hücrelerini taşıyan damlacıklar pozitif yüklü plaka tarafına ve yüksüz damlacıklar hiçbir tarafa sapmadan sistemden çıkar ve üç farklı tüpte toplanırlar. Genel olarak sisteme giren toplam miktardan yaklaşık %20 oranında X, %20 oranında Y ve %60 oranda cinsiyeti belirlenememiş ya da hasarlı sperm hücresi elde edilir (Şekil 1) (Seidel, 2007).



Şekil 1: Flow sitometrik yöntem (Vishwanath, 2014).

Flow sitometrik yöntem ile yalnızca X ve Y sperm hücreleri birbirinden ayrılmaz, ayrıca ölü ve hasarlı sperm hücreleri de ayrılmaktadır. Bu işlem için kullanılan gıda boyası ölü ve hasarlı sperm hücrelerinin içerisine girerek Hoechst 33342'nin floresan vermesini engellemektedir. Böylece zayıf floresan veren hücreler ayrılmakta ve imha edilmektedir (Seidel, 2007; Seidel, & Garner, 2002).

Sisteme giren toplam sperm miktarının ancak %15-20'lik kısmı canlı ve cinsiyete göre ayrılmış şekilde elde edilebilmektedir. Sperm ayrıştırma yavaş ilerleyen bir işlemdir. Üretim hızının yavaş olması, yatırım ve bakım maliyetlerinin de yüksek olması doz maliyetinin yüksek olmasına neden olmaktadır. Ancak teknolojinin geliştirilmesi amacıyla çalışmalar devam etmektedir.

2.3. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Kullanımının Avantajları

Cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı ile %90 ve üzerinde oranda istenilen cinsiyette yavruya sahip olmak mümkündür. Dolayısıyla CBS kullanımı sürüdeki dişi hayvan varlığını hızlı bir şekilde arttıracaktır. Yüksek sürüden çıkarma oranlarına sahip süt sığırı endüstrisinde, cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma kullanımı ile dişi hayvan varlığının hızlı bir şekilde artması, üreticilerin çiftlik dışından hayvan almadan kendi damızlık ihtiyaçlarını hatta ihtiyaçlarından daha fazlasını kolayca karşılayabilmelerini sağlamaktadır. Ayrıca damızlık ihtiyacını başka işletmelerden karşılamayacağı için, çiftliğe yeni hastalık girme riski de en aza indirilmiş olur (De Vries ve ark., 2008). Damızlık ihtiyacının karşılanmasının yanında ihtiyaç fazlası düvelerin satışı işletmelere ek gelir olacak ve yapılan işin daha karlı olmasını sağlayabilmektedir. Minnesota ve Florida üniversitelerinin ortaklaşa yapmış olduğu bir çalışmada, cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma kullanımı sonucu doğan dişi buzağılardan fazla olanların satışından gelen para ile işletmede damızlık olarak yetiştirilecek düvelerin maliyetinin 400 dolar daha az olduğu hesaplanmıştır (Chebel, Guagnini, Santos, Fetrow, & Lima, 2010).

CBS'nin yoğun olarak kullanımı sonucu artan dişi hayvan varlığı düve fiyatlarının ucuz ve ulaşılabilir olmasına neden olacaktır. Düvenin fiyatını belirleyen bir başka kriter, düvenin CBS ile gebe kalmış olmasıdır. Doğacak yavrunun cinsiyetinin bilinmesi, dişi yavru doğacağı için genetik ilerlemenin daha da hızlanması ve damızlık ihtiyacının daha hızlı karşılanabilmesi avantajları gebe düvenin değerini arttırmaktadır (Seidel, 2014).

CBS kullanımının yetiştiricilere avantaj sağlayacağı diğer bir konu da hızlı genetik ilerlemedir. İşletmedeki genetik olarak değerli ineklerin yine genetik olarak iyi olan boğalardan gebe kalması ve doğacak yavrunun dişi olması genetik ilerlemenin çok daha hızlı olmasını sağlayacaktır (Chebel ve ark., 2010). Genetik ilerleme hızının araştırıldığı bir çalışmada, CBS kullanılarak genetik ilerleme hızının %15'e kadar daha hızlı olabileceği bulunmuştur (De Vries ve ark., 2008). Bununla beraber, genetik ilerlemenin hızlandırılmasında bir başka önemli uygulama olan embriyo transferi söz konusu olduğunda, CBS ile fertilizasyonu yapılmış embriyoların transferi ile istenmeyen cinsiyette ya da daha az değerli cinsiyette buzağı elde edilmesinin önüne

geçilebilmektedir. Bu sayede CBS kullanımı, embriyo transferi uygulamasının etkinliğine ve karlılığına önemli katkılarda bulunmaktadır (Hayakawa ve ark., 2009; Seidel, 2014).

CBS ve konvansiyonel sperma kullanımı sonucu elde edilen buzağılar arasında fark olup olmadığını araştıran çalışmalarda, CBS sonucu elde edilen gebeliklerde ölü doğum oranı, abort oranı, gebelik süresi, güç doğum oranı, doğum ağırlığı ve sütten kesim ağırlığı bakımından konvansiyonel sperma ile arasında bir fark bulunamamıştır (Garner, & Seidel, 2008). Düvelerde güç doğum oranının araştırıldığı bir çalışmada, erkek buzağı doğumunda dişi buzağı doğumuna göre %10 daha fazla güç doğum olayının gerçekleştiği bildirilmiştir (De Vries, 2015). Cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımının güç doğum oranını düvelerde %28, ineklerde ise %64 oranında azalttığı da bildirilmiştir (Norman ve ark., 2010). Doğan buzağı cinsiyetleri değerlendirildiğinde, cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma kullanımı ile elde edilen ikiz gebeliklerde doğan buzağı cinsiyetleri, %79 oranında dişi-dişi, %15 oranında erkek-dişi ve %6 oranında erkek-erkek olmaktadır. Konvansiyonel sperm kullanıldığında ise doğan ikiz yavruların cinsiyetleri, %42 erkek-dişi, %33 erkek-erkek ve %25 dişi-dişi olmaktadır (DeJarnette ve ark., 2009). Ayrıca cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı sonucu şekillenen ikiz gebeliklerde, ölü doğuma çok daha nadir rastlanılmaktadır (Norman ve ark., 2010).

2.4. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Kullanımının Dezavantajları

CBS'nin en büyük dezavantajı, gebelik oranlarının konvansiyonel sperma ile elde edilen gebelik oranlarından daha düşük olmasıdır. Yapılan çalışmalarda, cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı sonucu konvansiyonel spermanın %60-90'ı kadar gebelik oranları elde edilmiştir (DeJarnette ve ark., 2010, 2011; Healy ve ark., 2013; Norman ve ark., 2010).

Bir diğer dezavantaj ise CBS'nin fiyatıdır. Üretimi için kullanılan flow sitometri cihazının yüksek maliyette olması (yaklaşık 340.000 $) ve uzman kişilere ihtiyaç duyulması, üretim maliyetinin artmasına neden olmaktadır (Garner, & Seidel, 2008). Kullanılan boğaya göre de değişmekle birlikte, konvansiyonel spermadan yaklaşık 15-50 $ daha pahalıdır (Garner, & Seidel, 2003).

Piyasada bulunan damızlık düve miktarı ve fiyatı da CBS kullanımını etkileyen faktörlerden birisidir. Çünkü CBS kullanımı damızlık düve maliyetini yükseltir. Eğer fazla miktarda üretilen damızlık düveler satılamaz ya da satın almak yetiştirmekten daha ucuz ise CBS kullanmak dezavantaj olacaktır (De Vries ve ark., 2008). Ancak bu durum şu an ülkemiz için geçerli değildir ve ülkemiz şartlarında dezavantaj olarak değerlendirilmemelidir.

2.5. Sütçü İneklerde Üreme Fizyolojisi

2.5.1. Östrus Siklusu

Sığırlar polioöstrik hayvanlardır ve pubertaya 6-12 aylık yaşta, yaklaşık 200-250 kg canlı ağırlığa ulaştıklarında erişmektedir (Forde ve ark., 2011) . Sığırlarda üreme, sezona bağlı değildir ve gebe kalmadıkları müddetçe yıl boyu östrus göstermektedirler. İki östrus arasında geçen süre östrus siklusu olarak tanımlanır. Sığırlarda östrus siklusu uzunluğu, 18-24 gün arasında olabilirken ortalama 21 gündür (Mac Millan, Washburn, Henderson, & Petch, 1990). Östrus siklusunun uzunluğu hayvanın ırkı, mevsim, besleme durumu, bakım şartları, ortamda boğanın olup olmaması, süt verimi, laktasyon sayısı ve siklustaki foliküler dalga sayısına bağlı olarak değişebilmektedir. Ortalama 21 gün olan östrus siklusu, foliküler (proöstrus ve östrus, 4-6 gün) ve luteal (metöstrus ve diöstrus, 14-18 gün) olmak üzere iki evreye ayrılmaktadır (Forde ve ark., 2011).

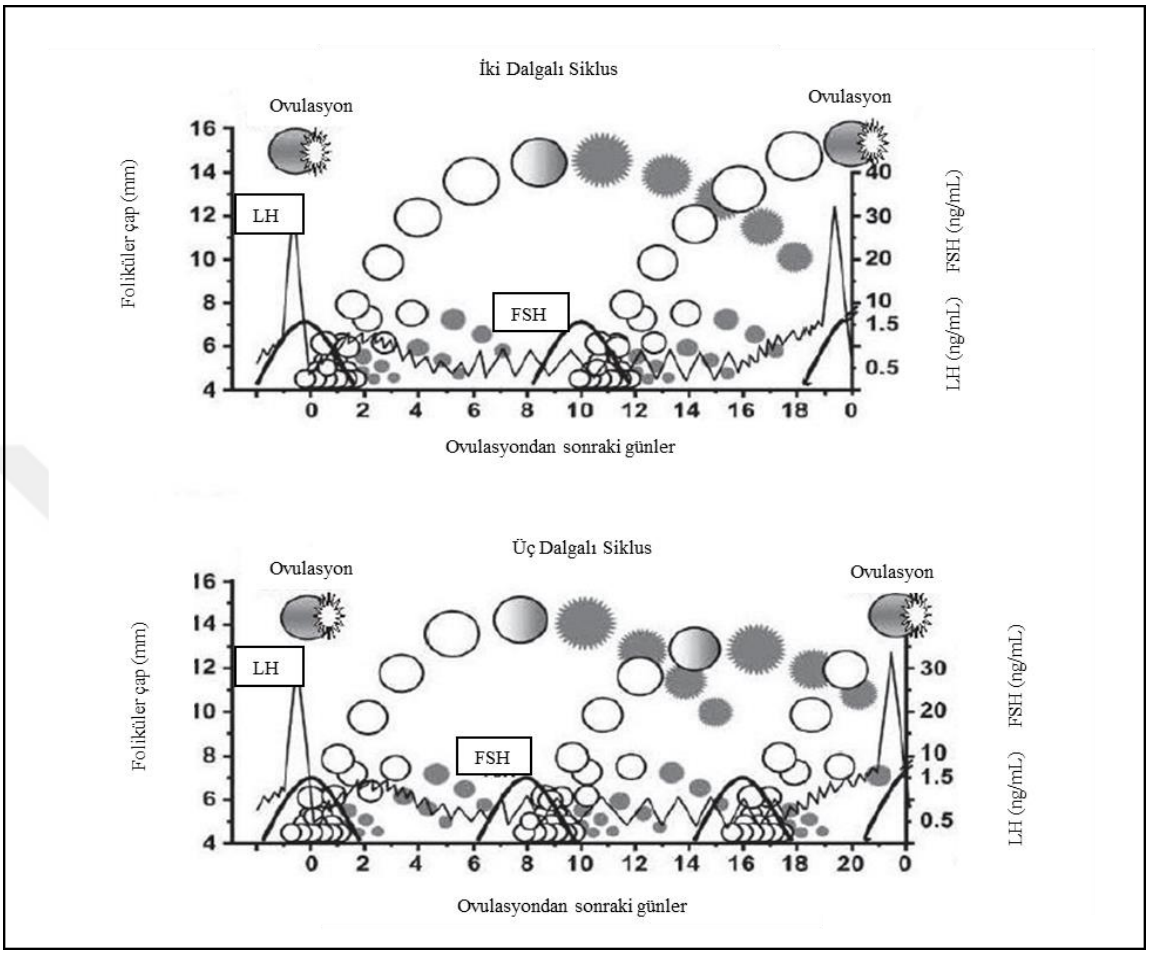
2.5.2. Östrus Siklusunun Hormonal Düzeni

Östrus siklusu, başlıca, hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), ön hipofizden salgılanan folikül stimule edici hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH), ovaryumlardan salgılanan progesteron, östradiol, inhibin ve uterustan salgılanan prostaglandin (PGF) hormonlarının etkisi altında gerçekleşmektedir. Siklus, bu hormonların kendi aralarında var olan pozitif-negatif geri bildirim sistemi ile düzenlenmektedir. Bir dekapeptit olan GnRH, hipofizin ön lobuna etki ederek FSH ve LH salınımını sağlar ve böylece östrus siklusunu kontrol edebilmektedir (Schally ve ark., 1971). GnRH hipofizial portal dolaşım sistemine geçerek gonadotrofik hücrelerin çeperindeki G proteinlerine bağlanmakta ve bu bağlanma sonucunda gerçekleşen hücre içi kalsiyum salınımı protein kinaz aktivitesini uyarır ve FSH-LH salınımı gerçekleştirmektedir (Kakar, Rahe, & Neill, 1993).

Östrus siklusunun foliküler evresi boyunca regrese olan korpus luteum etkisiyle bazal seviyede progesteron mevcuttur. Dolaşımdaki progesteron miktarının azalması ve GnRH'ın etkisi ile ovulasyon öncesi dominant foliküldeki proliferasyon sonucu dolaşımdaki östrojen miktarı artmaya başlamaktadır. Artan östrojen miktarı düve ve ineklerde östrus belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Forde ve ark., 2011). Ovulasyon öncesi gerçekleşen GnRH salınımı FSH ve LH salınımına sebep olur ancak sadece progesteron miktarının basal seviyede olması ve LH dalgalarının 2-3 gün boyunca her 40-70 dakikada salınımı dominant folikülün ovule olmasını sağlamaktadır (Roche, 1996). Östrus periyodunun bitiminden 10-14 saat sonra gerçekleşen ovulasyon ile luteal dönem başlar. Korpus luteumun şekillenmesiyle dolaşımdaki progesteron miktarı artmaya başlar. Dolaşımdaki progesteronu üreten hücreler, dominant folikülün luteinize olması sonucu oluşan teka ve granüloza hücreleridir (Smith, McIntush, & Smith, 1994). Diöstrus periyodu boyunca dolaşımdaki progesteron miktarı artmaya başlar ve aynı zamanda FSH etkisiyle mevcut foliküler dalga devam eder. Ancak lüteal faz boyunca gelişen dominant foliküller ovule olamazlar. Çünkü dolaşımdaki progesteron miktarı negatif geri bildirim mekanizması ile dominant folikülün ovule olması için yetecek LH miktarının sentezlenmesini engellemektedir. Dolaşımdaki progesteron miktarı, uterustan salgılanan PGF'in korpus luteumu lize etmesine kadar yüksek seyretmektedir (Forde ve ark., 2011).

2.5.3. Östrus Siklusu Boyunca Foliküler Dinamik

Sığırlarda primordial folikül gelişimi fötal dönemde başlar, gonadotropin bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki aşamada değerlendirilir (Webb, Garnsworthy, Gong, & Armstrong, 2004). Gonadotropin bağımlı dönem sığırlarda bir östrus siklusu boyunca iki ya da üç dalga şeklinde gerçekleşmektedir (Şekil 2). Her bir foliküler dalgada aday (emergence), seleksiyon (selection) ve dominant folikül (dominance) evreleri bulunmaktadır.



Şekil 2. Sığırlarda iki veya üç dalgalı östrus siklusu ve foliküler dinamik (Adams, Jaiswal, Singh, & Malhi, 2008)

Gonadotropin bağımlı dönem, foliküler dalganın üçüncü gününde granulosa hücreleri üzerinde FSH reseptörlerinin gelişmesiyle başlamaktadır. Reseptörlerin gelişimi ile dolaşımda bulunan FSH çapı ≥5 mm olan ve sayıları 5-20 arasında olan foliküller üzerine etkili olmaya başlar (Adams, Matteri, Kastelic, Ko, & Ginther, 1992). Ayrıca FSH miktarındaki artış ile granuloza hücrelerindeki aromataz aktivitesi (P450, CYP19) artmakta ve bunun sonucu olarak androjenler östrojene çevrilmeye başlamaktadır. Folikülün büyümeye başlamasıyla folikül sıvısı içersindeki östrojen ve inhibin konsantrasyonu da artmaya başlamaktadır. Büyümenin devam etmesiyle daha da artan östrojen konsantrasyonu negatif geri bildirim mekanizması ile inhibinin FSH üzerine baskı yapmasına ve konsantrasyonunun bazal seviyeye düşmesine neden olmaktadır (Sunderland, Crowe, Boland, Roceh, & Ireland, 1994).

Seçilim aşamasını geçen folikül giderek LH etkisi altına girmeye başlar ve büyümeye devam etmektedir (Ginther, Bergfelt, Kulick, & Kot, 2000). Östrus siklusu boyunca, folikül gelişimi gerçekleşirken folikülün FSH etkisinden LH etkisi altına girmesi granuloza hücreleri üzerindeki LH reseptörlerinin varlığına bağlıdır. Folikül geliştikçe teka hücreleri üzerindeki LH reseptör sayısı da artar ve seçilen folikülün dominant folikül olabilmesi için granuloza hücreleri üzerindeki LH reseptörlerine de ihtiyacı şekillenmektedir (Xu ve ark., 1995).

Erken luteal dönem (20-30 kez/24 saat) ve orta luteal dönem (6-8 kez/24 saat) boyunca gerçekleşen LH dalgaları mevcut dominant folikülün ovulasyonu için yeterli değildir (Fortune, 1994). Bu nedenden dolayı erken ve orta luteal dönemde gelişen dominant foliküller atrezi olmaktadır. Folikülün atrezi olması dolaşımdaki östrojen ve inhibin miktarını düşürerek negatif geri bildirim mekanizmasının etkisinin ortadan kalkmasını sağlar ve dolaşımdaki FSH konsantrasyonu artarak yeni foliküler dalgayı başlatır (Forde ve ark., 2011).

Dominant folikül, daha fazla miktarda östrojen üretmekte ve daha büyük folikül çapına sahiptir (Sunderland ve ark., 1994). Östrojen üretimi, teka hücrelerindeki androjen üretimine bağlıdır. Üretilen androjenler granuloza hücrelerinde aromataz aktivitesi ile östrojene çevrilir böylece östrojen konsantrasyonu artar. Östrojenin lokal olarak folikül gelişimi üzerine olan etkisinin yanında hipotalamusu etkilemek suretiyle sistemik etkisi de mevcuttur. Progesteron seviyesinin basal seviyede seyrettiği foliküler evrede, ovulasyon öncesi dominant folikülün ürettiği yüksek seviyede östrojen miktarı hipotalamustan GnRH salınımını uyarmaktadır. Dolayısıyla dolaşımda artan LH miktarı folikülü final olgunlaşmaya ve son olarak da ovulasyona taşımaktadır (Sunderland ve ark., 1994).

2.5.4. Östrus Siklusunda Korpus Luteumun Şekillenmesi ve Görevi

Ovulasyonu takiben, granuloza ve teka hücrelerinin lüteinleşmesi sonucu korpus luteum şekillenmektedir (Smith ve ark., 1994). LH, hücrelerin lüteinleşmesini sağlayan en etkili lüteotropik hormon olarak bilinir (Forde ve ark., 2011). Şekillenen korpus luteumun öncelikli görevi, yeteri kadar progesteron üreterek implantasyonun şekillenebilmesi, gebeliğin sürdürülebilmesi ve hipotalamustan salgılanan GnRH'ın

baskılanmasıdır (Lonergan, 2011). Luteal dönemde yüksek konsantrasyonda bulunan progesteron uterus üzerinde birtakım değişiklere neden olmaktadır. Luteal dönemin ortalarında, yüksek progesteron miktarı uterusun endometrium tabakasında bulunan progesteron reseptörlerini down-regülasyona uğratır. Hayvanın gebelik durumuna bağlı olmaksızın olan bu düzenleme, uterus gebelik için hazır hale getirmektedir (Spencer, Sandra, & Wolf, 2008). Luteal dönem sonu yani siklusun 15-17 günlerinde gebeliğin anne tarafından tanınmasını sağlayan interferon tau (IFN-τ) yeterli düzeyde sentezlenmez ise uterus endometriyumundan salgılanan $PGF_{2\alpha}$ ile luteolizis başlamaktadır (Okuda, Miyamoto, & Skarzynski, 2002). $PGF_{2\alpha}$ salgılanmasında arka hipofiz bezinden salgılanan oksitosin önemli rol oynamakta ve endometriyumda bulunan $PGF_{2\alpha}$ reseptörlerine bağlanarak salınımını başlatmaktadır (Silvia ve ark., 1991). Salgılanan $PGF_{2\alpha}$, uterus toplar damarları ile ovaryum atar damarı arasında geçişi engelleyerek luteolizisi sağlamaktadır. Luteolizisin başlamasıyla birlikte progesteron seviyesi azalamaya başlar ve artan östrojen miktarıyla yeni bir östrus siklusu başlamaktadır (Forde ve ark., 2011).

2.5.6. Östrus Siklusunun Evreleri

2.5.6.1. Proöstrus

Östrus başlangıcından 2-3 gün önceki döneme proöstrus denir ve bu dönemde yukarıda bahsedilen foliküler gelişim ve dolaşımdaki östrojen miktarının artışı şekillenmektedir. Östrojen miktarının artışı, dişi üreme organlarında ödem ve genişlemeye neden olmaktadır. Ayrıca davranış değişikliklerine de neden olmaktadır. Proöstrus döneminde olan inekler diğer ineklerin üzerine atlar ve vulva bölgesini koklar ancak kendi üzerine atlanmasına izin vermez ve çiftleşmeyi kabul etmezler. Ayrıca serviks uteri ve vajinadan ince bir salgı üretimi gerçekleşmektedir (Allrich, 1994).

2.5.6.2. Östrus

Östrus, östrojenin pik yaptığı ve çiftleşmenin kabülünün gerçekleştiği ovulasyondan önceki dönemdir. Proöstrus periyodunun bitimini takiben kızgınlık belirtilerinin ortaya çıkmasıyla östrus periyodu başlamaktadır. Kızgınlık belirtilerinin ortaya çıkmasında, dominant folikül tarafından üretilerek merkezi sinir sistemini etkileyen östrojen özellikle de östradiol rol oynamaktadır ve dolaşımda progesteron miktarının çok düşük düzeyde

olması gerekmektedir. Östrusta olan ineğin, boğanın ya da sürüdeki diğer hayvanların üstüne atlamasına izin verip durması (Standing) östrusun en önemli belirtisidir. Genellikle östrus belirtileri başladıktan 14-18 saat sonra belirtiler zayıflamaya başlar ve inekler sıklıkla takip edilmezlerse östrus belirtileri tespit edilemeyebilir. Ayrıca östrusun dış belirtileri tüm hayvanlarda görülemeyebilir (Roelofs, Van Eerdenburg, Hazeleger, Soede, & Kemp, 2006). Ahır zemini, grupta östrusta olan başka hayvan varlığı, boğa varlığı ve süt verim miktarı ineklerin östrus belirtileri göstermesinde ve süresi üzerine etkili olan çevresel faktörlerdir (Diskin, & Morris, 2008).

2.5.6.3. Metöstrus

Östrus periyodundan sonraki, ovulasyonu ve korpus luteumun şekillenmesini kapsayan 2-3 günlük süreç metöstrus olarak isimlendirilir. Ovulasyonun sonrasında östrojen miktarında ani düşüş şekillenir ve buna bağlı olarak da metöstrus kanaması şekillenmektedir. Metöstrus kanaması, östrus periyodunun bittiğinin göstergesidir.

2.5.6.4. Diöstrus

Ovulasyondan sonra fonksiyonel bir korpus luteumun şekillendiği dönemdir. Bu dönem tamamen progesteron kontrolündedir. Gebeliğin şekillenmeyip IFN-τ'nun sentezlenmediği durumda korpus luteum ovulasyondan sonraki 17-18. güne kadar fonksiyonel kalmaktadır. Korpus luteumun regrese olmaya başlamasıyla dolaşımda progesteron miktarı düşer ve buna bağlı olarak hipotalamus ve hipofiz üzerindeki baskı kalkarak var olan dominant folikül ovulasyona gitmektedir.

2.6. Sütçü İneklerde Reprodüktif Yönetim

2.6.1. Östrus Tespiti

Diğer hayvanların üzerine atlamasına izin vermesi ve durması östrusta olan hayvanın en belirgin göstergesidir. Östrusta olan hayvanlar sürekli hareket halinde, gergin ve arayış içerisindedirler (Roelofs ve ark., 2006). Ayrıca sağrı bölgesindeki kılların kalkık veya eksilmiş olması, sağrı bölgesinin basınca karşı duyarlı olması, vulva bölgesinin gevşemesi ve diğer hayvanlar tarafından koklanıp yalanması ve kuyruğun hareketli olup diğer hayvanların çenelerini bu bölgeye dayamaları da östrus belirtilerindendir. Üstüne atlanan ineğin durması, tohumlama için uygun olduğunun kuvvetli bir göstergesidir (Diskin & Morris, 2008).

Östrus tespitinin ana amacı, ineklerde gebelik ihtimalinin yüksek seviyede olduğu zamanı belirleyip, doğru zamanda tohumlama yapmaktır. Östrus tespiti sığır endüstrisinde çok önemli ve stratejik bir yere sahiptir. Kullanılacak tespit yöntemlerinin non invaziv, basit, ucuz ve hızlı bir şekilde bilgi verebilir olması gerekmektedir (Senger, 1994).

2.6.1.1. Sürü Bazında Kullanılan Östrus Tespit Yöntemleri

2.6.1.1.1. Kayıtlar ve Gözlem Yoluyla Östrus Tespiti

İşletmelerde iyi ve güvenilir kayıt tutmak östrus tespitinin daha etkili yapılabilmesine olanak sağlayacaktır. Kayıt sistemi sayesinde östrusta olduğundan şüphelenilen hayvanların önceki kayıtlarına bakılarak karar verilebilir (Diskin, & Sreenan, 2000).

Gözlem yoluyla yapılan östrus tespitinde, üzerine atlanılan hayvanın durup durmadığına göre karar verilir ve bu yöntem küçük işletmeler için etkili ve yeterli ancak büyük işletmeler için yetersiz ve pratik olmayan bir yöntemdir. Çünkü büyük işletmelerde sadece yemleme ve sağım zamanı kısıtlı şekilde gözlem yapılabilir. Ayrıca yapılan bir araştırmada, östrus tespitini % 50-70 etkinlikte yapabilmek, işçilik maliyetini %30 oranında arttırmıştır (Firk, Stamer, Junge, & Krieter, 2002).

Gözlem yoluyla östrus tespitinin doğruluğunu etkileyen birçok faktör vardır. Gözlemcinin tecrübesi ve östrus belirtilerinin güçlü olması daha etkili gözlem yapabilme imkanı sunar. Ancak östrus belirtileri güçlü dahi olsa yetiştiriciler ancak %58 oranında tespit edebilmektedirler (At-Taras, & Spahr, 2001). Sabah erken ve akşam olmak üzere günde en az iki defa 30 dakika gözlem yapmak etkili bir gözlem için olması gereken minimum süredir.

2.6.1.1.2. Pedometre ile Östrus Tespiti

Östrus periyodundaki sığırlar normalden daha hareketlidirler. Bu hareket artışının pedometre ile ölçülmesi mümkündür (Stevenson, 2001). Hayvanın bağlı olmaması, rahatça hareket edebilmesi ve yeterli hareket alanının olması sistemin etkinliği açısından önemlidir.

Hareket dedöktörü ile her bir hayvan hakkında sürekli ve güvenilir bilgiye sahip olmak daha az işçilik ile daha doğru zamanda tohumlamayı mümkün kılar (Senger, 1994). Gözlem metodu ile pedometrenin verimliliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada,

pedometre ile östrus tespiti yapmak günde 2 defa gözlem yoluyla östrus tespiti yapmaktan daha etkili iken günde 4 defa gözlem yoluyla östrus tespiti yapmayla aynı etkinlikte olduğu bildirilmiştir (Stevenson, 2001). Yine iki metodun karşılaştırldığı bir çalışmada, doğum sonrası ilk üç ovulasyondaki östrus belirtileri karşılaştırlmış. Gözlem yoluyla %19-79 oranında östrus tespiti yapılabilinirken, pedometre ile %57-93 oranında östrus tespiti yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda yapılan başka bir çalışma sonucunda ise pedometre ile %91 oranında östrusların tespit edilebileceği ve %8 oranında yanlış pozitiflik elde edilebileceği ortaya konmuştur (Stevenson, 2001).

2.6.1.1.3. Kuyruk Boyama Yöntemi ile Östrus Tespiti

Kuyruk boyama yöntemi ile östrusların tespiti yöntemi 1970'lerin sonunda Yeni Zellanda'da ortaya çıkmıştır ve bu sayede %90'nın üzerinde suni tohumlama oranı yakalanmıştır. Kuyruğunun üst kısmı boyalı olan ineğin üzerine atlanılmasına izin vermesiyle boya silinir ve bu sayede östrus tespiti yapmak kolaylaşır (Skenandore, & Cardoso, 2017). Gözlem metodu, elektronik atlama dedektörü ve aktivite ölçen sistemlerle karşılaştırıldığında onlar kadar hassas ve güvenilir bir yöntem olduğu belirtilmektedir ve yapılan çalışmalarda östrus tespit oranı % 44 ile % 96 arasında değiştiği bildirilmiştir (Diskin, & Sreenan, 2000). Ancak sığırlar arasındaki birbirini yalama veya sürtünme gibi sosyal davranışlardan dolayı %5 oranında yanlış pozitiflik görülebilir (Skenandore, & Cardoso, 2017).

2.6.1.1.4. Atlama Dedektörü ile Östrus Tespiti

Gözlem yoluyla östrus tespiti metodunu desteklemek üzere atlama dedektörleri geliştirilmiştir. Sığırların sağrı bölgesine yerleştirilen bu dedektörler sayesinde, diğer hayvanların üzerine atlamasıyla renk değişikliği oluşmakta ve bu sayede östrus tespiti yapılabilmektedir (Stevenson, 2001). Östrus periyodunda artan harekete ve hayvanlar arası sosyal aktiviteye bağlı olarak dedektörün düşmesi veya yanlış pozitif sonuçların görülmesi olabilir. Ancak uygulamasının ve kullanımının kolay olmasının yanında işçiliğinin de az olmasından dolayı atlama dedektörleri gayet pratiktir.

2.6.1.1.5. Aktivite-Ruminasyon Takip Sistemi ile Östrus Tespiti

Bu sistemin aktivite takip sisteminden farkı günlük olarak dakika bazında ruminasyon süresi hakkında da bilgi vermesidir. Bu sistemde boyun tasmaları ile ölçüm

yapılmaktadır. Sürekli bilgi akışının olduğu sistemde, gelen bilgiler (aktivite-ruminasyon) grafik olarak her iki saatte güncellenmektedir (Valenza ve ark., 2012). Östrus gösteren inekler normal zamandan daha aktiftirler fakat her aktif ineğin de östrusta olmayabileceği unutulmamalıdır.

Ruminasyon süresi çiftliklerde genellikle metabolik hastalıklarının, buzağılama zamanının ve verilen rasyon hakkında ayrıntılı bilgiye sahip olmak için kullanılmaktadır (Soriani, Trevisi, & Calamari, 2012). Ancak östrus günü artan hareketliliğe ve huzursuzluğa bağlı olarak beslenme süresinin ve dolayısıyla da ruminasyon süresinin azaldığı tespit edilmiştir (Pahl, Hartung, Mahlkow-Nerge, & Haeussermann, 2015). Başka bir çalışmada da östrustaki ineklerin ruminasyon sürelerinin normal zamana göre 74-83 dakika daha az olduğu tespit edilmiş ve östrus tespitinde kullanılabilecek bir yöntem olabileceği kanaatine varılmıştır. Ancak ruminasyon süresinin metabolik hastalıklar, yem alımı ve sıcaklık stresi gibi başka nedenlere bağlı olarak azalabileceği de unutulmamalıdır (Reith, Brandt, & Hoy, 2014).

Östrus tespit yöntemlerinin tek başlarına kullanıldıklarında değişen oranlarda yanlış pozitif sonuç verdikleri göz önünde bulundurulduğunda bu sistem ile aynı anda iki değişenin değerlendirilmesi östrusları daha güvenilir olarak belirlemeye ve çok daha az yanlış negatif sonuç almaya yardımcı olacaktır (Roelofs & Van Erp-van der Kooij, 2015). Sistemin her hayvan için bireysel ve sürekli olarak veri sunabilmesi çiftlik şartlarında yönetimsel olarak da büyük kolaylık sağlamaktadır.

2.6.1.1.6. Süt Verimi ile Östrus Tespiti

Östrus periyodunda olan sığırlar normal zamana göre daha aktiftir ve daha az yem tüketirler. Buna bağlı olarak da süt verimlerinde bir önceki güne göre düşüş gözlemlenmektedir. Yapılan çalışmalarda östrus günü süt verimin de %2 ile %8 süt verim düşüklüğü tespit edilmiştir. Ancak süt veriminde başka nedenlere bağlı olarak da düşüşler şekillenebilir. Östrusa bağlı verim düşüklüğü var ise bir sonraki sağımda süt miktarının yükselmesi gerekir. Yapılan çalışmalarda her östrusta süt veriminde düşüş olmadığı ve östrustaki hayvanlardan sadece %33'ünde süt verim düşüklüğü görüldüğü tespit edilmiştir. Süt veriminin birçok faktörden etkilenebildiği ve her östrusta süt verim

düşüklüğü olmayabileceği göz önünde bulundurulduğunda çok güvenilir bir yöntem olmamasına rağmen yardımcı olarak kullanılabilmektedir (Firk ve ark., 2002).

2.6.1.2. Bireysel Östrus Tespit Yöntemleri

2.6.1.2.1. Progesteron Seviyesinin Değerlendirilmesi ile Östrus Tespiti

Dolaşımda bulunan progesteron miktarı, hayvanın bulunduğu siklus dönemine göre değişir ve siklusun her döneminde ölçülebilmektedir.

Östrus siklusunun luteal döneminde progeteron miktarı 1 ng/ml den yüksektir. Siklusun 10 ile 17. günleri arasında 10 ng/ml olan progesteron miktarı 17. günden sonra 3 ng/ml ye düşmektedir. Ovulasyona yakın zamanda tespit edilen progesteron miktarı ise <1 ng/ml dir (Firk ve ark., 2002).

Progesteron testi östrus tespiti için kullanılabilir ancak pahalıdır ve işçilik maliyetini arttırmaktadır. Daha kolay kullanım için biyokimyasal sensörler geliştirilmiş ve saha şartlarında denenmiştir. Biyokimyasal sensörlerin östrus ve gebeliği tespit edebileceği ispatlanmıştır. Ayrıca otomatik sağım sistemlerine entegre edilip kullanılabileceği bildirilmiştir (Firk ve ark., 2002).

2.6.1.2.2. Vajinal Mukus Direnci ile Östrus Tespiti

Hormonal değişiklikler, östrus siklusu boyunca vajinal mukusun elektriksel direncini etkilemektedir. Bu değişiklikler ölçülerek östrus tespiti yapılabilir ve tohumlama zamanı için bize bilgi verebilir. Elektriksel direnç luteal dönem boyunca yüksek seyrederken foliküler fazın başlamasıyla düşmeye başlar. En düşük vajinal mukus direnci ise ovulasyondan 25 saat önce tespit edilebilmektedir. Vajinal mukus direnci, östrus siklusunun dönemlerine göre farklı değerlerde ölçülse de östrus siklusuyla alakalı olmayan bazı durumlardan da etkilenmektedir. Örneğin kist veya üreme organlarında yangı oluşursa elektriksel iletkenlik östrus periyodunda ölçüldüğü gibi düşük ölçülür. Uygulamasının zor, bireysel ölçümler zaman aldığı ve östrusla ilişkili olmayan faktörlerden etkilenebildiği için kullanımı çok pratik değildir (Rorie, Bilby, & Lester, 2002).

2.6.1.2.3. Vücut Isısı ile Östrus Tespiti

Normal vücut ısısı 38,6 °C olan ineklerin vücut ısısı rektal yolla, implant yardımıyla ve sütten ölçülebilmektedir. Yapılan araştırmalarda ineklerin vücut ısılarında östrus siklusu

boyunca değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. Östrus siklusundan 2 gün önce minimum seviyeye düşen vücut sıcaklığı, östrus periyodu boyunca 0,1-0,5 °C artmıştır. Rektal yolla çok pratik olmayan vücut ısısı ölçümünü vücuda yerleştirilebilen bir implant yoluyla da yapmak mümkündür. Ancak implant yardımıyla yapılan ölçümlerin rektal yolla yapılan ölçümden 1,1-1,6 °C yüksek olduğu belirtilmiştir. Çevresel sıcaklıktan, vücuttaki ölçüm yerinden, ölçüm metodundan ve hatta hayvanın hareketlerinden etkilene bilen vücut ısısı östrustaki hayvanları belirlemek için spesifik bir indikatör değildir (Firk ve ark., 2002).

2.6.2.Sütçü İneklerde Reprodüksiyonun Farmakolojik Kontrolü ve Senkronizasyon Kavramı

Sağmal ineklerin reprodüktif yönetiminde karşılaşılan en büyük problemlerden bir tanesi östrus tespitinin yeteri kadar yapılamamasıdır. Yetersiz östrus tespiti, daha az sayıda inek veya düvenin tohumlanmasına neden olmaktadır. Düve ve ineklerin ideal zamanında tohumlanamaması ilk doğum yaşını ve iki buzağılama arası süreyi uzatırken karlı bir işletme için hedeflenen optimum fertilite parametrelerinin gerçekleştirilememesine neden olmaktadır. Östrus tespitinin etkinliği, yeterli gözlem koşullarına sahip olunmaması, yüksek süt verimine bağlı olarak östrus sürelerinde azalma, kötü barınak koşuları ve ayak hastalıkları gibi nedenlerden dolayı oldukça azalmaktadır (Fricke ve ark., 2014). Hormonal uygulamaların kullanımı ile işletmedeki östrusları gruplar halinde uyarmak bir başka deyişle senkronize etmek östrus tespitinin etkinliğini ve tohumlanan hayvan sayısını arttırmaktadır. Bu nedenden dolayı östrus senkronizasyon protokolleri uygulanmaya başlanılmıştır. Daha sonrasında zaman ayarlı suni tohumlama protokolleri geliştirilerek östrus tespitine gerek kalmadan hayvanları tohumlama imkanı elde edilmiştir. Günümüzde sağmal işletmelerin çoğu reprodüktif yönetim stratejilerinde ovulasyon senkronizasyon protokollerini temel almaktadır (Ferguson, & Skidmore, 2013). Ovulasyon senkronizasyon protokolleri sayesinde postpartum ilk tohumlamaya kadar geçen süre ve açık gün sayısı azalmaktadır. Ovulasyonların senkronizasyonları için kullanılan protokollerin etkinliğini arttırmak amacıyla presenkronizasyon protokolleri kulanılmaya başlanmıştır ve elde edilen gebelik oranlarında artış sağlanmıştır (Stangaferro, Wijma, & Giordano, 2019).

2.6.2.1. Senkronizasyonun Tarihçesi

Östrus senkronizasyonu, çeşitli progesteron kaynaklarının kullanımıyla ilk olarak 1960'lı yıllarda uygulanmaya başlanmıştır. Progesteron kaynağının kullanılmasıyla yapay bir luteal faz oluşturularak iki östrus arasındaki süre uzatılabilmektedir. Progesteronun tek başına kullanımı, östrus siklusunun uzunluğunu etkileyen ve östrusların senkronize edilebilmesine olanak sağlayan en basit yöntemdir (Mac Millan ve ark., 1990). Melengestrol asetat, östrus senkronizasyonu için kullanılabilen ilk ticari preperattır. Oral olarak uygulanılan bu progesteron kaynağının kullanımının bırakılmasından iki gün sonra başlamak üzere östrusların tespitinin dört gün içerisinde gerçekleşmesini sağlar. Daha sonrada süt ve besi sığırlarında doğum sonrası dönemde östrus siklusunun uyarılıp başlatılması için kullanılmış ve farklı oranlarda başarı sağlanmıştır (Kyle, Callahan, & Allrich, 1992). Daha sonra uygulama kolaylığı olması açısından intravajinal olarak kullanılabilen progesteron kaynağı geliştirilmiş ve intravajinal progesteron kaynağının kullanılmasıyla senkronizasyon ve fertilite oranlarının daha iyi oranlarda elde edildiği tespit edilmiştir. Ancak intravajinal progesteron kaynağının kullanım süresi hakkında kesin sınırlar koyulamamıştır. Genel olarak intravajinal progesteron kaynağı ne kadar uzun süre kullanılırsa o kadar iyi östrus senkronizasyonu yapılabilmektedir. Ancak uzun süre progesteron etkisi altında kalan hayvanlar daha düşük fertilite verilerine sahip olmaktadır. Ayrıca uzun dönem progesteron kullanımı hayvanlarda kalıcı ve östrojen sentezleyen (kistik) folikül gelişimine neden olmaktadır (Sirois, & Fortune, 1990). Progesteronun tek başına 14-18 gün kullanımından sonra elde edilen düşük gebelik oranları, araştırmacıları östrus senkronizasyonu için östradiol ve gonadotropinler ile bazı modifikasyonlar yapmaya yönlendirmiştir.

Östradiol, progesteron tedavisinden sonra östrus dış belirtilerinin ve ovulasyonun uyarılması için kullanılmaya başlanmıştır. Çünkü östradiol, yüksek progesteron etkisi altında, mevcut folikülün atreziye olmasına ve yeni bir folüküler dalganın başlamasına neden olurken düşük progesteron etkisi altında mevcut folikülün ovulasyonunu uyarmaktadır. Böylece daha iyi bir senkronizasyon sağlanmıştır (Lucy, McDougall, & Nation, 2004). Besi sığırlarında uzun dönem (9-14 gün) progesteron enjeksiyonundan

sonra uygulanan tek doz östradiol ile östrus ve ovulasyonun başarılı bir şekilde uyarıldığı tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, postpartum dönemde uzun süreli oral progesteron tedavisinden sonra uygulanan 5 mg östradiolün ilk östrus ve ovulasyon için gerekli olan süreyi kısalttığı ve uygulama yapılmayanlara göre gebelik oranlarını yükselttiği (%96-%88) bildirilmiştir. Avrupa Birliği'nin gıda üretimi yapılan hayvanlarda östradiolün kullanımını yasakladığı 2003 yılına kadar, progesteron-östradiol protokollerinin Yeni Zellanda'da östrus göstermeyen sığırlar için kullanılan en yaygın protokoller olduğu bildirilmiştir (Lucy ve ark., 2004; Rhodes, McDougall, Burke, Verkerk, & Mac Millan, 2003).

Sığırlarda $PGF_{2\alpha}$'nın lüteolitik etkisinin keşfedilmesinden sonra östrus senkronizasyonlarında tek veya çift doz (10-12 gün aralıklı) olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak $PGF_{2\alpha}$, sadece fonksiyonel bir luteal doku (korpus luteum) varlığında etki göstermektedir (Mac Millan ve ark., 1990). Bu yüzden uygulanan $PGF_{2\alpha}$, düvelerde östrus siklusunun 5-17. günleri arasında, sığırlarda ise 7-17. günleri arasında etki göstermektedir (Xu ve ark., 1995). Tedaviye cevap veren hayvanlar 6 gün içerisinde östrus göstermektedir. Korpus luteuma sahip olan ineklerde $PGF_{2\alpha}$ uygulaması sonrası %52'sinin uygulama sonrası 6 gün içerisinde östrus belirtisi gösterdiği bildirilmiştir (Whittier, Gwazdauskas, & McGilliard, 1989).

Çift doz $PGF_{2\alpha}$ uygulamaları, daha sonrasında zaman ayarlı tohumlama protokolleri ile birlikte denenmeye başlanmıştır. Bu uygulama ile östrus takibi yapılmaksızın hayvanlar 80. saatte tek sefer ya da 72 ve 96. saatlerde 2 sefer olmak üzere tohumlanabilmektedir. İki $PGF_{2\alpha}$ arasındaki süre 11 gün olduğunda ikinci uygulama anında fonksiyonel bir korpus luteum olma ve cevap verme şansının daha yüksek olduğu kanısına varılmıştır. Düvelerde iki $PGF_{2\alpha}$ uygulaması arası 11 gün olarak yapılan bir çalışmada, ikinci uygulama sonrası düvelerin %80'i östrus göstermiştir. Düvelerde 11 gün ara ile çift doz $PGF_{2\alpha}$ uygulamasının ve bunu takiben 2. dozdan sonra 72 ve 96. saatlerde çift kör tohumlama yapılarak %23-58 oranında gebelik oranları elde edilmiştir (Kaim, Rosenberg, & Folman, 1990).

$PGF_{2\alpha}$ uygulaması ile yapılan östrus senkronizasyonu sonrasında östrus gösterme süresi uygulama sonrası, uygulama anındaki foliküler dalganın durumuna bağlı olarak 2

ile 7 gün arasında değişmektedir (Savio, Thatcher, Badinga, de la Sota, & Wolfenson, 1993).

Daha sonrasında $PGF_{2\alpha}$ ve progesteron kombine edilerek uygulanmaya başlanmıştır. Progesteronun, 5-7 gün uygulamasını takiben progesteron kaynağı ortamdan uzaklaştırılarak aynı anda $PGF_{2\alpha}$ uygulamasının hem progesteron uygulama süresini kısalttığı hem de uygulamanın yapıldığı hayvanların daha yüksek oranlarda östrus gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonraki modifikasyon ise progesteron kaynağı uzaklaştırılmadan bir gün önce $PGF_{2\alpha}$ uygulamasıdır. Bu modifikasyon ile çok daha iyi östrus oranları elde edilmiş ve tek doz suni tohumlama uygulamasına imkan sunmuştur. Ayrıca progesteron kaynağının 5 gün kullanıldığı ve çift doz $PGF_{2\alpha}$ uygulamasının yapılmasıyla da çok iyi senkronizasyon ve gebelik oranları elde edilmiştir (Xu ve ark., 1995).

Amerika Birleşik Devletleri'nde progesteron kaynağının ticari olarak satılmadığı dönemde Ovsynch senkronizasyon protokolü geliştirilmiştir. 1995 yılında geliştirilen Ovsynch protokolü hem foliküler gelişmeyi hem de korpus luteumun gelişimini ve lizisini senkronize ederek zaman ayarlı suni tohumlama yapmaya imkan sağlamaktadır (Pursley, Mee, & Wiltbank, 1995). Ovulasyonun senkronize edildiği bu protokolde östrojen pikinden önce ovulasyon uyarıldığı için protokole tabi tutulan ineklerin genellikle östrus belirtilerini göstermedikleri tespit edilmiştir.

Geçmişten günümüze kadar geliştirilen ve halen de geliştirilmeye devam eden besi ve süt sığırı endüstrisinde kullanılmak üzere birçok senkronizasyon protokolü bulunmaktadır. Bu protokollerin birbirlerine olan üstünlükleri ve eksiklikleri vardır. Protokolleri genel olarak, östrus senkronizasyonu yapan protokoller ve ovulasyon senkronizasyonu yapan protokoller olarak iki ana başlıkta toplanmaktadır. Hangi protokolün kullanılacağını ise işletme türü, hayvan türü ve işletme modeline göre değişmektedir.

2.6.2.2. Zaman Ayarlı Suni Tohumlama Protokolleri

Zaman ayarlı suni tohumlama protokolleri, östrus tespiti yapılmaksızın hayvanların belli saatte ya da zaman aralığında tohumlanabilmesini mümkün hale getirmektedir. Zaman ayarlı suni tohumlama protokolleri östrus tespitinin yeteri kadar yapılamadığı ya

da ineklerin östrus göstermediği durumlarda fertilite verilerinin iyileştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Süt sığırı işletmelerinde, tohumlama başına gebelik oranının ve östrus gösteren hayvan sayısının azalması fertilite yönetimini olumsuz etkilemekte ve verilerin düşmesine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, doğum sonrası ilk tohumlama sonucu sütçü ineklerin %60'ının gebe kalmadığı tespit edilmiştir (Chebel ve ark.,2004; Galvao ve ark.,2007). Ayrıca tohumlama sonrası gebe kalmayan hayvanların %60'tan azı gebelik muayenesinden önce östrus gösterip tekrar tohumlanmaktadır (Dewey ve ark., 2010). Elde edilen bu oranlar günümüz şartlarında süt sığırı işletmelerinin karlılığı için yeterli olmamaktadır. Boş geçen gün sayısının, iki tohumlama arası sürenin, buzağılama aralığının artmaması ve süt veriminin düşmemesi için ineklerin bizim belirlediğimiz karlılığının optimum seviyede olduğu zamanda gebe kalması sağlanmalıdır. Bu nedenle, süt sığırı işletmelerinde karlılığı azaltan bu faktörleri engellemek için östrus siklusunu ve ovulasyonu senkronize edebilmemize olanak sağlayan zaman ayarlı tohumlama protokolleri geliştirilmiştir. Bu protokoller sayesinde östrus tespiti gerektirmeksizin, ineklerin belirlenen zamanda tohumlanması ve ideal gebelik oranlarının elde edilmesi sağlanabilmektedir. Aşağıda sağmal ineklerde reprodüksiyonun yönetimi amacıyla yaygın biçimde kullanılan zaman ayarlı suni tohumlama protokollerine ve etkinliklerine değinilmiştir.

2.6.2.2.1. Ovsynch Protokolü

Günümüzde çok yaygın bir şekilde kullanılan ve birçok senkronizasyon protokolünün temelini oluşturan Ovsynch protokolü ile östrus tespitine gerek kalmaksızın, ovulasyonu senkronize edip zaman ayarlı suni tohumlama yapabilmektedir. GnRH uygulaması ile başlayan protokolde 7. gün $PGF_{2\alpha}$, 9. gün GnRH uygulanır ve bundan 0-24 saat sonra da suni tohumlama yapılır (Şekil 3). Ovsynch protokolü uygulandığında, ovulasyon son GnRH uygulamasından 24-32 saat içerisinde gerçekleşir (Pursley ve ark., 1995). Bu protokol ile çok sayıda ineğin senkronize edilmesi, tohumlamaya uygun olan tüm hayvanların aynı günde tohumlanabilmesi (kör tohumlama) mümkündür (Pursley ve ark.,1998).



Şekil 3. Ovsynch protokolü. (Pursley ve ark., 1995)

Ovsynch protokolünde tohumlama zamanının gebelik oranları üzerine etkisinin ortaya konulması amacıyla son GnRH uygulamasından 0, 8, 16, 24 ve 32 saat sonra tohumlamalar yapılmış ve tohumlamanın son GnRH uygulamasından 16 saat sonra yapılmasının ideal tohumlama zamanı olacağı bildirilmiştir (Pursley ve ark., 1998).

1995 yılında Ovsynch protokolünde ilk olarak PGF uygulaması ile son GnRH uygulaması arasındaki süre 48 saat olarak (Ovsynch 48) uygulanmıştır. Ovulasyonun indükleneceği (son GnRH uygulaması ile) optimal zamanın bulunması amaçlanan çalışmada son GnRH uygulaması PGF uygulamasında 56 saat sonra (Ovsynch 56) uygulanmış ve 48 saat uygulamaya göre daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir (Brusveen ve ark., 2008).

Ovsynch prtotokolü sonucu elde edilen gebelik oranları %35-60 arasında değişmektedir (Wiltbank, & Pursley, 2014). Protokolde uygulanan hormonlara alınan yanıt ve ineklerin senkronize olma oranları farklı olduğu için protokol sonucu elde edilen gebelik oranları geniş bir skaladadır. Protokole östrus siklusunun herhangi bir döneminde başlandığında, ineklerin %10-30'unda ovulasyonun senkronize edilemediği ve gebelik oranlarının düşük olduğu bildirilmektedir (Vasconcelos, Silcox, Rosa, Pursley, & Wiltbank, 1999). Yapılan çalışmalarda, Ovsynch protokolüne siklusun 5-12. günleri arasında başlanılmasının daha iyi senkronizasyon oranlarına sahip olunmasını tespit edilmiştir. Çünkü belirtilen günler arasında protokole başlandığında ilk GnRH uygulaması ile mevcut folikülün ovule olması, yeni bir foliküler dalganın başlaması ve senkronize edilen dominant folikülün protokol sonunda ovule olması sağlanacaktır (Moreira, Orlandi, Risco, Mattos, Lopes, & Thatcher, 2001). Eğer ilk GnRH uygulaması sonucu mevcut folikül ovule olmaz ise, protokol sonunda yaşlanmış bir folikül ovule olur ve bu da embriyo kalitesini olumsuz yönde etkilerken gebelik oranlarının düşmesine neden olmaktadır (Cerri, Rutigliano, Bruno, & Santos, 2009).

2.6.2.2.2. Cosynch Protokolü

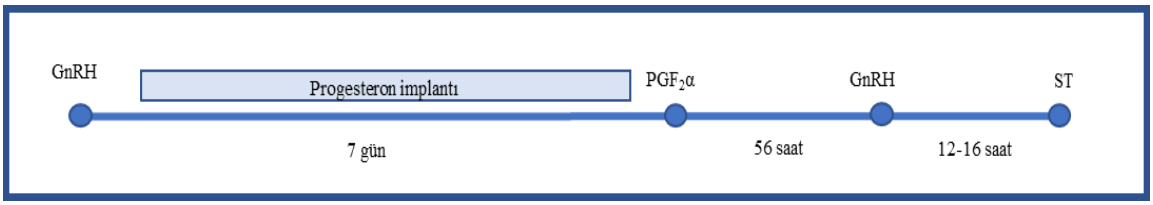
Ovsynch protokolü modifiye edilerek son GnRH uygulaması ile birlikte suni tohumlamanın yapıldığı protokol, Cosynch protokolü olarak adlandırılır (Geary, Whittier, Thrift, & Dolezal, 1998)(Şekil 4). Bu protokol genellikle hayvanları kilide alma ve uygulama sayısının azaltılmak istendiği besi sığırlarında kullanılmaktadır. Yapılan tohumlama ve ovulasyon arasındaki sürenin daha uzun olmasından dolayı gebelik oranları Ovsynch protokolüne göre daha düşük elde edilmektedir (Geary ve ark.,1998).



Şekil 4. Cosynch protokolü (Geary ve ark.,1998)

2.6.2.2.3. Progesteron Tabanlı Ovsynch Protokolü

Ovsynch temelli zaman ayarlı suni tohumlama protokollerinde gebelik oranlarını arttırmaya yönelik yapılan bir başka uygulama, ilk GnRH uygulaması ile $PGF_2\alpha$ uygulaması arasında intravajinal progesteron kaynağı kullanımıdır (Şekil 5). Sağmal ineklerde yapılan bir çalışmada, zaman ayarlı tohumlama protokolünde progesteron kaynağı kullanımı sonucu elde edilen gebelik oranları progesteron kaynağı kullanılmayanlardan daha yüksek (%34-30) tespit edilmiştir. Ayrıca progesteron kaynağının, korpus luteuma sahip olan ile olmayan ineklerdeki pozitif etkisinin benzer olduğu tespit edilmiştir (Bisinotto ve ark., 2014).



Şekil 5. Progesteron tabanlı protokolü (Stevenson ve ark., 2008)

Zaman ayarlı suni tohumlama protokolü başlangıcında korpus luteuma sahip olmayan hayvanlarda progesteron kaynağı kullanımı nonsiklik ineklerde fertilite verilerini iyileştirmektedir ancak bu veriler zaman ayarlı tohumlama protokolü başlangıcında diöstrus periyodunda olan hayvanların fertilite verileri kadar iyi olmamaktadır. Bunun

sebebi progesteron kaynağının korpus luteum kadar progesteron üretememesidir (Stevenson, 2016). İneklerde yapılan bir çalışmada, Ovsynch protokolü başlangıcında korpus luteuma sahip olmayan hayvanlara progesteron kaynağı yerleştirilmiş ve korpus luteuma sahip olan hayvanlar ise kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Gebelik muayenesi sonucu, kontrol grubunda (%38) tedavi grubuna göre daha yüksek gebelik oranı elde edilmiştir. Progesteron kaynağı kullanılanlarda ise kullanılmayanlara göre daha yüksek gebelik oranları (%32-24) elde edilmiştir (Stevenson ve ark., 2008). Yapılan başka bir çalışmada ise korpus luteuma sahip olmayan hayvanlar iki gruba ayrılmış ve bir kısmında iki adet progesteron kaynağı kullanılır iken diğerlerinde kullanılmamıştır. Korpus luteuma sahip olan hayvanlar ise kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Gebelik muayenesi sonucu iki adet progesteron kaynağı kullanılan hayvanların gebelik oranları progesteron kaynağı kullanılmayanlardan daha yüksek (%42-31) tespit edilmiştir. Kontrol grubu ve iki adet progesteron kaynağı kullanılan grup arasında ise fark bulunmamıştır (Bisinotto ve ark., 2015).

2.6.2.2.4. Presynch Ovsynch Protokolü

Zaman ayarlı suni tohumlama başlangıcında hayvanın östrus siklusunun belirli günlerinde olması elde edilen gebelik oranlarını etkilemektedir. Östrus siklusunun 5-12. günleri arasında zaman ayarlı tohumlama protokollerine başlanıldığında ilk GnRH uygulamasına alınan cevap ve elde edilen gebelik oranları östrus siklusunun diğer zamanlarında protokollere başlanıldığında elde edilen sonuçlardan daha yüksektir. Presynch olarak isimlendirilen protokolde 14 gün ara ile uygulanan çift doz $PGF_{2\alpha}$ uygulaması ile zaman ayarlı tohumlama protokolünün bahsedilen ideal aralıkta başlatılabileceği tespit edilmiştir (Moreira ve ark., 2001).

Presynch uygulamasından kaç gün sonra zaman ayarlı tohumlama protokolüne başlanılacağı konusunda ise farklı çalışmalar vardır. İki $PGF_{2\alpha}$ uygulamasından 14 gün, 11 gün ve 10 gün (Presynch-14, Presynch-11 ve Presynch-10) sonra zaman ayarlı tohumlama protokolüne başlamak aslında zaman ayarlı tohumlama protokolüne siklusun kaçıncı günü başlanılacağını belirlemektedir (Şekil 6).



Şekil 6. Presynch Ovsynch protokolü (Moreira ve ark., 2001)

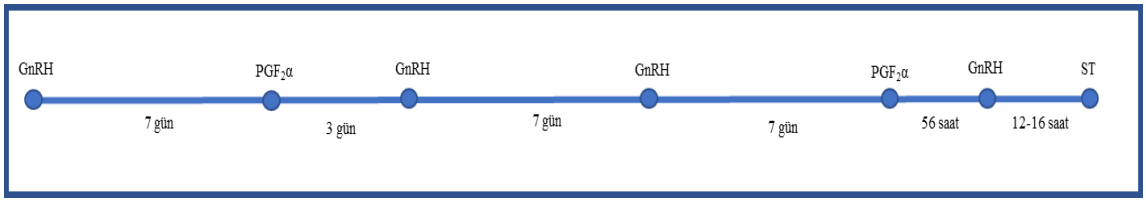
Presynch ile Ovsynch arasındaki sürenin, 14 gün olması siklusun 9-12. günlerinde, 11 gün olması siklusun 6-9. günlerinde ve 10 gün olması siklusun 5-8. günlerinde Ovsynch protokolüne başlangıç yapılabilmesine imkan vermektedir (Stevenson, 2016). İneklerde Presynch-11 ve Presynch-14 protokollerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, Presynch-11 protokolünün gebelik oranlarını arttırdığı (%40,5-33,5) tespit edilmiştir (Galvão, Sa Filho, & Santos, 2007). Gebelik oranlarının daha iyi olmasının sebebi, Presynch ile Ovsynch protokolü arasındaki süre 11 gün olduğunda, daha fazla sayıda ineğin siklusun ideal günlerinde olması olabilir. Ayrıca iki protokol arasında ki sürenin daha da kısaltılması gebelik oranlarını negatif yönde etkileyebilmektedir (Colazo, Ponce-Barajas, & Ambrose, 2013). Presynch gibi ön senkronizasyon protokollerinin zaman ayarlı suni tohumlama protokolünün etkinliğini arttırdığı gibi, $PGF_{2\alpha}$ uygulaması sonucu östrus gösteren inekleri tohumlamamıza da imkan vermektedir (Stevenson, 2016).

2.6.2.2.5. Double Ovsynch Protokolü

$PGF_{2\alpha}$ tabanlı ön senkronizasyon protokollerinin bir dezavantajıı ise nonsiklik ineklerde etkinlik gösterememesidir. Gönüllü bekleme süresi sonunda hala östrus gösterememiş ineklerin oranı değişmekle birlikte %41'e kadar yükselmektedir. Ard arda iki Ovsynch protokolünün uygulandığı protokol Double Ovsynch protokolüdür (Souza, Ayres, Ferreira, & Wiltbank, 2008)(Şekil 7). Bu gibi durumlarda $PGF_{2\alpha}$ uygulamasının yanında GnRH uygulaması da yapılan Double Ovsynch, PG-3-G ve G-6-G protokolleri ile gebelik oranları 1,6 kat daha fazla elde edilebilmektedir (Bisinotto, Riberio, & Santos, 2014). Yapılan bazı çalışmalarda Double Ovsynch ve PG-3-G protokolleri ile Presynch-10 ve Presynch-12 karşılaştırılmış ve GnRH uygulaması içeren (Double Ovsynch ve PG-3-G) protokollerde gebelik oranlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Herlihy ve ark., 2012; Souza ve ark., 2008; Stevenson, & Pulley, 2012).

Örneğin Double Ovsynch protokolü uygulanan hayvanlarda Ovsynch başlangıcında, düşük progesteron seviyesine (<0,5 ng/ml) sahip hayvan sayısını azaltırken orta derecede

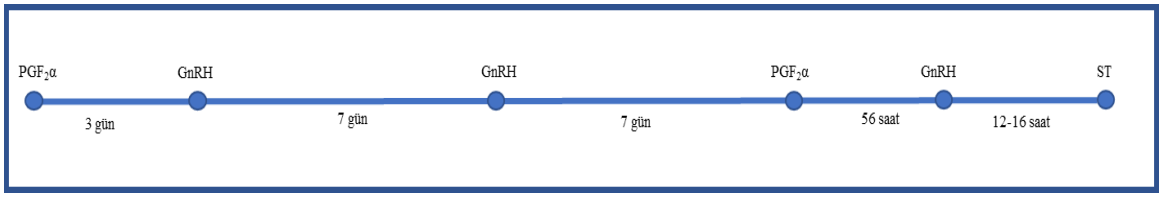
(0,50 <progesteron≤ 3,0 ng/mL) progesteron seviyesine ve korpus luteuma sahip hayvan sayısını arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca son $PGF_{2\alpha}$ uygulamasında dolaşımda yüksek (>3,0 ng/mL) progesteron seviyesine sahip hayvan sayısını da arttırdığı tespit edilmiştir (Ayres, Ferreira, Cunha, Araujo, & Wiltbank, 2013).



Şekil 7. Double Ovsynch protokolü (Souza ve ark., 2008)

2.6.2.2.6. PG-3-G Protokolü

Diğer bir ön senkronizasyon protokolü olan PG-3-G protokolü, Ovsynch protokolünden önce bir PGF ve bir GnRH uygulaması içermektedir (Şekil 8). Bu protokolün kullanımı sonucu da Double Ovsynch çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer olarak yüksek progesteron miktarı ve korpus luteuma sahip hayvan sayısında artış elde edilmiş ayrıca Ovsynch protokolündeki her iki GnRH uygulamasında ovulasyon yapan hayvan sayısında artış tespit edilmiştir (Ayres ve ark., 2013; Stevenson, & Pulley, 2012).

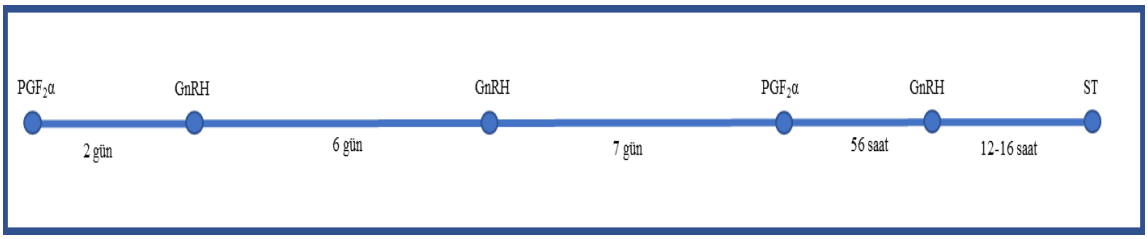


Şekil 8. PG-3-G protokolü (Stevenson, & Pulley, 2012)

2.6.2.2.7. G-6-G Protokolü

Bir başka presenkronizasyon protokolü olan G-6-G protokolü, doğum sonrası ilk tohumlaması yapılacak olan hayvanlarda kullanıldığında Ovsynch protokolünde hormonal tedaviye alınan cevap artmaktadır (Bello, Steibel, & Pursley, 2006)(Şekil 9). Bu protokol kullanımı sonucu protokole alınan hayvanların büyük çoğunluğu zaman ayarlı suni tohumlama protokolü başlangıcında ≥1 ng/ml progesteron miktarına sahiptir. Diöstrusun erken safhasında zaman ayarlı tohumlama protokolüne başlamak, sütçü ineklerde fertiliteyi olumlu yönde etkilemektedir (Bisinotto ve ark., 2014). Yapılan bir

çalışmada, G-6-G protokolü ile ön senkronizasyon sonrası elde edilen gebelik oranları Presynch-11 ve Presynch-14 ten daha yüksek tespit edilmiştir (Ribeiro ve ark., 2011).



Şekil 9. G6G protokolü (Bello ve ark., 2006)

Ovsynch protokolü başlangıcında ineklerin yaklaşık %30-40'ı nonsiklik ya da siklik olup proöstrus, östrus ya da metöstrus döneminde olduğundan aktif bir korpus luteuma sahip olmadığı için düşük progesteron seviyesi ile senkronizasyona başlanılmaktadır ve bu ineklerde gebelik oranları düşmektedir (Stevenson, 2016). Bu nedenler göz önünde bulundurulduğunda riskli sürülerde GnRH ile yapılan ön senkronizasyon protokolleri kullanılabilir. Çünkü GnRH kullanılarak yapılan ön senkronizasyon protokolleri hem Ovsynch protokolü başlangıcında daha fazla sayıda hayvanın siklusun ideal zamanında olmasına hem de nonsiklik hayvan sayısının azaltılarak gebelik oranlarının arttırılmasında yardımcı olabilmektedir.

2.7. Sütçü İneklerde Gebeliğe Etki Eden Faktörler

Sütçü işletmelerde fertilite parametreleri besleme, genetik, çevresel faktörler, yönetim ve bunların birbirleriyle bağlantılı şekilde oluşturduğu kompleks faktörlere bağlıdır (Walsh, Williams, & Evans, 2011). İyi bir fertilite yönetimi için saydığımız fertiliteyi etkileyen faktörler ayrı ayrı değerlendirilmeli ve hepsinde optimum başarı sağlanılmalıdır.

Yeni başlanılan laktasyonda iyi süt ve fertilite verileri için postpartum dönemin önemi çok büyüktür. Başarılı bir postpartum dönem yönetimi için prepartum dönemin iyi yönetilmesi gerekir. Postpartum dönemde karşılaştığımız problemlerin çoğu prepartum dönem yönetimi özellikle de prepartum dönem beslemesi ile yakından ilişkilidir (Roche, 2006). Doğum öncesi dönemde yapılan yanlış besleme, doğum sonrası dönemde metebolik problemlerin artmasına, şiddetli kondisyon skoru kaybına ve şiddetli negatif enerji dengesine neden olmaktadır. Ayrıca postpartum dönemde artan kuru madde tüketimi metabolizmanın hızlanmasına ve buna bağlı olarak steroid hormon yıkımlanma

hızının artmasına neden olarak suböstrus görülme sıklığını arttırarak östrus tespit oranını düşürmektedir (Walsh ve ark., 2011).

2.7.1. Laktasyon Yükü ve Negatif Enerji Dengesinin Etkisi

Yüksek süt verimine sahip inekler postpartum dönemde hızlı bir şekilde artan süt verimine sahiptirler. Ancak yem tüketim miktarları süt verimi için gerekli olan enerjiyi karşılayamamaktadır. Bu nedenle gerekli olan enerjiyi sağlamak amaçlı vücut yağları metabolize olmakta ve bu da hayvanın negatif enerji dengesine girmesine neden olmaktadır (Grummer, 2007). Negatif enerji dengesinin şiddetli olması da metabolik hastalıkların görülme riskini arttırır, bağışıklık sistemtemini zayıflatır ve fertilite üzerine olumsuz etki gösterir (Roche ve ark., 2009).

Negatif enerji dengesine sahip ineklerde endokrin, metabolik ve fiziksel değişiklikler olmaktadır. Ayrıca oluşan bu değişiklikler neticesinde oksidatif stres artmakta ve buna bağlı olarak immun sistem baskılanmaktadır (Sordillo, & Aitken, 2009). İmmun sistemi baskılanan inekler metabolik hastalıklara daha yatkın olmaktadır. Doğum sonrası dönemde de metabolik hastalıklara sahip olan ineklerde mastitis, ayak hastalıkları ve endometritis gibi fertiliteyi olumsuz yönde etkileyen hastalıkların görülme olasılığı artmaktadır (Roche, 2006).

Yüksek verimli süt ineklerinde şekillenen negatif enerji dengesi, dolaşımda bulunan insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) seviyesinin düşük seyretmesine neden olur. Düşük seviyedeki insülin ve IGF-1, gonadotropin sentezini engelleyerek dominant folikülün ovulasyonunu ve siklik aktivitenin başlamasını engellemektedir (Walsh ve ark., 2011). Tam tersi yani IGF-1 oranı postpartum ilk 2 hafta boyunca yüksek seviyede olan hayvanlar, doğum sonrası luteal aktivitenin başlaması için kısa bir süreye ihtiyaç duyarlar (Patton ve ark., 2007). İnsülin üretimini arttıran yüksek nişastalı diyet ile beslenen ineklerde doğum sonrası ilk 50 günde ovulasyon yapan hayvan sayısı %55 ten %90'a çıkmıştır (Walsh ve ark., 2011).

2.7.2. Vücut Kondisyon Skorunun Etkisi

Vücut kondisyon skoru (VKS) uluslararası düzeyde kabul görmüş, hayvanların besleme ve sağlık durumunu izlemek amaçlı kullanılan gözleme dayalı bir yöntemdir. Üreme performansı üzerine direkt etkisi vardır. Yapılan araştırmalar sonucu doğum anında düşük VKS'ye sahip ya da doğum sonrası kondisyon kaybına sahip, yani VKS 3,0-3,25 altında olan hayvanlarda ovulasyon, tohumlama ve ilk tohumlama gebelik oranlarının düştüğü, embriyonik kayıp oranının arttığı ve iki buzağılama arası sürenin uzadığı tespit edilmiştir (Roche ve ark., 2009). Fertilite oranlarını negatif yönde etkileyen bu durumların oluşmasında, düşük kondisyon skoruna sahip hayvanlarda oosit gelişim sürecinin yavaşlaması ve buna bağlı olarak kalitesinin azalmasının etkili olduğu tespit edilmiştir (Snijders, Dillon, O'Callaghan, & Boland, 2000). Üreme parametreleri üzerine düşük kondisyon skorunun zararlı etkileri olduğu kadar yüksek kondisyon skorunun da zararlı etkileri vardır. Buzağılama anında 3.5(5'lik sistemde) ve üzeri kondisyon skoruna sahip olan hayvanlarda, doğum öncesi kuru madde alımı düşmekte ve doğum sonrası dönemde kuru madde alımı optimum kondisyon skoruna sahip olan hayvanlar kadar hızlı artamamakta ve buda şiddetli negatif enerji dengesine neden olmaktadır (Roche ve ark., 2009). Doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde VKS izlenmeli ayrıca besleme ve yönetim kararları negatif enerji dengesini minimum seviyede tutmak üzere planlanmalıdır (Roche, 2006). Doğum sonrası kondisyon kaybı minimum seviyede tutulmalı ve doğum ile ilk tohumlama arasındaki kondisyon kaybı 0,5 ten fazla olmamalıdır (Crowe, 2008).

2.7.3. Gönüllü Bekleme Süresinin Etkisi

Gönüllü bekleme süresi, süt sığırı işletmelerinde yönetimsel açıdan çok önemli olan ve doğum sonrası hayvanların tohumlanmadıkları dönemdir (Chebel, & Santos, 2010). Gönüllü bekleme süresi, doğum sonrası uterusun involüsyonu, varsa herhangi bir hastalığın atlatılması ve hayvanın siklik hale gelmesi için tohumlamaya başlamadan önce verilen süredir (Chebel, & Santos, 2010; Stevenson, 2001). Amerika'daki sürülerde yapılan bir çalışma sonucu, gönüllü bekleme süresinin ortalama 55 gün uygulandığı tespit edilmiştir (DeJarnette, Sattler, Marshall, & Nebel, 2007). Ancak bu sürenin 40 ile 70 gün arasında uygulandığı işletmelerde vardır (Stevenson, 2001). Bu süre doğum

sonrası sağlık durumuna, laktasyon sayısına ve süt verimine göre arttırılıp azaltılabilmektedir (DeJarnette ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar sonrası, doğum sonrası 50-60. günlerde hala ineklerin %20-50'si siklik değildir bu nedenle geleneksel olarak 50-60. günlerde uygulanan gönüllü bekleme süresi sonucu yapılan tohumlamalardan düşük gebelik oranları elde edilebilir (Chebel, & Santos, 2010; Miller, Norman, Kuhn, Clay, & Hutchison, 2007). Bu yüzden gönüllü bekleme süresinin işletme şartları ve karlılık göz önünde bulundurularak belirlenmesi gebelik oranlarını iyi yönde etkileyecektir.

2.7.4. Sağlık Durumunun Etkisi

Süt sığırı işletmelerinde gebeliğin etkileyen en önemli faktörlerden bir diğeri de uterus sağlığıdır. Postpartum dönemde ilk 2 hafta hayvanların %80-100'ünde uterusta bakteriyel kontaminasyon mevcuttur ve bu normal bir durumdur (Sheldon, Cronin, Goetze, Donofrio, & Schuberth, 2006). İneklerin çoğu bu bakteriyel kontaminasyonu elemine edebilmekte ancak yaklaşık %20'si kontaminasyonu elemine edememekte ve doğum sonrası ilk 21 gün içerisinde metritis şekillenmektedir. Sürülerin yaklaşık %15-20'sinde patolojik bakteriler, doğum sonrası ilk 3 hafta yada daha uzun süre etki ederek klinik endometritise sebep olabilmektedir (Sheldon ve ark., 2009). Yapılan bir meta analiz çalışmasında, endometritis olan hayvanlarda ortalama açık gün sayısının 15 gün arttığı ve gebelik oranlarını %16 düşürdüğü tespit edilmiştir (Walsh ve ark., 2011). Ayrıca endometritis geçmişi olan hayvanlar tedavi edilseler bile hasta olmayan hayvanlara göre %20 daha düşük gebelik oranlarına sahip olmakta ve %3 daha fazla sürüden çıkarılma riski taşımaktadırlar (Sheldon ve ark., 2009).

Doğum sonrası şekillenen mastitis ve ayak hastalıkları da süt ineklerinde gebeliği etkileyen faktörlerdendir. Klinik mastitise yakalanan inekler gebelik başına 2,1 tohumlamaya ihtiyaç duyarken sağlıklı olanlar 1,6 tohumlamaya ihtiyaç duyduğu, tohumlamadan sonra gebeliğin 50. gününe kadar klinik mastitise yakalanan ineklerin 2,8 kat daha fazla embriyonik kayıp riskine sahip olduğu tespit edilmiştir (Ahmadzadeh ve ark., 2009; Santos, Cerri, Ballou, Higginbotham, & Kirk, 2004). Doğum sonrası dönemde ayak hastalıklarına yakalanan ineklerde de yapılan çalışmalarda gebelik başına tohumlama sayısının arttığı ve ilk tohumlamada ki gebelik oranlarının düştüğü

bildirilmiştir (Hernandez, Shearer, & Webb, 2001; Melendez, Bartolome, Archbald, & Donovan, 2003). Ayrıca doğum sonrası ilk 30 gün içerisinde ayak hastalığına yakalanan ineklerde 2,63 kat daha fazla ovaryum kisti şekillendiği tespit edilmiştir (Melendez ve ark., 2003).

Ayrıca bir çok bakteriyel, viral, fungal ve protozoal enfeksiyon etkenleri de ineklerde gebelik kayıplarına (embriyonik ve fötal dönem) ve infertiliteye neden olabilmektedir (Givens, & Marley, 2008).

2.7.5. Tohumlama Stratejisinin Etkisi

Süt sığırı işletmelerinde verim devamlılığı ve karlılık için ineklerin yılda bir kez yavru vermeleri gerekmektedir. Bunu sağlamak için yüksek gebelik oranlarına, yüksek gebelik oranları için de doğru zamanda tohumlamaya ihtiyaç vardır. Doğru zamanda tohumlama yapabilmek için östrus tespiti yapılabilir. Ancak süt veriminin artmasıyla östrus süresi ve dış belirtileri gösterme oranı azalmıştır (Lopez, Satter, & Wiltbank, 2004). Östrus gösterme oranlarının azalmasının sebebi çevresel ya da ineğe bağlı sebeplerden olabilir. Hayvanın nonsiklik olması, sakin kızgınlık göstermesi, süt verimi ve sağlık durumu östrus süresini ve gösterme oranını etkileyen ineğe bağlı faktörlerdir. Besleme, barındırma koşulları, mevsim ve aynı anda östrusta olan hayvan sayısı ise östrus süresini ve gösterme oranını etkileyen çevresel faktörlerdir (Roelofs, Lopez-Gatius, Hunter, Van Eerdenburg, & Hanzen, 2010). Ayak hastalığının olması, üretim tipi, barındırma ve zemin koşulları gibi etkenler hayvanların östrus göstermelerini engellemez ancak süresinin ve yoğunluğunu ciddi derecede engellemektedirler (Roelofs ve ark., 2010).

Yukarıda bahsedilen sebeplerle östrus tespitinde karşılaşılan zorluklar nedeniyle geliştirilen zaman ayarlı tohumlama protokolleri büyük işletmelerde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Özellikle işletmenin yapısı ve olanakları, tohumlanacak olan hayvanların düve yahut inek olması, inekler için primipar veya multipar olmaları, tohumlamanın postpartum ilk mi yoksa sonraki tohumlamalar için mi planlandığı, gibi faktörler her bir işletme için yürütülecek olan reprodüktif yönetim stratejisinde ve bu kapsamda kullanılacak olan zaman ayarlı tohumlama protokolünde çeşitliliğe neden olmaktadır.

2.7.6. Oosit ve Embriyo Kalitesinin Etkisi

Süt sığırı endüstrisinde üretimin daha yoğun ve entansif yapılmaya başlanmasıyla birlikte gebelik oranlarını etkileyen diğer bir faktör olan fertilizasyon oranlarında düşüşler yaşanmaya başlanmıştır. 1980'li yıllarda %95 olan fertilizasyon oranları %83 civarına düşmüştür (Sartori, Bastos, & Wiltbank, 2010). Fertilizasyon aşamasından sonra daha riskli bir dönem olan embriyonik dönem gelmektedir. Embriyonik kayıp, gebelik oranlarını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Modern süt sığırları işletmelerinde fertilizasyon oranı yaklaşık %90 iken embriyonik ve fötal kayıp %40-55 oranlarındadır (Diskin, & Morris, 2008). Çok erken embriyonik kayıplar (tohumlama sonrası 0-7. gün), oosit kalitesinin ya da uterus ortamının iyi olmamasından dolayı şekillenmektedir. Yüksek süt verimi ve hayvanın fizyolojik durumu oosit ve embriyo kalitesini etkilemektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda yüksek süt verimine sahip olan hayvanlardan elde edilen oositten daha düşük kalitede embriyo elde edilmiştir (Snijders ve ark., 2000). Başka bir çalışmada da düvelerden ve ineklerden elde edilen embriyolar karşılaştırılmış ve düvelerden elde edilenlerin daha iyi kalitede olduğu ve hayvanın fizyolojik durumunun embriyo kalitesini etkilediği tespit edilmiştir (Leroy ve ark., 2005). Ayrıca tohumlama sonrası progesteron miktarının artış hızı da embriyonun geleceğini belirlemektedir. Tohumlama sonrası 4-7. günlerde hızlı progesteron artışı görülen hayvanlardaki gebelik şansı, ilk 7 günde progesteron artışının yavaş olduğu hayvanlarda daha yüksek bulunmuştur (Diskin, & Morris, 2008). Embriyonik gelişimde progesteron çok önemlidir. Düşük progesteron konsantrasyonu, uterus ortamının embriyo için optimum olamamasına ve erken embriyonik gelişimi destekleyememesine neden olmaktadır (Leroy, Opsomer, Van Soom, Goovaerts, & Bols, 2008). Ayrıca progesteron miktarının yeterli olması, gebeliğin anne tarafından tanınmasını sağlayan interferon-tau'nun yeterli düzeyde salınabilmesini ve uterustan $PGF_{2\alpha}$ salınımının engellenip gebeliğin devam etmesi demektir (Spencer ve ark., 2008).

2.7.7. Sperm kalitesinin Etkisi

Sperm kalitesi fertilizasyon başarısını etkileyen önemli faktörlerden biridir. Sperm hücresinin canlılığında, morfolojisinde ve fonksiyonel yapısında oluşan bozukluklar fertilizasyon başarısını etkilemektedir. Sperm hücrelerinin fertilizasyon bölgesine

ulaşamaması, oosite penetre olamaması, oositi fertile edememesi veya fertilizasyon sürecini tamamlayamaması fertilizasyon bozukluklarına neden olabilmektedir (Saacke, Dalton, Nadir, Nebel, & Bame, 2000). Ayrıştırma işlemlerinden dolayı CBS için bu faktör daha da önem kazanmaktadır.

2.8. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Kullanımında Gebeliğe Etki Eden Faktörler

2.8.1. Flow Sitometrik Yöntem ile Sperma Cinsiyetinin Belirlenmesinin Etkisi

Daha önce flow sitometrik yöntem ile sperma cinsiyetinin belirlenmesi için yapılan işlemlerden ayrıntılı bir şekilde bahsetmiştik. Ayrıştırma işlemi sırasında sperm hücrelerinde bazı hasarlar oluşmakta ve bu da fertilizasyon oranlarını düşürmektedir (Seidel, & Garner, 2002). Ayrıştırma işlemi sırasında sperm hücresinin DNA'sı floresan boyaya, lazer ışınlarına, basınca ve santrifüj işlemlerine maruz kalmaktadır (Gosálvez ve ark., 2011).

Yapılan tüm işlemler cinsiyeti belirlenmiş spermanın ömrünü kısaltmakta ve canlı sperma oranını azaltmaktadır (Maxwell ve ark., 2004; Schenk ve ark., 2009). Holstein düvelerde yapılan bir çalışmada, ayrıştırma işlemi sırasında sperm hücrelerinin maruz kaldığı farklı basınç oranları ile üretilen cinsiyeti belirlenmiş dişi spermanın gebelik oranları karşılaştırılmıştır. Basınç oranı 40 psi iken üretilen spermalar ile %42 gebelik oranı elde edilirken, 50 psi basınç ile üretilen spermalardan %34 gebelik elde edilmiştir (Suh ve ark., 2005). Yapılan araştırmalardan, ayrıştırma işleminin sperm hücrelerine verdiği hasar gebelik oranlarının düşmesine neden olduğu ve konvansiyonel sperma ile elde edilen gebelik oranlarının %60-90'ı kadar gebelik oranları elde edilebileceği anlaşılmaktadır (Healy ve ark., 2013).

2.8.2. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma Konsantrasyonunun Etkisi

Ticari olarak satışa sunulan CBS payetleri $2{,}1 \times 10^6$ adet sperm hücresi içermektedir. Bu miktar satışa sunulan konvansiyonel sperma payetlerinin içerdiği ($\sim 20 \times 10^6$) sperm miktarından çok azdır (Thomas ve ark., 2014). CBS üretimi yavaş ve maliyetli olduğu için ticari olarak ancak bu konsantrasyonda satışa sunulabilmektedir (Seidel, 2014). Bazı araştırmacılar cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımı sonucu düşük gebelik oranlarının sebebi olarak düşük sperma konsantrasyonunu işaret etmişlerdir ve bu konuda çalışmalar yapmışlardır. Holstein düve ve ineklerde yapılan bir çalışmada, $2{,}1 \times 10^6$ ve $3{,}5 \times 10^6$

sayıda sperm hücresi içeren payetler ile tohumlama yapılmış ve gebelik oranları karşılaştırılmış ancak gebelik oranları arasında bir fark bulunamamıştır (DeJarnette ve ark., 2010). Aynı araştırmacının Holstein düvelerde yaptığı başka bir çalışmada $2{,}1\times10^6$ ve 10×10^6 sayıda sperm hücresi kullanılarak yapılan çalışma sonucu gebelik oranlarında artış sağlanmıştır ancak kullanımının ekonomik olmadığı bildirilmiştir (DeJarnette ve ark., 2011). Ancak aynı oranların ineklerdeki gebelik oranları üzerine etkisi değerlendirildiğinde herhangi bir artış tespit edilememiştir (Schenk ve ark., 2009). Angus ırkı besi sığırlarında yapılan bir çalışmada ise 1×10^6 dozda dondurulmuş ve 5×10^6 dozda soğutulmuş CBS ile düşük dozda (1×10^6) konvansiyonel sperma kullanımı sonucu gebelik oranları sırasıyla %23, %25 ve %49 elde edilmiştir (Seidel ve ark., 1999). Yapılan çalışmaların sonuçlarından görüldüğü üzere, CBS ile elde edilen gebelik oranlarının düşük olmasının sebebini sadece düşük konsantrasyonda olması ile ilişkilendirilemeyeceği anlaşılmaktadır.

2.8.3. Boğa Fertilitesinin Etkisi

CBS kullanımı sonrası gebelik oranlarını etkileyen bir diğer faktör ise boğa etkisidir. Farklı boğalar kullanılarak yapılan çalışmalar sonucu farklı gebelik oranları elde edilmiştir. Çünkü sperma ayrıştırma işlemi sırasında her bir boğanın fertilitesi farklı derecelerde etkilenmektedir (Hall, Kasimanickam, Glaze, & Roberts-Lew, 2017). Sperm ayrıştırma sürecinde bazı boğalarda sperm kalitesi azalır iken bazı boğalarda değişmemektedir (Macedo ve ark., 2013).

Yapılan bir çalışmada, CBS besi ineklerinde zaman ayarlı tohumlama protokolü ile kullanımı sonucu ortalama %35 gebelik oranı elde edilir iken boğaların fertilitesinin %56 ile %19 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Hall ve ark., 2017). Jersey ırkı düvelerde yapılan bir başka çalışmada ise gebelik oranları üzerine boğa faktörünün anlamlı etkisi olduğu tespit edilmiş ve boğa fertilitesi %27 ile %44 arasında değişkenlik göstermiştir (Sales ve ark., 2011). Boğa fertilitesinin de CBS ile elde edilen gebelik oranları üzerine etkisinin olduğu göz önünde bulundurulduğunda, sperm ayrıştırma işleminden fertilitesi etkilenmeyen boğaların kullanımı gebelik oranlarının daha iyi elde edilmesine yol açacaktır (Frijters ve ark., 2009).

2.8.4. Östrus ve Tohumlama Protokolünün Etkisi

Günümüz süt sığırı işletmelerinde düve ve inekleri gebe bırakmak için ya östrus takibi yaparak östrus gösterenleri tohumlamamız ya da zaman ayarlı tohumlama protokolleri kullanarak östrus takibi yapmaksızın tohumlama yapmamız gerekmektedir. Daha önce bahsettiğimiz üzere işletmelerde östrus tespiti yeteri kadar yapılamamaktadır. Bu yüzdende sıklıkla zaman ayarlı tohumlama protokolleri kullanılmaktadır.

Yapılan bir çok çalışma sonucu CBS'nin, östrus takibi sonrası düvelerde ya da yine östrus takibi sonrası ineklerin ilk tohumlamalarında kullanılması gerektiği ve bu yöntem ile tatmin edici gebelik oranları elde edilebileceği bildirilmiştir (DeJarnette ve ark., 2009; Healy ve ark., 2013; Norman ve ark., 2010). Östrus bulgularının derecelendirilip gebelik oranları üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 14 gün ara ile $PGF_{2\alpha}$ uygulamasından sonra güçlü östrus bulguları gösteren Holstein düvelerde gebelik oranı %46 iken zayıf östrus bulguları gösterenlerde %21 tespit edilmiştir (Kurykin, Jalakas, Kaart, & Jaakma, 2007). Aynı araştırmacının yaptığı başka bir çalışmada, sütçü ineklerde östrus takibi sonrası CBS kullanımı ile %21 ile %37 arasında gebelik oranları elde edilmiştir (Kurykin ve ark., 2017). Yapılan çalışmaların sonuçları göz önünde bulundurulduğunda cinsiyeti belirlenmiş spermanın östrus gösteren hayvanlarda kullanımı ile daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir.

Ancak günümüz şartlarında zaman ayarlı tohumlama protokolleri işletmelerin vazgeçilmezleri arasındadır. Ancak zaman ayarlı tohumlama protokollerinde CBS ile konvansiyonel spermadan elde edilenden daha düşük gebelik oranları elde edilmektedir (Noonan, Kelly, & Beggs, 2016). Zaman ayarlı suni tohumlama protokollerinde CBS kullanımı sonucu elde edilen gebelik oranları farklılık göstermektedir ancak zaman ayarlı tohumlama öncesi östrus belirtileri gösteren inek ve düvelerde her zaman daha iyi gebelik oranları elde edilmiştir (Mallory, Lock, Woods, Poock, & Patterson, 2013; Sales ve ark., 2011; Thomas ve ark., 2014). CBS kullanımı sonrası elde edilen gebelik oranlarına farklı zaman ayarlı tohumlama protokollerinin de etkisi olabilmektedir. Yapılan bir çalışma sonucunda Ovsynch protokolünde %27.9, Presynch-Ovsynch protokolünde %35.5 ve Double-Ovsynch protokolü ile de %47.6 gebelik oranları elde edilmiştir (Karakaya-Bilen ve ark., 2019).

Sonuç olarak östrus takibi sonrası östrus gösterdiğinde ya da zaman ayarlı tohumlama öncesi östrus göstererek tohumlanan düve ve ineklerde CBS kullanımı sonucu daha yüksek gebelik oranları elde edilmektedir (Meyer, & Funston, 2012). Ayrıca zaman ayarlı protokoller arasında da gebelik oranları bakımından farklılık görülebilir.

Ayrıca etçi ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokollerinde östrus gözlenmeyen hayvanlarda CBS ile tohumlama zamanının ertelenmesiyle de gebelik oranları yükseltilmeye çalışılmıştır (Thomas ve ark., 2014).

2.8.5. Folikül Çapının Etkisi

Tohumlama anındaki folikül çapı hem ovulasyonu hem de fertilizasyon sonrası embriyo yaşamını etkileyen bir faktördür. Folikül çapının ovulasyona etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, folikül çapı 8.5 mm den küçük olduğunda ovulasyon oranı %33 iken 10 mm den büyük olduğunda oran %90 seviyesine ulaşmaktadır (Gimenes ve ark., 2008). Ayrıca daha büyük çapta folikül demek daha fazla östradiol üretimi demektir. Proöstrus döneminde yüksek östradiol üretiminin luteal döneme ve embriyonun yaşama gücüne pozitif etkisi vardır (Santos ve ark., 2004). Bu nedenlerden dolayı CBS'nin etkinliğini arttırmak için yapılan çalışmalara tohumlama anındaki folikül çapının büyüklüğü de konu olmuştur. Bos Indicus ırkı sığırlarda CBS ile yapılan bir çalışmada zaman ayarlı tohumlama anında 8 mm den büyük çapa sahip olan ineklerde daha yüksek (%57) gebelik oranına sahip olunur iken 8 mm den küçük çapa sahip olan ineklerde gebelik oranı daha düşük (%31) olarak bulunmuştur (Sa Filho ve ark., 2012). Bu çalışmada ayrıca folikül çapı arttıkça ovulasyon oranı ve tohumlama anında östrus gösterme oranı da artmıştır.

2.8.6. Tohumlama Sayısının Etkisi

Cinsiyeti belirlenmiş spermanın ilk tohumlamada kullanılmasının daha iyi gebelik sonuçları vereceği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Çünkü tohumlama sayısı arttıkça elde edilen gebelik oranları düşmektedir (Macedo ve ark., 2013). Örneğin Amerika'daki 211 adet çiftliğin CBS kullanımı sonucu elde ettiği kayıtlar değerlendirilerek yapılan bir çalışmada, Holstein düvelerde ilk, ikinci ve üç ve daha fazla tohumlamada elde edilen gebelik oranları sırasıyla %47, %39 ve %27 dir. Aynı şekilde Jersey düveler değerlendirildiğinde, tohumlama sayısı arttıkça gebelik oranları sırasıyla %53, %47 ve

%27 olarak azalmıştır (DeJarnette ve ark., 2009). Jersey düvelerin kullanıldığı başka bir çalışmada ise CBS ile ilk tohumlada %55 oranında gebelik elde edilirken, üçüncü tohumlamada bu oran %35'e düşmüştür. Yapılan çalışmalar ışığında tohumlama sayısının CBS ile elde edilen gebelik oranları üzerine etkisi olduğunu ve ilk tohumlamada kullanıldığında daha yüksek gebelik oranları elde edildiğini söyleyebiliriz.

2.8.7. Tohumlama Zamanının Etkisi

Fertiliteyi etkileyen en önemli parametrelerden biri olan tohumlama zamanı üzerine birçok araştırma yapılmış ve hala da yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda konvansiyonel sperma ile ya östrus başlangıç zamanına göre ya da ovulasyon zamanına göre en uygun tohumlama zamanı tespit edilmeye çalışılmıştır (Hockey, Morton, Norman, & McGowan, 2010; Rankin, Smith, Shanks, & Lodge, 1992). Konvansiyonel sperma kullanılarak östrus başlangıcına yakın zaman ile östrus başlangıcından 12 saat sonrasında yapılan tohumlamalar karşılaştırılmış ve geç tohumlamada fertilizasyon oranının daha iyi olduğu ancak embriyo kalitesinin düştüğü tespit edilmiştir (Dalton ve ark., 2001; Saacke, 2008). Ancak CBS kullanımı söz konusu olduğunda, CBS dişi genital kanaldaki ömrü daha kısadır, kullanılan doz miktarı daha düşüktür ve sperm ayrıştırma işlemi nedeniyle kapasitasyon süreci kısadır (Sales ve ark., 2011). Bu yüzden tohumlama zamanı ile ovulasyon zamanı arasındaki sürenin belirlenmesi, konvansiyonel spermaya göre CBS kullanımı ile başarı elde etmek için daha kritik rol oynamaktadır (Kurykin ve ark., 2017). Düvelerde yapılan bir çalışmada, östrus başlangıcından 18-24 saat sonra cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan tohumlamalarda (%55) 0-12 saat sonra tohumalama yapılanlara (%25) göre daha yüksek gebelik oranları tespit edilmiştir (Schenk ve ark., 2009). CBS kullanımında, ovulasyon ile tohumlama zamanı arasındaki süreyi kısaltarak daha iyi gebelik oranları elde edilebileceği düşüncesi hala geçerliliğini koruyan en güncel konuların başında gelmektedir.

Jersey düvelerde $PGF_{2\alpha}$ ile östrus senkronizasyonu yapılan bir çalışmada, düveler östrus başlangıcından 12-16., 16.1-20. ve 20.1-24. saatlerde yapılan tohumlamalar sonucu sırasıyla %38, %52 ve %56 gebelik oranları elde edilmiştir (Sa Filho, Crespilho, Santos, Perry, & Baruselli, 2010). Holstein düvelerde $PGF_{2\alpha}$ ile östrus senkronizasyonu yapılarak, östrus başlangıcından 12-16., 16.1-20. ve 20.1-24. saatlerde yapılan

tohumlamalar sonucu sırasıyla %49,5, %48,9 ve %60,9 gebelik oranları elde edilmiştir (Guner ve ark.,2020)

Besi ineklerinde cinsiyeti belirlenmiş ve konvansiyonel sperma kullanılarak yapılan bir çalışmada progesteron tabanlı zaman ayarlama protokolünde, progesteron kaynağının çıkartılması sonrası 36, 48 ve 60. saatlerde zaman ayarlı tohumlama protokolü uygulanmıştır. Tohumlama sonrası ultrason eşliğinde ovulasyon kontrolü yapılmış ve ortalama 72. saatte ovulasyonun gerçekleştiği tespit edilmiştir. CBS ile ovulasyon öncesi 0-12. saatlerde yapılan tohumlamalar sonrası %38 gebelik oranı elde edilirken 12.1-24. saatlerde ve 24 saat sonrası %19 ve %6 gebelik oranları elde edilmiştir. Aynı araştırmacı aynı çalışmada ayrıca Jersey düvelerde progesteron tabanlı zaman ayarlı tohumlama protokolü ile progesteron kaynağını çıkardıktan 54. ve 60. saatlerde tohumlama yapmış ve 54. saatte %16 gebelik oranı elde edilirken 60. saatte %31 gebelik oranı elde etmiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler ışığında, CBS ile tohumlamanın standart tohumlama saatinde (54. saat) değilde ertelenerek ovulasyona daha yakın zamanda yapılması ile daha iyi gebelik oranları elde edildiği sonucuna varılmıştır (Sales ve ark., 2011). Yine progesteron tabanlı zaman ayarlı suni tohumlama protokolünün kullanıldığı başka bir çalışmada, Holstein ve Holstein melezi düvelerde progesteron kaynağı çıkartıldıktan 47. ve 52. saatlerde yapılan tohumlamalar sonucu sırasıyla %46 ve %37 gebelik oranları elde edilmiştir (Noonan ve ark., 2016).

Östrustaki Jersey ineklerin aktivite pikiyle tohumlama zamanı arasındaki sürenin gebelik oranları üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, aktivite pikinden sonraki 3 saate kadar, 4-12. saatler, 13-22. saatler ve 23-41. saatler arasında tohumlanan ineklerde sırasıyla %20, %31, %44 ve %49 gebelik oranları elde edilmiştir (Bombardelli ve ark., 2016).

Farklı ırklarda, verim özelliklerinde ve protokollerle yapılan çalışmalardan da anlaşılacağı gibi CBS kullanımı sonrası gebelik oranlarını etkileyen en önemli faktörlerden birisi tohumlama zamanıdır. Konvansiyonel sperma ile östrus başlangıcından 12 saat içerisinde tohumlama yapıldığı takdirde optimum gebelik oranları edilmektedir (Dransfield, Nebel, Pearson, & Warnick, 1998). Konvansiyonel sperma için tohumlama zamanı ovulasyona yaklaştıkça yüksek fertilizasyon oranı elde edilirken

embriyo kalitesi düşmekte, ovulasyondan uzaklaştıkça da fertilizasyon oranı azalırken embriyo kalitesi artmaktadır (Dalton ve ark., 2001; Saacke, 2008). Ancak bu durum cinsiyeti belirlenmiş sperma için farklıdır. Yapılan çalışmalar sonrası tohumlama zamanının ovulasyona yakın zamanda yapılmasıyla gebelik oranlarının arttırılabildiği görülmektedir ancak sebebi tam olarak açıklanamamaktadır. Araştırmacıların yaptıkları yorumlara göre, cinsiyeti belirlenmiş sperma payetlerindeki sperma dozunun az olması ve dolayısıyla ovulasyona uzak yapılan tohumlamalarda spermlerin fertilizasyon yeteneğinin azalabileceği yada ayrıştırma işleminden dolayı kapasitasyon için daha az zamana ihtiyaç duymasından dolayı ovulasyona yakın yapılan tohumlamalarda gebelik oranları daha iyi olmaktadır (Bombardelli ve ark., 2016; Sales ve ark., 2011).

Sonuç olarak, CBS için tohumlama zamanı konvansiyonel sperma için belirlenen zamandan farklı olabileceği ve tohumlamanın ertelenerek yapılmasının gebelik oranları üzerine pozitif etki gösterebileceği ortak bir görüş olarak kabul görmekle birlikte, zaman ayarlı suni tohumlama protokollerinde CBS ile tohumlama saati için optimum zamanın tam olarak belirlenebilmesi mümkün olmamıştır. Dolayısıyla, sunulan bu çalışmanın amacı sütçü ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokolü kapsamında CBS ile daha yüksek gebelik oranlarının elde edilebileceği optimum tohumlama zamanının araştırılması olarak belirlenmiştir.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali, Bakım, Besleme ve Çevresel Şartlar

Balıkesir Üniversitesi Etik Kurulunun 28.02.2019 tarihli toplantısı ve 2019/2-5 nolu kararı ile etik açıdan uygun olduğu belirlenen bu çalışma sütçü bir işletmede Aralık 2019 ile Temmuz 2020 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmaya sağılan gün sayısı (SGS) 46±3 gün aralığında olan, tamamı 2. laktasyonda, toplam 650 adet Holstein-Fresian ırkı inek dahil edildi. Ancak çalışma sürecinde 39 adet ineğin sürüden çıkarılması sebebiyle, toplam 611 adet inek ile çalışma tamamlandı.

İşletmedeki inekler, kum yataklı, serbest dolaşım alanına sahip, yemliklerde kafa kilit sistemi olan ahırlarda barındırıldı. Aynı zamanda ahır içinde sıcaklık ve nem miktarının kontrol edildiği serinletme sistemi bulunmakta. İşletmedeki inekler, National Research Council (NRC, 2001) verilerinin referans alındığı rasyonla günde 3 defa beslendi ve 6 saat aralıklarla 4 sefer sağıldı. Çalışmaya dahil edilen ineklerin vücut kondisyon skorları (VKS) tohumlama anında, 0,25'lik artışlar içeren 1-5 arası ölçekte, 1-çok zayıf, 5-obez olarak tanımlanarak kaydedildi. (Ferguson, Galligan, & Thomsen, 1994) . Çalışmaya dahil edilen ineklerin tohumlama zamanlarındaki haftalık ortalama süt verimleri sağım sistemi yönetim programı (DairyPlan C21, GEA, Almanya) kullanılarak kaydedildi. Tüm ineklere ait postpartum dönem uterus hastalıklarına (retensiyo sekundinarum, puerperal metritis, klinik metritis) ait bilgiler sürü yönetim programı (DairyComp 305, Kanada) ile takip edilirken, östrus gösterme ve östrus aktivitesi gibi bilgiler de aktivite–ruminasyon takip sistemi (SCR Dataflow II, Netanya, İsrail) kullanılarak kaydedildi.

3.2. Senkronizasyon Protokolü

Çalışmaya dahil edilen tüm ineklere Ovsynch senkronizasyon protokolü öncesinde bir ön senkronizasyon uygulandı. Ön senkronizasyon başlangıcı sıfırıncı gün kabul edilerek tüm ineklere $PGF_{2\alpha}$ (D- kloprostenol, 150 μg) ve 2. gün GnRH (Buserelin asetat 10 μg) kas içi uygulandı. Presenkronizasyon uygulamasını takiben 9. gün Ovsynch (9. gün GnRH, 16. gün $PGF_{2\alpha}$, 17. gün $PGF_{2\alpha}$, 56 saat sonra GnRH ve 12-24 saat ST) (Pursley ve ark., 1997) senkronizasyon protokolüne başlanıldı.

3.3. Gruplandırma ve Zaman Ayarlı Suni Tohumlama

Çalışmaya dahil edilen inekler zaman ayarlı suni tohumlama gününde rasgele ve eşit sayıda olacak şekilde 4 farklı gruba ayrıldı (Şekil 10). Gruplandırılan inekler, Ovsynch protokolünün 9. gününde GnRH enjeksiyonu zamanı baz alınarak; Kontrol grubundaki inekler (n=155) GnRH enjeksiyonundan sonraki 12-16. saatler arasında konvansiyonel sperma ile, CBS grubundaki inekler (n=152) GnRH enjeksiyonundan sonraki 12-16. saatler arasında cinsiyeti belirlenmiş sperma ile CBS4 grubundaki inekler (n=153) GnRH enjeksiyonundan sonraki 16-20. saatler arasında cinsiyeti belirlenmiş sperma ile ve CBS8 grubundaki inekler (n=152) GnRH enjeksiyonundan sonraki 20-24. saatler arasında cinsiyeti belirlenmiş sperma ile zaman ayarlı olarak tohumlandı.

Zaman ayarlı suni tohumlamalar, aynı boğaya ait ortalama 20×10^6 konsantrasyonda spermatozoaya sahip konvansiyonel (Ironman Nemo, 7HO14365, 0.5 ml/payet, World Wide Sires, Kanada) ve ortalama 2×10^6 konsantrasyonda spermatozoaya sahip cinsiyeti belirlenmiş (Ironman Nemo, 507HO14365, 0.25 ml/payet, World Wide Sires, Kanada) sperma kullanılarak toplam üç farklı tohumlayıcı tarafından gerçekleştirildi. Gruplarda yer alan inek sayılarının, kullanılan sperma çeşidinin ve tohumlayıcıların tohumladıkları hayvanların eşit sayıda olmasına özen gösterildi. Tohumlayıcı 1, 2, 3 sırasıyla KON grubunda n=51;52;51, CBS grubunda n=50;50;52, CBS4 grubunda n=52;50;51 ve CBS8 grubunda n=51;52;49 adet zaman ayarlı tohumlama yaptı.

3.4. Ultrasonografik Muayeneler (USM)

Çalışmaya dahil edilen edilen tüm ineklerin ultrason muayeneleri 7,5 MHz'lik transrektal linear probu olan ultrason cihazı kullanılarak yapıldı (Honda, Vega Grup, İzmir, Türkiye). Çalışma süresince ineklerin farklı zamanlarda ultrason muayeneleri yapıldı ve bu muayenelerde ineklerin siklik aktiviteleri ve yapılan hormonlara verdikleri cevaplar araştırıldı. Yapılan ilk USM'de ön senkronizasyon amacı ile yapılan $PGF_{2\alpha}$ zamanında ineklerin siklik olup olmadıkları belirlendi. Ovaryum üzerinde korpus luteuma sahip inekler siklik olarak kabul edildi ve bu inekler kayıt altına alındı. Ancak $PGF_{2\alpha}$ uygulaması işletmenin reprodüktif yönetimi nedeniyle tüm ineklere uygulandı. Takiben Ovsynch'in ilk GnRH uygulaması sırasında USM yapıldı. Benzer şekilde ineklerin ovaryum üzerindeki yapıları belirlendi ve her bir inek için ovaryum haritası

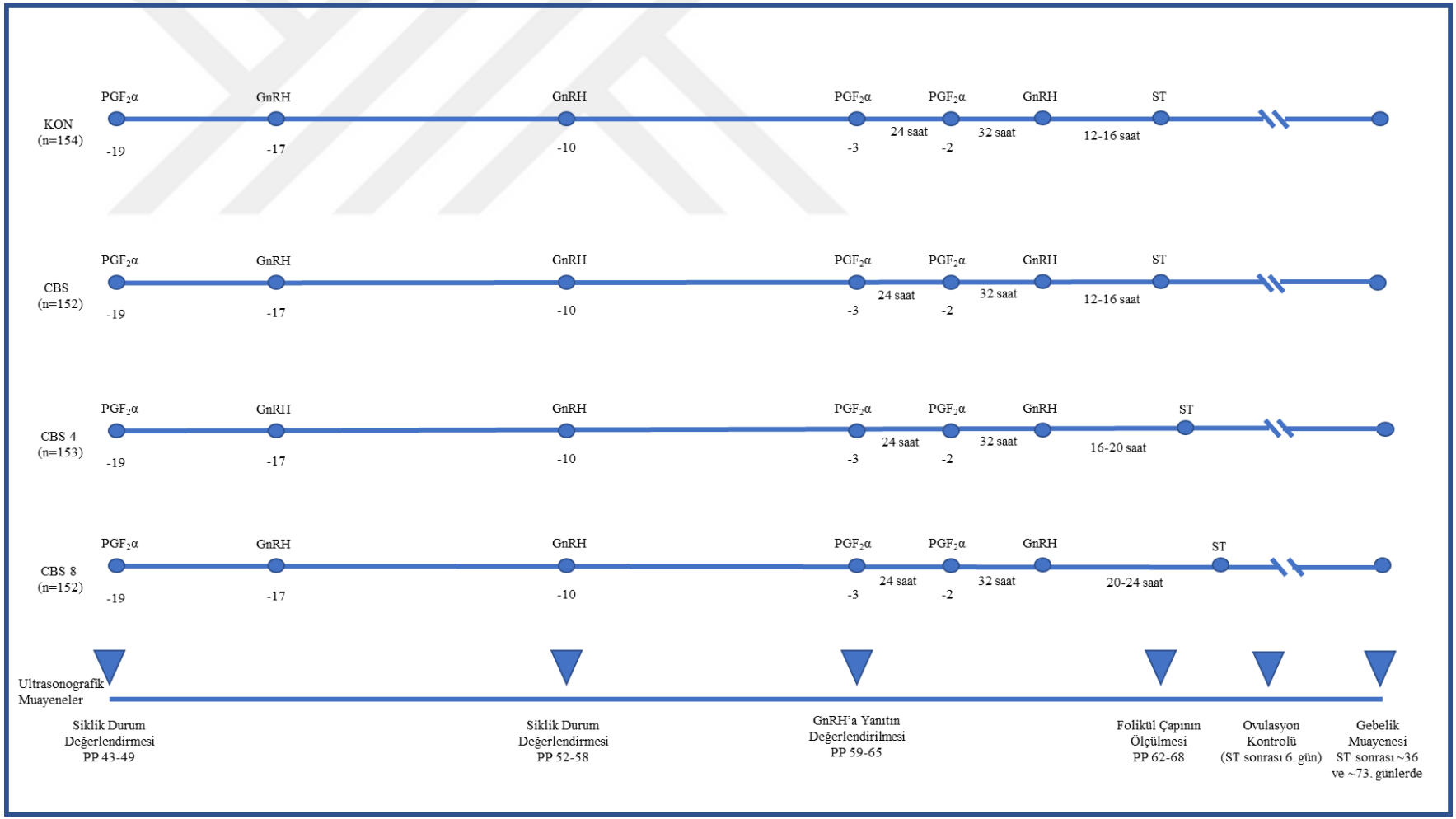
çıkarılarak ovaryum üzerindeki yapılarak kayıt altına alındı. Ovsynch'in $PGF_{2\alpha}$ zamanında USM tekrar edildi ve bu muayenede Ovsynch'in ilk GnRH uygulamasına alınan yanıt belirlendi. Ovsynch'in ilk GnRH uygulamasında belirlenen ve 10 mm üzerinde follikülü bulanan ineklerde, $PGF_{2\alpha}$ zamanı bu follikülün yerine korpus luteumun alması ile yapılan GnRH uygulamasına yanıt vermiş olarak kabul edildi. Çalışmaya dahil edilen ineklerin tohumlama anındaki folliküllerin maksimum çapı ve tohumlama sonrası 6. günde ovulasyon kontrolü amaçıyla USM'ler tekrar edildi. Tohumlama anında belirlenen follikülün ortadan kaybolması ve yerine korpus luteumun şekillenmesi ovulasyonun gerçekleştiği olarak kabul edildi. Yapılan tüm USM'ler ile elde edilen veriler ilgili formlar ile kayıt altına alındı (Ek-1, Ek-2, Ek-3).

Ovsynch protokolü ile tohumlanan ineklerin, ilk gebelik muayeneleri tohumlama sonrası 36±3. ve gebe ineklerin ikinci gebelik muayeneleri 73±3. günlerde transrektal olarak ultrasonografi cihazı ile yapıldı. İlk ve ikinci gebelik muayenelerinde elde edilen gebe inek sayısının, toplam tohumlanan inek sayısına oranı ile gebelik oranları hesaplandı. İkinci gebelik muayenesinde gebe olmadığı belirlenen inek sayısının, birinci gebelik muayenesinde gebe olduğu tespit edilen inek sayısına oranı embriyonik kayıp olarak hesaplandı.

3.5. İstatistik

Tüm verilerin analizi aşamasında SAS 9.4 (SAS Ins., Inc, Cary, NC, USA) istatistik programı kullanıldı. Veriler iki aşamalı olarak analiz edildi. Birinci aşamada; 36. gündeki gebelik oranı, 73. gündeki gebelik oranı ve embriyonik ölüm üzerinde etkisi olan faktörlerin belirlenmesi amacıyla çoklu regresyon analizi ile önemli olan faktörler belirlenerek model secimi yapıldı. Bu amaçla; PROC REG prosedüründe basamaklı (Stepwise) regresyon yöntemi kullanılmış olup, önemli faktörlerin modele girişi için önem düzeylerinin $p<0,20$ seviyesinde etkiye sahip olması belirlendi. Daha sonra, seçilen modele göre bağımlı değişkenlerin analizinde PROC GLIMMIX prosedürü kullanıldı. Tespit edilen istatistiksel modelde sabit faktörler olarak postpartum hastalık, östrus gösterme, tohumlama zamanı, protokol başlangıcındaki siklik aktivite, Ovsynch protokolü başlangıcındaki siklik aktivite, Ovsynch protokolünün ilk GnRH'ına alınan yanıt, tohumlama günü folikül çapı, tohumlama zamanı östrus gösterme ve süt verimi

kullanıldı. Her deneme grubu içinde ineklerin bireysel farklılıklarından kaynaklanan varyasyonun gözüne alınması amacıyla deneme içinde inek numarası rastgele faktör olarak modelde gözüne alindi. Verilerin analizinde $p \leq 0,05$ düzeyi istatistiki olarak önemli olduğu kabul edilmiştir. Tüm verilerin ortalamaları ± standart hata ile birlikte gösterilmiştir.



Şekil 10. Araştırma dizaynı.

4. BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

Çalışmaya dahil edilen tüm ineklerde (n=611) tohumlama anı belirlenen vücut kondisyon skoru (VKS) ortalama 3,11±0,01 tespit edilirken, konvansiyonel sperma (KON) ya da cinsiyeti belirlenmiş sperma grupları arasında (CBS, CBS4 ve CBS8) fark saptanmadı (p=0,07). İneklerin tohumlama haftasında kayıt altına alınan süt verimi ortalamasının 50,7±0,27 kg/gün olduğu, çalışma gruplar arasında fark bulunmadığı tespit edildi (p=0,27; Tablo 1)

Protokol öncesi ineklerin %18,7'si (114/611) postpartum uterus hastalıklarından en az birini (retensiyo sekundinarum, puerperal metritis, klinik metritis) yaşadığı tespit edildi. Postpartum uterus hastalıkları oranlarında gruplar arasında istatistiki fark tespit edilmedi (p=0,91). Bununla birlikte, protokol öncesi ineklerin %47,0'sinin (287/611) en az bir kez östrus gösterdiği belirlendi. Östrus gösterme oranı açısından gruplar arasında istatistiki farklılık saptanmadı. (Tablo 1).

Tablo 1. Konvansiyonel sperma ve cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) gruplarına dair genel bulguların karşılaştırılması.

Parametreler	KON (n=154)	CBS (n=152)	CBS4 (n=153)	CBS8 (n=152)	p-değeri
Vücut Kondüsyon Skoru	3,12±0,02	3,12±0,02	3,13±0,02	3,05±0,02	0,07
Süt verimi (kg/gün)	50,71±0,57	50,55±0,53	51,54±0,51	50,08±0,49	0,27
Postpartum Hastalık* oranı (%)	18,8	20,4	18,3	17,1	0,91
Protokol öncesi östrus oranı (%)	44,1	48,7	47,7	47,4	0,87

*Postpartum uterus hastalıklar; Puerperal metritis, klinik metritis, retensiyo sekundinarum

Çalışmada tohumlamayı gerçekleştiren tohumlamacılar incelendiğinde, tohumlayıcı 1, 2, 3 sırasıyla KON grubunda n=51;52;51, CBS grubunda n=50;50;52, CBS4 grubunda n=52;50;51 ve CBS8 grubunda n=51;52;49 adet zaman ayarlı tohumlama yaptı ve gebelik oranları üzerine tohumlayıcı etkisinin olmadığı tespit edildi (p=0,10)

Ön senkronizasyon başlangıcında ineklerin %81,3'ünün (497/611) siklik olduğu ve gruplar arasında siklik aktivite açısından fark olmadığı belirlendi (p=0,47, Tablo 2). Ovsynch protokolü başlangıcında ise ineklerin %94,9'unun (580/611) siklik olduğu saptanırken, gruplar arasında siklik aktivite açısından farklılık belirlenmedi (p=0,70, Tablo 2). Ovsynch protokolü başlangıcında ilk GnRH'a yanıt oranı %79,7 (487/611)

saptandı ve gruplar arasında fark saptanmadı (p=0,20, Tablo 2). Çalışmada, senkronizasyon protokolüne alınan yanıt %99,0 (605/611) belirlenirken gruplar arasında farklılık bulunmadı (p=0,34, Tablo 2).

Uygulanan zaman ayarlı tohumlama protokolü sonrası tohumlama sırasında tüm ineklerin %17,5'i (107/611) östrus gösterdi. Tohumlama anında östrus tespit oranı açısından gruplar arasında farklılık bulunmadı (p=0,77, Tablo 2). Benzer şekilde, tohumlama anında ölçülen preovulatör folikül çapı açısından gruplar arasında farklılık tespit edilmedi (p= 0,74, Tablo 2).

Tablo 2. Senkronizasyon protokolüne alınan yanıtların çalışma grupları arasında karşılaştırılması

Parametreler	**KON (n=154)**	**CBS (n=152)**	**CBS4 (n=153)**	**CBS8 (n=152)**	**p değeri**
Presenkronizasyon başlangıcı siklik durum (%)	82,5	77,0	83,0	82,9	0,47
Ovsynch başlangıcı siklik durum (%)	94,2	94,7	94,1	96,7	0,70
Ovsynch ilk GnRH'a yanıt (%)	81,8	82,2	81,0	73,7	0,20
Senkronizasyon oranı (%)	98,0	98,7	99,3	100,0	0,34
Östrus Tespit Oranı (%)	15,6	18,4	16,3	19,7	0,77
Folikül çapı (mm)	14,65±0,18	14,81±0,15	14,89±0,14	14,58±0,14	0,74

4.2. Gebelik Oranları ve Embriyonik Kayıp Oranları

KON ile yapılan tohumlama sonrası 36±3. gün gebelik oranı %50,0 (77/154) belirlenirken, tohumlama zamanı gözetmeksizin CBS gruplarında (CBS, CBS4 ve CBS8) yapılan tohumlama sonucu ilk gebelik oranı %44,9 (205/457) olarak tespit edildi (p=0,27). İkinci (73±3. gün) gebelik muayenelerinde konvansiyonel sperma ile %47,4 (73/154), CBS gruplarında toplam %40,0 (187/457) gebelik oranı tespit edildi (p=0,16). Gebelik muayeneleri arasında belirlenen embriyonik kayıp, konvansiyonel sperma grubunda %5,2 (4/77) ve CBS gruplarında toplam %8,8 (18/205) olarak tespit edildi (p=0,32).

KON ile ve farklı saatlerde (CBS, CBS4 ve CBS8) CBS ile yapılan tohumlamalar sonucu elde edilen gebelik oranları ve embriyonik kayıp oranları Tablo 3'te verilmiştir. Gruplar arasında birinci (p=0,50) ve ikinci (p=0,18) gebelik oranları açısından istatistiki bir fark tespit edilmedi. Ancak CBS ile tohumlama zamanı 4 saat ertelenerek (CBS4, 16-20. saatlerde) yapılan tohumlamalar sonucu elde edilen gebelik oranı sayısal olarak

(yaklaşık %5) diğer CBS gruplarından (CBS ve CBS8) yüksek bulundu. Embriyonik kayıp oranları bakımından da gruplar arası istatistiki bir fark tespit edilmedi (p=0,14, Tablo 3). CBS ile farklı saatlerde tohumlanan ineklerden doğan buzağı cinsiyet oranlarında fark tespit edilmedi, konvansiyonel sperma ile elde edilen buzağı cinsiyet oranı ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak yüksek bulundu (p=0.0001, Tablo 3)

Tablo-3. Konvansiyonel sperma (KON) veya farklı saatlerde CBS ile tohumlamaların (CBS, CBS4,CBS8) gebelik oranlarına ve embriyonik kayıp oranlarına etkisi

	KON	**CBS**	**CBS4**	**CBS8**	**p değeri**
Gebelik oranı (%) 36±3. Gün	50,0 (77/154)	42,8 (65/152)	48,4 (74/153)	43,4 (66/152)	0,50
Gebelik oranı (%) 70±3. Gün	47,4 (73/154)	38,8 (59/152)	46,4 (71/153)	37,5 (52/152)	0,18
Embriyonik kayıp (%)	5,19 (4/77)	9,23 (6/65)	4,05 (3/74)	13,64 (9/66)	0,14
Dişi buzağı oranı (%)	47,6 [a] (30/63)	86,5 [b] (45/52)	91,0 [b] (60/66)	92,3 [b] (48/52)	0.0001

Protokol öncesi östrus gösteren ve göstermeyen ineklerde KON ile gebelik oranı %50,0 belirlendi. CBS ile tohumlama yapılan gruplar (CBS, CBS4 ve CBS8) birlikte değerlendirildiğinde gebelik oranı protokol öncesi östrus gösteren inekler (%47,5; 104/219) ile östrus göstermeyen inekler (%42,4; 101/238) arasında farklılık göstermedi (p=0,28).

Kontrol grubunda tohumlama anında östrus gösteren ineklerde elde edilen gebelik oranı (%75,0; 18/24) ile östrus göstermeyen ineklerden elde edilen gebelik oranı (%45,4, 59/130) arasında istatiski bir fark (p=0,008) tespit edilmiştir. Ancak CBS ile yapılan tohumlamalarda tohumlama zamanı östrus gösterenler (%51,8, 43/83) ile göstermeyen ineklerden (%43,3, 162/374) elde edilen gebelik oranları arasında fark saptanamamıştır (p=0,16). Ancak CBS8 grubunda östrus gösteren ineklerde elde edilen gebelik oranlarının östrus göstermeyen ineklerden daha düşük olması nedeniyle, sadece CBS ve CBS4 grupları birlikte değerlendirildiğinde östrus gösteren ineklerdeki gebelik oranları (%60,3; 32/53) ile göstermeyen ineklerdeki gebelik oranları (%42,5; 107/252) arasında fark (p<0,02) tespit edilmiştir.

Tohumlama günü östrus gösteren ineklerde gebelik oranları karşılaştırıldığında KON ve CBS4 gruplarında CBS8'e göre daha yüksek gebelik oranları elde edildi ve bu farkın istatistiki olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu tespit edildi. Tohumalama günü östrus göstermeyen ineklerdeki gebelik oranları bakımından gruplar arasında istatiski açıdan bir fark olmadığı tespit edildi (Tablo 4).

Tohumlama günü östrus gösteren inekler embriyonik kayıp oranı bakımından karşılaştırıldığında KON ve CBS grupları arasında istatiski olarak anlamlı bir fark olduğu ancak CBS, CBS4 ve CBS8 grupları kendi içerisinde değerlendirildiğinde CBS ile tohumlanan gruplar arasında istatiski bir fark olmadığı tespit edildi. Ayrıca tohumlama günü östrus göstermeyen ineklerdeki embriyonik kayıp oranları bakımından gruplar arası bir fark olmadığı tespit edildi (Tablo 4).

Tablo-4. Tohumlama günü östrus göstermenin gebelik oranı ve embriyonik ölüm üzerine etkisinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gebelik oranı (%)	**KON (n=154)**	**CBS (n=152)**	**CBS4 (n=153)**	**CBS8 (n=152)**	**p değeri**
Östrus gösterenler	75,0^{a} (18/24)	53,6^{ab} (15/28)	68,0^{a} (17/25)	36,7^{b} (11/30)	0,02
Östrus göstermeyenler	45,4 (59/130)	40,3 (50/124)	44,5 (57/128)	45,1 (55/122)	0,41
Embriyonik kayıp (%)					
Östrus gösterenler	0,0^{c} (0/18)	20,0^{d} (3/15)	5,9^{cd} (1/17)	18,2^{cd} (2/11)	0,05
Östrus göstermeyenler	6,8 (4/59)	6,0 (3/50)	3,5 (2/57)	12,8 (7/55)	0,28

a, b; $p<0,02$; c, d; $p<0,05$

Postpartum uterus hastalığına sahip olan ineklerin gebelik oranlarını değerlendirdiğimizde, KON ve CBS4 gruplarında CBS grubuna göre daha yüksek gebelik oranları elde edildi ve bu farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Postpartum hastalığa sahip olmayan ineklerde ise gruplar arasında bir fark tespit edilmedi ($p>0,20$) (Tablo 5).

Tablo-5. Postpartum hastalıkların gebelik oranı üzerine etkisinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gebelik oranı (%)	**KON (n=154)**	**CBS (n=152)**	**CBS4 (n=153)**	**CBS8 (n=152)**	**p değeri**
*Postpartum hastalığa sahip olan	44,8^{a} (13/29)	19,4^{b} (6/31)	50,0^{a} (14/28)	38,5^{ab} (10/26)	0,01
*Postpartum hastalığa sahip olmayan	51,2 (64/125)	48,8 (59/121)	48,0 (60/125)	44,4 (56/126)	0,70

a, b; $p<0,05$, *Postpartum uterus hastalıklar; Puerperal metritis, klinik metritis, retensiyo sekundinarum

Ön enkronizasyon başlangıcında, Ovsynch protokolü başlangıcında siklik olan ve olmayan ineklerde gebelik oranları değerlendirildiğinde gruplar arasında gebelik oranları bakımından herhangi bir fark tespit edilmedi (p>0,05). Ayrıca Ovsynch protokolünün ilk GnRH uygulamasına cevap veren ve vermeyen ineklerde gebelik oranları karşılaştırıldığında gruplar fark tespit edilmedi (Tablo 6).

Tablo-6. Siklik durumun ve Ovsynch protokolündeki ilk GnRH'a yanıtın gebelik oranı üzerine etkisinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gebelik oranı %	**KON (n=154)**	**CBS (n=152)**	**CBS4 (n=153)**	**CBS8 (n=152)**	**p değeri**
Presenkronizasyon başlangıcında siklik olan	52,8 (67/127)	45,3 (53/117)	46,5 (59/127)	41,3 (52/126)	0,06
Presenkronizasyon başlangıcında siklik olmayan	37,0 (10/27)	34,3 (12/35)	57,7 (15/26)	53,8 (14/26)	0,13
Ovsynch başlangıcında siklik olan	49,7 (72/145)	44,4 (64/144)	49,3 (71/144)	43,5 (64/147)	0,19
Ovsynch başlangıcında siklik olmayan	55,6 (5/9)	12,5 (1/8)	33,3 (3/9)	40,0 (2/5)	0,06
Ovsynch ilk GnRH'a yanıt veren	56,3[a] (71/126)	44,0[b] (55/125)	54,0[ab] (67/124)	43,8[b] (49/112)	0,05
Ovsynch ilk GnRH'a yanıt vermeyen	21,4 (6/28)	37,0 (10/27)	24,1 (7/29)	42,5 (17/40)	0,07

a, b; p=0,05

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada, sağmal ineklerde zaman ayarlı suni tohumlama protokolünde son GnRH uygulamasından sonra ki farklı saatlerde, cinsiyeti belirlenmiş sperma ile yapılan tohumlamaların gebelik oranları üzerine etkisi değerlendirildi. Elde edilen veriler doğrultusunda zaman ayarlı suni tohumlama protokollerinde CBS için optimum tohumlama zamanının belirlenmesi hedeflendi.

Sağmal ineklerde gebelik oranlarını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Süt verimi, enfeksiyöz ve metabolik hastalıklar gibi faktörler gebelik oranlarını sperma türüne bağlı olmaksızın etkileyebilmektedirler. Sağmal ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokolü sonrası CBS ile farklı zamanlarda tohumlamanın gebelik oranları üzerine etkisini araştırdığımız bu çalışmada, bu faktörlerin gebelik oranlarına etki potansiyelleri ve araştırma grupları arasındaki dağılımlarının homojenitesi aşağıda detaylı biçimde tartışılmıştır.

Vücut kondisyon skoru, ineklerde geçiş dönemi yönetiminin değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir indikatördür. İnekler doğum sonrası dönemde ne kadar az VKS kaybı yaşarsa üreme performanslarının daha az etkilendiği ve ilk ovulasyonun daha erken gerçekleştiği ortaya konmuştur (Dochi, Kabeya, & Koyama, 2010). Ayrıca ineklerde doğumdan ilk tohumlamaya kadar geçen sürede ideal VKS değerinin 3,00-3,75 olması gerektiği belirtilmiştir (Ruegg, & Milton, 1995). Çalışmada, tüm ineklerin pp 43-49. günlerde yapılan VKS değerlendirmesi sonrası, ortalama değer 3,11 olarak tespit edilmiş ve gruplar arasında bir fark olmadığı belirlenerek, gruplar arasında VKS yönünden homojen bir dağılımın olduğu belirlenmiştir.

Doğum sonrası süt üretiminin giderek artması ancak yem tüketiminin aynı hızda artmaması ineklerde negatif enerji dengesinin oluşmasına neden olmaktadır (Peter, Vos, & Ambrose, 2009) Negatif enerji denegesinin şiddeti arttıkça postpartum ilk tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranlarının düştüğü bildirilmektedir (Walsh ve ark., 2007). Çalışmaya dahil edilen ineklerin tohumlama haftası süt verimleri değerlendirildiğinde ortalama süt verimlerinin 50,7 kg olduğu ve gruplar arasında süt verimi bakımından fark olmadığı tespit edildi.

Laktasyon sayısı ineklerde gebelik oranlarını etkileyen önemli bir faktördür. Laktasyon sayısı arttıkça gebelik oranları düşmektedir. Gebelik oranlarındaki bu düşüşün sebebi, süt veriminin artması, negatif enerji dengesinin şiddetlenmesi, metritis, mastitis ve ayak hastalıklarının insidansının artmasından dolayı şekillenebilmektedir (Santos ve ark., 2004). CBS ile yapılan çalışmalarda, laktasyon sayısı arttıkça elde edilen gebeliklerde düşme olduğu tespit edilmiştir. Primipar ve multipar inekler karşılaştırıldığında gebelik oranları arasındaki fark %4-17 arasında olabilmektedir (DeJarnette ve ark., 2008; Karakaya ve ark.,2014). Çalışmamızın yapıldığı işletmenin hayvan popülasyonun sadece 2. laktasyondaki ineklerden oluşması, CBS ile elde edilen gebeliklerde tohumlama zamanının etkisinin araştırıldığı çalışmamızda laktasyon sayısının gebelik oranları üzerine olası etkisini ortadan kaldırmıştır.

CBS üretimi yapılırken, ayrıştırma işlemi sırasında sperm hücreleri boğadan boğaya farklı oranlarda etkilendiğinden boğa fertilite oranları da değişmektedir (Drake ve ark., 2020; Frijters ve ark., 2009; Hall ve ark., 2017; Sá Filho ve ark., 2010, 2013) Yapılan bir çalışmada inek ve düvelerde elde edilen gebeliklerde boğaların fertilite oranları arasında fark olduğu ve fertilite oranlarının %11-63 arasında değiştiği bildirilmiştir (Mellado ve ark., 2014; Sá Filho ve ark., 2013). Bu nedenle CBS yönünden yüksek fertiliteye sahip olduğu bilinen boğaların kullanılması daha iyi gebelik oranları elde etmeyi sağlayacaktır (Hall ve ark., 2017). CBS ile farklı zamanlarda tohumlamanın gebelik oranları üzerine etkisinin esas alındığı bu çalışmada boğa faktöründen etkilenmemek amaçlı tek bir boğaya ait spermalar kullanılmıştır.

Spermanın hazırlanması ve uygulanmasındaki tecrübe farkının gebelik sonuçlarına etki ettiği bilinmektedir (DeJarnette ve ark., 2011). Çalışma boyunca 3 adet tohumlayıcı tarafından yapılan tohumlamalar sperma tipine ve sayısına göre değerlendirildiğinde, her tohumlayıcının her bir grupta eşdeğer sayıda tohumlama yaptığı ve yapılan tohumlamalar sonucu elde edilen gebelik oranları bakımından tohumlayıcılar arasında herhangi bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Yukarıda ayrıntılı biçimde bahsedildiği üzere, sperma tipine bağlı olmaksızın gebeliği etkileyen ana faktörler değerlendirildiğinde, araştırmamızdaki gruplar arasında gebelik oranlarına etkileri bakımında homojen olarak yer aldığı tespit edilmiştir. Bu homojenite,

çalışmamızın esas araştırma konusu olan CBS ile farklı zamanlarda tohumlamanın gebelik oranları üzerine etksinin daha net bir şekilde değerlendirilmesine imkan sağladığı düşünülmektedir.

Gebeliğe etki eden diğer faktörler arasında araştırma gruplarımızda homojen dağılmalarına rağmen, gruplar arasındaki gebelik oranlarına etki ettiği belirlenen faktörler, tohumlama günü östrus gösterme ve postpartum uterus hastalığı geçmişi olarak belirlenmiştir. Östrus tespiti, ister konvansiyonel sperma ister CBS kullanımı için yüksek gebelik oranlarının elde edilmesi açısından önemli bir faktördür. Her ne kadar zaman ayarlı tohumlama protokollerinde östrus tespitine ihtiyaç duyulmadan tohumlama gerçekleştirilebiliyorsa da, zaman ayarlı tohumlama protokolüne alınan ve tohumlama günü östrus gösterdiği tespit edilen ineklerde gebelik oranı %50 olarak tespit edilirken östrus göstermeyenlerde bu oranın %34 olduğu bildirilmiştir (Sá Filho ve ark., 2012). Araştırmamızda tohumlama günü östrus göstermenin, elde edilen gebelik oranlarına etkisini değerlendirdiğimizde CBS8 dışında tüm gruplarda pozitif bir etki gözlenmiştir. Hatta CBS ile 8 saat ertelenerek, son GnRH sonrası 20-24. saatlerde tohumlamaları yapılan inekler (CBS8) arasında östrus gösteren ineklerdeki gebelik oranının (%36,7), göstermeyen ineklere göre (%45,1), diğer grupların tersine, düşük ($p<0,02$) olduğu tespit edilmiştir. Muhtemelen bu durumun sebebi, östrus gösteren ineklerde folikülün ovulasyon sürecine son GnRH uygulamasından önce girmesi ve CBS8 grubundaki ineklerin muhtemel ovulasyona en yakın zamanda tohumlanmasından dolayı sperm hücrelerinin kapasitasyon için yeterli zamanı (~ 6 saat) bulamamasıdır.

Araştırmamızda gruplara homojen dağılımı söz konusu olmasına rağmen, gruplar arasında gebelik oranlarına etki ettiği belirlenen bir diğer faktör, postpartum dönemdeki uterus hastalıkları geçmişi olarak karşımıza çıkmaktadır. Retensiyo sekundinarum, puerperal metritis ve klinik metritis gibi hastalıklar gebelik başına tohumlama sayısının artması, doğum- gebe kalma aralığının uzaması gibi fertilite problemlerinin ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır. Çalışmaya dahil edilen ineklerin %19'u retensiyo sekundinarum, puerperal metritis veya klinik metritis gibi hastalıklardan en az birisini yaşadığı tespit edilmiştir. Hastalık geçmişi bakımından gruplar arası dağılım incelendiğinde ise KON ve CBS grupları arasında hastalık geçmişleri bakımından fark

olmadığı ve gruplar arasında homojen dağılım olduğu belirlenmiştir. Ancak hastalık geçmişi olmayan ineklerde gebelik oranları bakımından fark saptanmazken, uterus hastalığı geçmişine sahip olan inekler değerlendirildiğinde CBS grubunun gebelik oranı (%19), yine hastalık geçmişine sahip KON ve CBS4 gruplarında elde edilen gebelik oranlarından (%45 ve %50) düşük olduğu belirlenmiştir. Postpartum hastalık geçiren inekler içerisinde CBS grubundaki ineklerin gebelik oranlarının daha düşük olma sebebinin, ayrıştırma işlemi sırasında kapasitasyon sürecinin başladığı bilinen CBS'nin ideal olmayan uterus ortamına daha uzun süre (CBS4 ve CBS8 gruplarına göre) maruz kalması olabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde sağmal işletmelerde reprodüktif yönetim genellikle zaman ayarlı tohumlama protokolleri ile yapılmaktadır. Zaman ayarlı suni tohumlama protokollerindeki başarı ve dolayısıyla da gebelik oranları, ineklerin protokollere başlangıç safhasında ovaryumlarında bulunan yapılar ve hormonal tedaviye alınan cevaba bağlıdır. Doğum sonrası dönemde senkronizasyon protokollerinde hormonal tedaviye alınan cevabı etkileyen faktörlerden birisi de sürüdeki nonsiklik hayvan sayısıdır. Çalışmamızda presenkronizasyon protokolü başlagıcında non-siklik inek oranının KON, CBS, CBS4 ve CBS8 gruplarında sırasıyla %17, %23, %17 ve %17 olduğu, nonsiklik inek oranı bakımından gruplar arasında fark olmadığı tespit edilmiş ve doğum sonrası yüksek verimli ineklerde bildirilen %20-30 nonsiklik hayvan oranı ile benzer bulunmuştur (Moreira ve ark., 2001).

Ovsynch protokolüne erken diöstrüs safhasında başlanıldığında daha iyi gebelik oranları elde edilmektedir. (Caraviello ve ark., 2006; Moreira ve ark., 2001). Protokol başlangıcında korpus luteuma sahip olan hayvanlarda, protokolün ilk GnRH'sı ile uyarılan foliküler dalga, yüksek progesteron etkisinde gelişmekte ve bu da daha iyi gebelik oranları elde etme imkanına sahip olmamızı sağlamaktadır (Bisinotto, Chebel, & Santos, 2010). Bu amaçla, Ovsynch protokolü başlangıcında temel anlamda siklik, daha spesifik olarak da erken diöstrus safhasında olan ineklerin oranını arttırmak amaçlı Presynch Ovsynch, Double Ovsynch ve G6G gibi presenkronizasyon protokolleri kullanılmaktadır (Bello ve ark., 2006; Moreira ve ark., 2001; Souza ve ark., 2008). Presenkronizasyon sonrası Ovsynch başlangıcında siklik hayvan oranı G6G protokolü

için %71 (Bello ve ark., 2006), Presynch Ovsynch protokolü için %75-85 (Souza ve ark.,2008; Karakaya-Bilen ve ark., 2019) ve Double Ovsynch protokolü için %85-95 (Souza ve ark., 2008; Karakaya-Bilen ve ark., 2019) olarak bildirilmiştir. Çalışmamızın metodunda tüm inekler, postpartum ilk tohumlama amacıyla modifiye G6G (-19 $PGF_{2\alpha}$,-17 GnRH,-10 ovsynch-56) protokolüne alınmış ve Ovsynch protokolü başlangıcındaki siklik inek oranı %95 olarak belirlenmiştir. Bu oran bir presenkronizasyon protokolünden beklenen en iyi oranlarla benzer olup, protokolün etkinliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

Zaman ayarlı tohumlamanın gerçekleştirildiği Ovsynch protokolünde, ovulasyon senkronizasyonunun gerçekleşmesini sağlayan ve gebelik oranlarında elde edilecek başarıyı etkileyen en önemli faktör ilk GnRH uygulamasına alınan yanıttır (Keskin ve ark., 2010). Daha önce yapılan çalışmalarda presenkronizasyon protokolü gözetilmeden ilk GnRH uygulamasına yanıtın %45-90 aralığında olduğu tespit edilmiştir (Bello ve ark., 2006; Galvao ve ark., 2007; Pursley ve ark., 1995). Çalışmamızda da benzer şekilde ilk GnRH uygulamasına yanıt oranı grup fark etmeksizin %80 olarak tespit edilmiştir.
İlk GnRH uygulamasına cevap veren ineklerden, vermeyen ineklere göre yaklaşık %10-20 oranında da fazla gebelik elde edildiği bildirilmektedir (Keskin ve ark.,2010; Yilmazbas-Mecitoglu ve ark., 2012). Yapılan çalışmalara paralel olarak çalışmamızda, konvansiyonel sperma ile tohumlanan grubumuzda Ovsynch protokolünün ilk GnRH uygulamasına yanıt veren ineklerde gebelik oranı (%56), yanıt vermeyenlere göre (%21) yüksek belirlenmiştir. CBS ile tohumlanan gruplarımızda, ilk GnRH'ya yanıt sadece CBS4 grubunda gebeliğe etkisi olduğu tespit edilmiştir.

İlk GnRH'a yanıt oranının gruplar arasında benzer saptanması ile uyumlu olarak protokol sonunda tohumlama günü ölçülen folikül çapları da gruplar arasında fark belirlenmeksizin ~15mm olarak ölçülmüş ve zaman ayarlı tohumlama protokollerinde gebelik ile sonuçlanma ihtimali yüksek olarak bildirilen 14-18 mm aralığında bulunmaktadır (Keskin ve ark., 2016)

Genel olarak, ineklerde konvansiyonel sperma ile yapılan tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları CBS ile yapılan tohumlamalar sonucu elde edilen gebelik oranlarından daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Andersson ve ark., 2006; DeJarnette ve ark., 2008;

Karakaya ve ark., 2014; Karakaya-Bilen ve ark., 2019). Konvansiyonel sperma ile karşılaştırıldığında, CBS kullanımı sonucu elde edilen gebelik oranlarının, düvelerde %10-20, ineklerde ise %20-30 arasında daha düşük elde edildiği bildirilmektedir (Garner, & Seidel, 2008). CBS kullanımı sonrası gebelik oranlarındaki bu düşüklüğün sebebi payette bulunan sperma sayısının düşüklüğü ve ayrıştırma işlemi sırasında sperm hücrelerinin zarar görerek yaşam ömürlerinin kısalması olarak açıklanmaktadır (Frijters ve ark., 2009; Garner, 2006). Ancak, CBS teknolojisi her geçen gün gelişmekte ve sperm hücrelerinin uğradığı hasarı azaltarak daha iyi gebelik oranları vadetmektedir. Benzer şekilde, sağmal ineklerde yapılan güncel çalışmalar değerlendirildiğinde, Ovsynch protokolü sonrası konvansiyonel ve CBS ile elde edilen gebelik oranları arasındaki fark %9-12 olarak tespit edilmiştir (Drake ve ark., 2020; Karakaya-Bilen ve ark., 2019). Zaman ayarlı tohumlama protokolü kapsamında CBS kullanım zamanını araştırıldığı çalışmamızda, CBS ile elde edilen gebelik oranları, konvansiyonel sperma ile karşılaştırıldığında %2 ila %7 arasında daha düşük olduğu (CBS; %7, CBS4; %2, CBS8; %7) belirlenmiştir. Konvansiyonel sperma ile elde edilen gebelik oranı (%50) ile en az farkın, tohumlama zamanınının konvansiyonel için önerilen zamana göre 4 saat ertelenerek (16-20. saatlerde) yapıldığı CBS4 grubunda (%48) olduğu dikkat çekmektedir.

Presenkronizasyon protokolleri ile Ovsynch protokolüne alınan yanıt yani senkronizasyon oranı arttırılmakta ve dolayısıyla daha yüksek gebelik oranları elde edilebilmektedir. Karakaya-Bilen ve ark.'nın (2019) yaptığı araştırmada, Ovsynch, Presynch Ovsynch ve Double Ovsynch protokollerinde CBS kullanımı sonrası gebelik oranlarının değerlendirildiği çalışmada, gebelik oranları sırasıyla %28, %36 ve %48 olarak tespit edilmiş ve post partum CBS ile ilk tohumlamaları yapılacak olan ineklerde pre-senkronizasyon protokolleri ile daha iyi gebelik oranları elde edildiği ortaya konmuştur (Karakaya-Bilen ve ark., 2019). Double Ovsynch protokolü sonrası CBS ile tohumlamaların yapıldığı bir başka çalışmada ise gebelik oranı %50 olarak bildirilmiştir (Lauber ve ark., 2020). Yukarda bahsedilen çalışmalar ile benzer şekilde, ineklerde CBS ile tohumlama zamanının araştırıldığı çalışmamızda, presenkronizasyon protokolü olarak

modifiye G6G protokolü uygulanmış ve CBS, CBS4 ve CBS8 gruplarımızda sırasıyla %43, %48 ve %43 gebelik oranları elde edilmiştir.

Sağmal ineklerde CBS ile yapılan çalışmalara baktığımızda embriyonik kayıp oranları %5-18 arasında bildirilmektedir (Drake ve ark., 2020; Karakaya ve ark., 2014; Lauber ve ark., 2020) Embriyonik kayıp oranları değerlendirildiğinde ise konvansiyonel sperma ile %5 oranında embriyonik kayıp yaşanırken, CBS gruplarımızda sırasıyla CBS; %9, CBS4; %4, CBS8; %14 tespit edilmiştir. Gebelik oranları ve embriyonik kayıp oranları bakımından tohumlama zamanının 4 saat ertelenerek yapıldığı CBS4 grubunda elde edilen gebelik ve embriyonik kayıp oranlarının kontrol grubuna (konvansiyonel sperma) yakın olması dikkati çekmektedir.

CBS kullanımı ile %90'ın üzerinde arzu edilen cinsiyette buzağı elde edilebilmektedir (Garner, & Seidel, 2003). Özellikle sağmal işletmelerde doğan dişi buzağılar erkeklere göre daha fazla ekonomik önem arz etmektedir. Bu çalışmada da konu ile ilgili genel bilgi ile uyumlu biçimde konvansiyonel sperma ile tohumlamalar sonrası elde edilen dişi buzağı oranı %48 olarak tespit edilirken, CBS kullanımı ile elde edilen dişi buzağı oranı %90 olarak belirlenmiş olup, CBS grupları arasında en düşük dişi buzağı oranı %87 olarak, CBS'nin konvansiyonel sperma için önerildiği zamanda kullanılması sonrası elde edildiği dikkat çekmektedir. CBS ile farklı saatlerde tohumlamanın elde edilecek dişi buzağı oranına etkisinin araştırıldığı çalışmaların literatürde henüz yer almadığı bilindiğinden, bu etkiyi araştırmak için daha geniş ölçekli bir saha çalışmasının faydalı olacağı kanaati oluşmuştur.

Sağmal ineklerde CBS ile tohumlama zamanının ertelenmesinin gebelik oranlarına etkisinin araştırıldığı çalışmalar; östrus tespiti sonrası (Bombardelli ve ark., 2016) ve zaman ayarlı tohumlama protokollerinde (Drake ve ark., 2020; Lauber ve ark., 2020) olmak üzere sınırlı sayıda bulunmaktadır. Sağmal ineklerde progesteron tabanlı Ovsynch protokolünde, son GnRH uygulamasından sonra konvansiyonel sperma ile 16. saatte %61, CBS ile 16. ve CBS ile 22. saatlerde yapılan tohumlamalarda gebelik oranları sırasıyla %49 ve %51 elde edilmiş ve tohumlama zamanının ertelenmesinin gebelik oranları üzerine etkisinin bulunamadığı bildirilmiştir (Drake ve ark., 2020). Yine CBS'nin ilk laktasyondaki ineklerde Double Ovsynch protokolünde, son GnRH

uygulaması sonrası tohumlamanın 16. satten 24. saate ertelendiğinde gebelik oranlarının (sırasıyla %50 ve %44) düştüğü tespit edilmiştir (Lauber ve ark., 2020). Araştırmamızda konvansiyonel sperma için önerilen zamanda (12-16. saatlerde) %50 gebelik oranı elde edilirken; CBS nin, 12-16. saatlerde uygulanması ile %43 (CBS), tohumlama zamanının 4 saat ertelenerek uygulanması (16-20. saatlerde) ile %48 (CBS4) ve 8 saat ertelenmesi (20-24. saatlerde) ile %43 gebelik oranları elde edilmiştir.

CBS'nin konvansiyonel sperma için önerilen zamandan ötelenerek ovulasyon ile tohumlama zamanı arasındaki süreyi kısaltarak uygulanmasının gebeliğe etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, istatistiki olmasa da sayısal olarak en iyi gebelik oranları tohumlamanın 4 saat ertelenerek, 16-20. saatlerde, uygulanması ile elde edilmiştir. CBS4 grubundaki tohumlama zaman aralığı, zaman ayarlı tohumlama protokolü kapsamında muhtemel ovulasyon zamanından (GnRH uygulaması sonrası 24-32 saat) önceki 8-12. saatlere denk gelmektedir. Çalışmamızın sonuçları ile paralel olarak düvelere özgü zaman ayarlı tohumlama protokolünde CBS'nin kullanıldığı bir çalışmada, tahmini ovulasyon zamanına 12,5 saat kala yapılan tohumlamalarda, 6,5 saat kala yapılanlara göre daha iyi gebelik oranları elde edilmiştir (Sales ve ark., 2011).

Sağmal ineklerde Double Ovsynch protokolünde CBS ile tohumlamaların son GnRH sonrası 16. ve 24. saatlerde yapıldığı çalışmada, 24. saatte tohumlamanın 16. saatte tohumlamaya göre gebelik oranlarında düşüşe sebep olduğu ve CBS kullanımında tohumlama zamanının 24. saate, bir başka deyişle muhtemel ovulasyon zamanına çok yakın bir zamana, ertelenmesinin dezavantajlı olabileceği bildirilmiştir (Lauber ve ark., 2020). Bu çalışma ile paralellik gösterecek biçimde, sunulan çalışmada tohumlamanın 8 saat ertelenerek, 20-24. saatlerde, muhtemel ovulasyona 4-8 saat kala, uygulandığı CBS8 grubunda gebelik oranı, CBS4 grubuna göre sayısal bir düşüş göstermiştir. Ancak Lauber ve ark.'nın (2020) çalışmasında, tohumlama zamanının ertelenmesi ile gebelik oranlarının düşmesinin nedeninin, muhtemelen sahaya uyarlayabilmek adına, tohumlamanın ertelenmesi yerine protokolün 24. saat grubunda (Ovsynch 48), son GnRH uygulanma zamanının 16. saat grubuna (Ovsynch 56) göre öne çekilmesi ile ovulasyonun erken indüklenmesinden dolayı olabileceği bildirilmiştir (Drake ve ark., 2020). Nitekim, bu çalışmada gruplar arasında son GnRH ile ovulasyonu uyarılan

dominant folikül aynı özellikte bulunmamaktadır. CBS'nin zaman ayarlı tohumlama protokolünde farklı saatlerde uygulanmasının araştırıldığı mevcut son çalışma değerlendirilecek olursa, bu çalışmada CBS ile tohumlama zamanı olarak 16 ve 22. saatler seçilmiş ve iki CBS grubu arasında elde edilen gebelik oranlarında bir fark saptanmadığı ancak bu gebelik oranlarının konvansiyonel sperma ile elde edilen gebelik oranlarına %82 oranında yaklaşıldığı bildirilmiştir (Drake ve ark., 2020). Bu çalışmada sağmal ineklerde CBS kullanımı için optimum saat olarak verilen tohumlama saatleri 16. ve 22. saatler olarak bildirilmiştir. Araştırmamızda en iyi gebelik oranlarının elde edildiği ve konvansiyonel sperma ile elde edilen gebelik oranlarına, %96 oranında yaklaşılan, CBS4 grubumuzun tohumlama saatleri de bu saatler ile neredeyse tamamen örtüşmektedir.

Yukarıda sonuçları değerlendirilen ve zaman ayarlı tohumlama protokolünde CBS kullanımına yönelik tohumlama zamanının belirlenmesi amaçlanan az sayıdaki çalışmalarla araştırma sonuçlarımız beraber değerlendirildiğinde, CBS ile yapılan tohumlamaların konvansiyonel tohumlama için önerilen zamandan en az 4 saat ötelenerek uygulanmasının gebelik oranlarında iyileşmeye sebep olduğu ancak bu sürenin daha da arttırılmasının gebelik oranlarında düşüş eğilimi yarattığı kanaatine varılabilmektedir.

Sonuç olarak bu araştırma ile, sağmal ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokollerinde cinsiyeti belirlenmiş dişi sperma kullanımında, tohumlamanın 4 saat ertelenerek, son GnRH uygulamasından sonra 16-20. saatlerde, uygulanması ile hem gebelik oranlarında hem de embriyonik ölüm oranlarında sayısal bir iyileşme elde edilebileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca söz konusu araştırma ile sağmal ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokollerinde CBS ile yapılabilecek ideal tohumlama zamanının belirlenmesi hakkındaki sınırlı bilgiye katkı sağlandığı ve araştırmanın daha fazla sayıda hayvan materyali ile saha koşullarına aktarılabilmesinin faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. Theriogenology. 69, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026

Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ko, J. C. H., & Ginther, O. J. (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. Journal of Reproduction and Fertility. 94(1), 177–188. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940177

Ahmadzadeh, A., Frago, F., Shafii, B., Dalton, J. C., Price, W. J., & McGuire, M. A. (2009). Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. Animal Reproduction Science. 112(3–4), 273–282. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.024

Allrich, R. D. (1994). Endocrine and Neural Control of Estrus in Dairy Cows. Journal of Dairy Science.77(9), 2738–2744. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77216-7

Andersson, M., Taponen, J., Kommeri, M., & Dahlbom, M. (2006). Pregnancy Rates in Lactating Holstein – Friesian Cows after Artificial Insemination with Sexed Sperm. Reproduction in Domestic Animals. 97, 95–97.

At-Taras, E. E., & Spahr, S. L. (2001). Detection and characterization of estrus in dairy cattle with an electronic heatmount detector and an electronic activity tag. Journal of Dairy Science, 84(4), 792–798. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74535-3

Ayres, H., Ferreira, R. M., Cunha, A. P., Araújo, R. R., & Wiltbank, M. C. (2013). Double-Ovsynch in high-producing dairy cows: Effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. Theriogenology. 79(1), 159–164. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.001

Bello, N. M., Steibel, J. P., & Pursley, J. R. (2006). Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 89(9), 3413–3424. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72378-5

Bisinotto, R. S., Castro, L. O., Pansani, M. B., Narciso, C. D., Martinez, N., Sinedino, L. D. P., Pinto, T. L. C., Van de Burgwal, N. S., Bosman, H. M., Surjus, R. S., Thatcher, W. W., & Santos, J. E. P. (2015). Progesterone supplementation to lactating dairy cows without a corpus luteum at initiation of the Ovsynch protocol. Journal of Dairy Science. 98(4), 2515–2528. https://doi.org/10.3168/jds.2014-9058

Bisinotto, R. S., Chebel, R. C., & Santos, J. E. P. (2010). Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. Journal of Dairy Science. 93(8), 3578–3587. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3047

Bisinotto, R. S., Ribeiro, E. S., & Santos, J. E. P. (2014). Synchronisation of ovulation for management of reproduction in dairy cows. Animal. 8, 151–159. https://doi.org/10.1017/S1751731114000858

Bodmer, M., Janett, F., Hässig, M., Den Daas, N., Reichert, P., & Thun, R. (2005). Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. Theriogenology. 64(7), 1647–1655. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.011

Bombardelli, G. D., Soares, H. F., & Chebel, R. C. (2016). Time of insemination relative to reaching activity threshold is associated with pregnancy risk when using sex-sorted semen for lactating Jersey cows. Theriogenology. 85(3), 533–539. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.042

Brusveen, D. J., Cunha, A. P., Silva, C. D., Cunha, P. M., Sterry, R. A., Silva, E. P. B., Guenther, J. N. & Wiltbank, M. C. (2008). Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and Artificial Insemination (Al) during ovsynch affects pregnancies per Al in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 91(3), 1044–1052. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0409

Butler, S. T., Hutchinson, I. A., Cromie, A. R., & Shalloo, L. (2014). Applications and cost benefits of sexed semen in pasture-based dairy production systems. Animal. 8, 165–172. https://doi.org/10.1017/S1751731114000664

Caraviello, D. Z., Weigel, K. A., Fricke, P. M., Wiltbank, M. C., Florent, M. J., Cook, N. B., Nordlund, K. V., Zwald, N. R., & Rawson, C. L. (2006). Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. Journal of Dairy Science. 89(12), 4723–4735. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72522-X

Cerri, R. L. A., Rutigliano, H. M., Bruno, R. G. S., & Santos, J. E. P. (2009). Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. Animal Reproduction Scienc. 110(1–2), 56–70. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.005

Chebel, R. C., Guagnini, F. S., Santos, J. E. P., Fetrow, J. P., & Lima, J. R. (2010). Sex-sorted semen for dairy heifers: Effects on reproductive and lactational performances. Journal of Dairy Science. 93(6), 2496–2507. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2858

Chebel, R. C., & Santos, J. E. P. (2010). Effect of inseminating cows in estrus following a presynchronization protocol on reproductive and lactation performances. Journal of Dairy Science. 93(10), 4632–4643. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3179

Chebel, R. C., Santos, J. E. P., Reynolds, J. P., Cerri, R. L. A., Juchem, S. O., & Overton, M. (2004). Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. Animal Reproduction Science. 84(3–4), 239–255. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.012

Colazo, M. G., Ponce-Barajas, P., & Ambrose, D. J. (2013). Pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows subjected to 2 different intervals from presynchronization to initiation of Ovsynch protocol. Journal of Dairy Science. 96(12), 7640–7648. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6750

Crowe, M. A. (2008). Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. Reproduction in Domestic Animals. 43, 20–28. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01210.x

Dalton, J. C., Nadir, S., Bame, J. H., Noftsinger, M., Nebel, R. L., & Saacke, R. G. (2001). Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. Journal of Dairy Science, 84(11), 2413–2418. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74690-5

Daniel Givens, M., & Marley, M. S. D. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. Theriogenology, 70(3), 270–285. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.018

De Vries, A, Overton, M., Fetrow, J., Leslie, K., Eicker, S., & Rogers, G. (2008). Exploring the impact of sexed Semen on the structure of the dairy industry. Journal of Dairy Science. 91(2), 847–856. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0536

De Vries, Albert. (2015). The economics of sexed semen in dairy heifers and cows. University of Florida Animal Science Department, January. http://edis.ifas.ufl.edu.

DeJarnette, J. M., Leach, M. A., Nebel, R. L., Marshall, C. E., McCleary, C. R., & Moreno, J. F. (2011). 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(7), 3477–3483. https://doi.org/10.3168/jds.2011-4214

DeJarnette, J. M., McCleary, C. R., Leach, M. A., Moreno, J. F., Nebel, R. L., & Marshall, C. E. (2010). Effects of 2.1 and 3.5×106 sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. Journal of Dairy Science. 93(9), 4079–4085. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3181

DeJarnette, J. M., Nebel, R. L., & Marshall, C. E. (2009). Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. Theriogenology. 71(1), 49–58. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.042

DeJarnette, J. M., Nebel, R. L., Marshall, C. E., Moreno, J. F., McCleary, C. R., & Lenz, R. W. (2008). Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in holstein heifers and lactating cows. Journal of Dairy Science. 91(5), 1778–1785. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0964

DeJarnette, J. M., Sattler, C. G., Marshall, C. E., & Nebel, R. L. (2007). Voluntary waiting period management practices in dairy herds participating in a progeny test program. Journal of Dairy Science. 90(2), 1073–1079. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71594-1

Dewey, S. T., Mendonça, L. G. D., Lopes, G., Rivera, F. A., Guagnini, F., Chebel, R. C., & Bilby, T. R. (2010). Resynchronization strategies to improve fertility in lactating dairy cows utilizing a presynchronization injection of GnRH or supplemental progesterone: I. Pregnancy rates and ovarian responses. Journal of Dairy Science. 93(9), 4086–4095. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3233

Diskin, M. G., & Morris, D. G. (2008). Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. Reproduction in Domestic Animals. 43, 260–267. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x

Diskin, M., & Sreenan, J. (2000). Expression and detection of oestrus in cattle. Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences, 40(5), 13. https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00900404

Dochi, O., Kabeya, S., & Koyama, H. (2010). Factors affecting reproductive performance in high milk producing Holstein cows. Journal of Reproduction and Development. 56, 61-65. https://doi.org/10.1262/jrd.1056S61

Drake, E., Holden, S. A., Aublet, V., Doyle, R. C., Millar, C., Moore, S. G., Maicas, C., Randi, F., Cromie, A. R., Lonergan, P., & Butler, S. T. (2020). Evaluation of delayed timing of artificial insemination with sex-sorted sperm on pregnancy per artificial insemination in seasonal-calving, pasture-based lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 103(12), 12059–12068. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18847

Dransfield, M. B. G., Nebel, R. L., Pearson, R. E., & Warnick, L. D. (1998). Timing of Insemination for Dairy Cows Identified in Estrus by a Radiotelemetric Estrus Detection System. Journal of Dairy Science. 81(7), 1874–1882. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75758-3

Ferguson, J. D., Galligan, D. T., & Thomsen, N. (1994). Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. Journal of Dairy Science. 77(9), 2695–2703. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X

Ferguson, J. D., & Skidmore, A. (2013). Reproductive performance in a select sample of dairy herds. Journal of Dairy Science. 96(2), 1269–1289. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5805

Firk, R., Stamer, E., Junge, W., & Krieter, J. (2002). Automation of oestrus detection in dairy cows: A review. Livestock Production Science. 75(3), 219–232. https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00323-2

Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., & Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in Bos taurus cattle. Animal Reproduction Science. 124(3–4), 163–169. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.025

Fortune, J. E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. Biology of Reproduction. 50, 225–232. https://academic.oup.com/biolreprod

Fricke, P. M., Carvalho, P. D., Giordano, J. O., Valenza, A., Lopes, G., & Amundson, M. C. (2014). Expression and detection of estrus in dairy cows: The role of new technologies. Animal. 8, 134–143. https://doi.org/10.1017/S1751731114000299

Frijters, A. C. J., Mullaart, E., Roelofs, R. M. G., van Hoorne, R. P., Moreno, J. F., Moreno, O., & Merton, J. S. (2009). What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? Theriogenology. 71(1), 64–67. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.025

Galvão, K. N., Sá Filho, M. F., & Santos, J. E. P. (2007). Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. Journal of Dairy Science. 90(9), 4212–4218. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0182

Garner, D. L. (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm. Theriogenology. 65, 943–957. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.009

Garner, D. L. & Seidel, G. E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. Theriogenology. 69(7), 886–895. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.006

Garner, D. L. & Seidel, G. E. (2003). Past, present and future perspectives on sexing sperm. Canadian Journal of Animal Science. 83(3), 375–384. https://doi.org/10.4141/A03-022

Geary, T. W., & Whittier, J. C. (1998). Effects of a timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or CO-Synch protocol in beef cows.

Professional Animal Scientist. 14(4), 217–220. https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31832-5

Gimenes, L. U., Sá Filho, M. F., Carvalho, N. A. T., Torres-Júnior, J. R. S., Souza, A. H., Madureira, E. H., Trinca, L. A., Sartorelli, E. S., Barros, C. M., Carvalho, J. B. P., Mapletoft, R. J., & Baruselli, P. S. (2008). Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers. Theriogenology. 69(7), 852–858. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.001

Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Kulick, L. J., & Kot, K. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle: Role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. Biology of Reproduction. 62(4), 920–927. https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.920

Gosálvez, J., Ramirez, M. A., López-fernández, C., Crespo, F., & Evans, K. M. (2011). Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. Theriogenology. 75(2), 197–205. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.006

Guner, B., Erturk, M., Yilmazbas-Mecitoglu, G., Keskin, A., Karakaya-Bilen, E., Cakircali, R., Serim, E., Orman, A., & Gumen, A. (2020). Effect of delaying the time of insemination with sex-sorted semen on pregnancy rate in Holstein heifers. Reproduction in Domestic Animals. May, 1411–1417. https://doi.org/10.1111/rda.13789

Grummer, R. R. (2007). Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: Management of the dry period. Theriogenology. 68, 281–288. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.031

Hall, J. B., Kasimanickam, R. K., Glaze, J. B. & Roberts-Lew, M. C. (2017). Impact of delayed insemination on pregnancy rates to gender selected semen in a fixed-time AI system. Theriogenology. 102, 154–161. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.014

Hayakawa, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A. & Aoyagi, Y. (2009). Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. Theriogenology. 71(1), 68–73. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.016

Healy, A. A., House, J. K. & Thomson, P. C. (2013). Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. Journal of Dairy Science. 96(3), 1905–1914. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5465

Herlihy, M. M., Giordano, J. O., Souza, A. H., Ayres, H., Ferreira, R. M., Keskin, A., Wiltbank, M. C. (2012). Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 95(12), 7003–7014. https://doi.org/10.3168/jds.2011-5260

Hernandez, J., Shearer, J. K. & Webb, D. W. (2001). Effect of lameness on the calving-to-conception interval in dairy cows. Journal of American Veterinary Medical Association. 218(10), 1611–1614. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73554-7

Hockey, C. D., Morton, J. M., Norman, S. T., & McGowan, M. R. (2010). Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating dairy cattle. Reproduction in Domestic Animals. 45(6), 239–248. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01548.x

Holden, S. A. & Butler, S. T. (2018). Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. Animal. 12(s1), s97–s103. https://doi.org/10.1017/S1751731118000721

Hötzel, M. J., Longo, C., Balcão, L. F., Cardoso, C. S., & Costa, J. H. C. (2014). A survey of management practices that influence performance and welfare of dairy calves reared in southern Brazil. Plos One. 9(12), 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114995

Jain, A., Yathish, H., Jain, T. & Sharma, A. (2011). Efficient Production of Sexed Semen By Flow Cytometry: A Review. Agricultural Reviews. 32(1), 36–45. https://www.arccjournals.com

Joezy-Shekalgorabi, S., Maghsoudi, A., & Mansourian, M. R. (2017). Reproductive performance of sexed versus conventional semen in Holstein heifers in various semiarid regions of Iran. Italian Journal of Animal Science. 16(4), 666–672. https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1321473

Kaim, M., Rosenberg, M. & Folman, Y. (1990). Management of reproduction in dairy heifers based on the synchronization of estrous cycles. Theriogenelogy. 34, 3. https://www.sciencedirect.com/journal/theriogenology

Kakar, S. S., Rahe, C. H. & Neill, J. D. (1993). Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GNRH). Domestic Animal Endocrinology. 10(4), 335–342. https://doi.org/10.1016/0739-7240(93)90037-C

Karakaya-Bilen, E., Yilmazbas-Mecitoglu, G., Keskin, A., Guner, B., Serim, E., Santos, J. E. P. & Gümen, A. (2019). Fertility of lactating dairy cows inseminated with sex-sorted or conventional semen after Ovsynch, Presynch–Ovsynch and Double-Ovsynch protocols. Reproduction in Domestic Animals. 54(2), 309–316. https://doi.org/10.1111/rda.13363

Karakaya, E., Keskin, A., Alkan, A., Tasdemir, U., Santos, J. E. P. & Gumen, A. (2014). Fertility in Dairy Cows After Artificial Insemination Using Sex-Sorted Sperm or

Conventional Semen. Reproduction in Domestic Animals. 49, 333–337. https://doi.org/10.1111/rda.12280

Keskin, A., Yilmazbas-Mecitoglu, G., Gumen, A., Karakaya, E., Darici, R., & Okut, H. (2010). Effect of hCG vs. GnRH at the beginning of the Ovsynch on first ovulation and conception rates in cyclic lactating dairy cows. Theriogenology. 74(4), 602–607. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.009

Keskin, A., Yilmazbas-Mecitoglu, G., Bilen, E., Guner, B., Orman, A., Okut, H., & Gumen, A. (2016). The effect of ovulatory follicle size at the time of insemination on pregnancy rate in lactating dairy cows. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 40, 68-74. https://doi:10.3906/vet-1506-59

Klinc, P. & Rath, D. (2006). Application of flowcytometrically sexed spermatozoa in different farm animal species: A review. Archives Animal Breeding. 49(1), 41–54. https://doi.org/10.5194/aab-49-41-2006

Kurykin, J., Jaakma, Ü., Jalakas, M., Aidnik, M., Waldmann, A., & Majas, L. (2007). Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. Theriogenology. 67(4), 754–759. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.006

Kurykin, J., Jalakas, M., Kaart, T., & Jaakma, Ü. (2017). Efficiency of insemination with sexed semen at spontaneous estrus and synchronization of ovulation in lactating holstein cows. Veterinarija Ir Zootechnika. 75(97), 30–35.

Kyle, S. D., Callahan, C. J., & Allrich, R. D. (1992). Effect of Progesterone on the Expression of Estrus at the First Postpartum Ovulation in Dairy Cattle. Journal of Dairy Science. 75(6), 1456–1460. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77901-6

Lauber, M. R., McMullen, B., Parrish, J. J., & Fricke, P. M. (2020). Short communication: Effect of timing of induction of ovulation relative to timed artificial insemination using sexed semen on pregnancy outcomes in primiparous Holstein cows. Journal of Dairy Science. 103(11), 10856–10861. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18836

Leroy, J. L. M. R., Opsomer, G., De Vliegher, S., Vanholder, T., Goossens, L., Geldhof, A., Bols, P. E. J., De Kruif, A., & Van Soom, A. (2005). Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. Theriogenology. 64(9), 2022–2036. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.003

Leroy, J. L. M. R., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I. G. F., & Bols, P. E. J. (2008). Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows.

Reproduction in Domestic Animals, 43(5), 612–622. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00960.x

Loggan, B. (2019). Evaluating the Success of Female Selected Sex-Sorted Semen at Western Kentucky University's Dairy Farm. Master theses, 3019. https://digitalcommons.wku.edu/theses/3109

Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. Theriogenology. 76(9), 1594–1601. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.012

Lopez, H., Satter, L. D., & Wiltbank, M. C. (2004). Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. Animal Reproduction Science. 81(3–4), 209–223. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.10.009

Lucy, M. C., McDougall, S., & Nation, D. P. (2004). The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. Animal Reproduction Science. 82–83, 495–512. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.004

Macedo, G., Sa Filho, M. F., Sala, R. V, Mendanha, M. F., Filho, E. V. de C., & Baruselli, P. S. (2013). The Use Of Sex-Sorted Sperm For Reproductive Programs In cattle. Success in Artificial Insemination- Quality of Semen and Diagnostics Employed. Chapter 3, 1–23. https://doi.org/10.5772/52180

MacMillan, K. L., Washburn, S. P., Henderson, H. V, & Petch, S. F. (1990). Effects of varying the progesterone content of CIDR intravaginal devices and multiple CIDR treatments on plasma hormone concentrations and residual hormone content. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 50, 473–475. https://www.nzsap.org/

Mallory, D. A., Lock, S. L., Woods, D. C., Poock, S. E., & Patterson, D. J. (2013). Hot topic: Comparison of sex-sorted and conventional semen within a fixed-time artificial insemination protocol designed for dairy heifers. Journal of Dairy Science. 96(2), 854–856. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5850

Maxwell, W. M. C., Evans, G., Hollinshead, F. K., Bathgate, R., de Graaf, S. P., Eriksson, B. M. Brien, J. K. O. (2004). Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. Animal Reproduction Science. 83, 79–95. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.013

Melendez, P., Bartolome, J., Archbald, L. F., & Donovan, A. (2003). The association between lameness, ovarian cysts and fertility in lactating dairy cows. Theriogenology. 59(3–4), 927–937. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01152-4

Mellado, M., Sepulveda, E., Macias-Cruz, U., Avendaño, L., Garcia, J. E., Veliz, F. G., & Rodríguez, A. (2014). Effects of month of breeding on reproductive efficiency of Holstein cows and heifers inseminated with sex-sorted or conventional semen in a hot environment. Tropical Animal Health and Production. 46(1), 265–269. https://doi.org/10.1007/s11250-013-0470-8

Miller, R. H., Norman, H. D., Kuhn, M. T., Clay, J. S., & Hutchison, J. L. (2007). Voluntary waiting period and adoption of synchronized breeding in dairy herd improvement herds. Journal of Dairy Science. 90(3), 1594–1606. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71645-4

Moce, E. Graham, J.K. & Schenk, J.L. (2006) Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. Theriogenology. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.063

Moreira, F., & Funston, R. N. (2012). Evaluating conventional and sexed semen in a commercial beef heifer development program. Professional Animal Scientist. 28(5), 560–563. https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30405-8

Moreira, F., Orlandi, C., Risco, C. A., Mattos, R., Lopes, F., & Thatcher, W. W. (2001). Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 84(7), 1646–1659. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74600-0

Noonan, E. J., Kelly, J. C., & Beggs, D. S. (2016). Factors associated with fertility of nulliparous dairy heifers following a 10-day fixed-time artificial insemination program with sex-sorted and conventional semen. Australian Veterinary Journal. 94(5), 145–148. https://doi.org/10.1111/avj.12430

Norman, H. D., Hutchison, J. L., & Miller, R. H. (2010). 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(8), 3880–3890. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2781

Okuda, K., Miyamoto, Y., & Skarzynski, D. J. (2002). Regulation of endometrial prostaglandin F2α synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. Domestic Animal Endocrinology. 23(1–2), 255–264. https://doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00161-3

Pahl, C., Hartung, E., Mahlkow-Nerge, K., & Haeussermann, A. (2015). Feeding characteristics and rumination time of dairy cows around estrus. Journal of Dairy Science. 98(1), 148–154. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8025

Patton, J., Kenny, D. A., McNamara, S., Mee, J. F., O'Mara, F. P., Diskin, M. G., & Murphy, J. J. (2007). Relationships among milk production, energy balance, plasma

analytes, and reproduction in holstein-friesian cows. Journal of Dairy Science. 90(2), 649–658. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71547-3

Peter, A.T., Vos, P.L.A.M., & Ambrose, D.J. (2009). Postpartum anestrus in dairy cattle. Theriogenology, 71, 1333-1342. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.012

Pursley, J. R., Mee, M. O., & Wiltbank, M. C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH. Theriogenology. 44(7), 915–923. https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00279-H

Pursley, J. R., Wiltbank, M. C., Stevenson, J. S., Ottobre, J. S., Garverick, H. A., & Anderson, L. L. (1997). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. Journal of Dairy Science. 80(2), 295–300. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)75937-X

Rankin, T. A., Smith, W. R., Shanks, R. D., & Lodge, J. R. (1992). Timing of insemination in dairy heifers. Journal of Dairy Science. 75(10), 2840–2845. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78047-3

Reith, S., Brandt, H., & Hoy, S. (2014). Simultaneous analysis of activity and rumination time, based on collar-mounted sensor technology, of dairy cows over the peri-estrus period. Livestock Science. 170, 219–227. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.10.013

Rhodes, F. M., McDougall, S., Burke, C. R., Verkerk, G. A., & Macmillan, K. L. (2003). Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. Journal of Dairy Science. 86(6), 1876–1894. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73775-8

Ribeiro, E. S., Cerri, R. L. A., Bisinotto, R. S., Lima, F. S., Silvestre, F. T., Greco, L. F., Thatcher, W. W., & Santos, J. E. P. (2011). Reproductive performance of grazing dairy cows following presynchronization and resynchronization protocols. Journal of Dairy Science. 94(10), 4984–4996. https://doi.org/10.3168/jds.2011-4225

Roche, J. F. (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. Animal Reproduction Science. 96(3–4), 282–296. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.007

Roche, J. F. (1996). Control and regulation of folliculogenesis- A symposium in perspective. Reviews of Reproduction. 1(1), 19–27. https://doi.org/10.1530/ror.0.0010019

Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J. & Berry, D. P. (2009). Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and

welfare. Journal of Dairy Science. 92(12), 5769–5801. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2431

Roelofs, J. B., Van Eerdenburg, F. J. C. M., Hazeleger, W., Soede, N. M. & Kemp, B. (2006). Relationship between progesterone concentrations in milk and blood and time of ovulation in dairy cattle. Animal Reproduction Science. 91(3–4), 337–343. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.015

Roelofs, J. B., & Van Erp-van der Kooij, E. (2015). Estrus detection tools and their applicability in cattle: recent and perspectival situation. Animal. Reproduction Science. 12(3), 498–504.

Roelofs, J., López-Gatius, F., Hunter, R. H. F., van Eerdenburg, F. J. C. M. & Hanzen, C. (2010). When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. Theriogenology, 74(3), 327–344. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.016

Rorie, R. W., Bilby, T. R. & Lester, T. D. (2002). Reproductive Management of Cattle. Theriogenology. 57(01), 137–148. https://www.sciencedirect.com/journal/theriogenology

Ruegg, PL., & Milton, RL. (1995). Body condition scores of Holstein cows on rince Edward Island Canada: relationships with yield, reproductive performance and disease. Journal of Dairy Science. 78, 552-564. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76666-8

Sá Filho, M. F., Ayres, H., Ferreira, R. M., Nichi, M., Fosado, M., Campos Filho, E. P. & Baruselli, P. S. (2010). Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. Theriogenology. 74(9), 1636–1642. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.036

Sá Filho, M. F., Crespilho, A. M., Santos, J. E. P., Perry, G. A. & Baruselli, P. S. (2010). Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled Bos indicus cows. Animal Reproduction Science. 120(1–4), 23–30. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.007

Sá Filho, M. F., Girotto, R., Abe, E. K., Penteado, L., Campos Filho, E. P., Moreno, J. F., Sala, R. V., Nichi, M. & Baruselli, P. S. (2012). Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. Journal of Animal Science. 90(6), 1816–1823. https://doi.org/10.2527/jas.2011-4523

Sá Filho, M. F., Mendanha, M. F., Sala, R. V., Carvalho, F. J., Guimarães, L. H. C. & Baruselli, P. S. (2013). Use of sex-sorted sperm in lactating dairy cows upon estrus detection or following timed artificial insemination. Animal Reproduction Science. 143(1–4), 19–23. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.014

Saacke, R. G. (2008). Insemination factors related to timed AI in cattle. Theriogenology. 70(3), 479–484. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.015
Saacke, R. G., Dalton, J. C., Nadir, S., Nebel, R. L. & Bame, J. H. (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. Animal Reproduction Science. 60–61, 663–677. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00137-8

Sales, J. N. S., Neves, K. A. L., Souza, A. H., Crepaldi, G. A., Sala, R. V. & Fosado, M. (2011). Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. Theriogenology. 76, 427–435. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.019

Santos, J. E., Cerri, R. L., Ballou, M. A., Higginbotham, G. E. & Kirk, J. H. (2004). Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. Animal Reproduction Science. 80(1–2), 31–45. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00133-7

Santos, J. E. P., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L. A. & Galvão, K. N. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. Animal Reproduction Science. 82–83, 513–535. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.015

Sartori, R., Bastos, M. R. & Wiltbank, M. C. (2010). Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. Reproduction, Fertility and Development. 22(1), 151–158. https://doi.org/10.1071/RD09221

Savio, J. D., Thatcher, W. W., Badinga, L., De la Sota, R. L., & Wolfenson, D. (1993). Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. Journal of Reproduction and Fertility. 97(1), 197–203. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0970197

Schally, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R. M. G., Matsuo, H., Redding, T. W., Debeljuk, L. & White, W. F. (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. Biochemical and Biophysical Research Communications. 43(2), 393–399. https://doi.org/10.1016/0006-291X(71)90766-2

Schenk, J. L., Cran, D. G., Everett, R. W. & Seidel, G. E. (2009). 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(5), 717–728. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.016

Seidel, G. E. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. Animal. 8, 160–164. https://doi.org/10.1017/S1751731114000202

Seidel, G. E. (2007). Overview of sexing sperm. Theriogenology. 68(3), 443–446. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.005

Seidel, G. E. (2003). Sexing mammalian sperm - Intertwining of commerce, technology, and biology. Animal Reproduction Science. 79(3–4), 145–156. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00162-3

Seidel, G. E., & Garner, D. L. (2002). Current status of sexing mammalian spermatozoa. Reproduction. 124(6), 733–743. https://doi.org/10.1530/reprod/124.6.733

Seidel, G. E., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D. & Cran, D. G. (1999). İnsemination of heifers with sexed sperm. Theriogenology, 52, 1407–1420. https://www.sciencedirect.com/journal/theriogenology

Senger, P. L. (1994). The Estrus Detection Problem: New Concepts, Technologies, and Possibilities. Journal of Dairy Science. 77(9), 2745–2753. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77217-9

Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G. & Schuberth, H. J. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. Biology of Reproduction. 81(6), 1025–1032. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370

Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. & Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology. 65(8), 1516–1530. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021

Silvia, W. J., Lewis, G. S., McCracken, J. A., Thatcher, W. W. & Wilson, L. (1991). Review: Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F(2α) during luteolysis in ruminants. Biology of Reproduction. 45(5), 655–663. https://doi.org/10.1095/biolreprod45.5.655

Sirois, J. & Fortune, J. E. (1990). Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. Endocrinology. 127(2), 916–925. https://doi.org/10.1210/endo-127-2-916

Skenandore, C. S. & Cardoso, F. C. (2017). The effect of tail paint formulation and heifer behavior on estrus detection. International Journal of Veterinary Science and Medicine. 5(2), 113–120. https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.08.001

Smith, M. F., McIntush, E. W. & Smith, G. W. (1994). Mechanisms associated with corpus luteum development. Journal of Animal Science. 72(7), 1857–1872. https://doi.org/10.2527/1994.7271857x

Snijders, S. E. M., Dillon, P., O'Callaghan, D. & Boland, M. P. (2000). Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in

dairy cows. Theriogenology. 53(4), 981–989. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00244-2

Sordillo, L. M. & Aitken, S. L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology. 128(1–3), 104–109. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.305

Soriani, N., Trevisi, E. & Calamari, L. (2012). Relationships between rumination time, metabolic conditions, and health status in dairy cows during the transition period. Journal of Animal Science. 90(12), 4544–4554. https://doi.org/10.2527/jas.2011-5064

Souza, A. H., Ayres, H., Ferreira, R. M., & Wiltbank, M. C. (2008). A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. Theriogenology. 70(2), 208–215. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.03.014

Spencer, T. E., Sandra, O. & Wolf, E. (2008). Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: Insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. Reproduction. 135(2), 165–179. https://doi.org/10.1530/REP-07-0327

Stangaferro, M. L., Wijma, R. W. & Giordano, J. O. (2019). Profitability of dairy cows submitted to the first service with the Presynch-Ovsynch or Double-Ovsynch protocol and different duration of the voluntary waiting period. Journal of Dairy Science. 102(5), 4546–4562. https://doi.org/10.3168/jds.2018-15567

Stevenson, J. S. (2016). Synchronization and Artificial Insemination Strategies in Dairy Herds. Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice. 32(2), 349–364. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.007

Stevenson, J. S. (2001). A review of oestrous behaviour and detection in dairy cows. British Society of Animal Science. 26(1), 43–62. https://doi.org/10.1017/s0263967x00033589

Stevenson, J. S. & Pulley, S. L. (2012). Pregnancy per artificial insemination after presynchronizing estrous cycles with the Presynch-10 protocol or prostaglandin F2α injection followed by gonadotropin-releasing hormone before Ovsynch-56 in 4 dairy herds of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 95(11), 6513–6522. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5707

Stevenson, J. S., Tenhouse, D. E., Krisher, R. L., Lamb, G. C., Larson, J. E., Dahlen, C., Garverick, H. A. (2008). Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. Journal of Dairy Science. 91(7), 2901–2915. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0856

Suh, T. K., Schenk, J. L. & Seidel, G. E. (2005). High pressure flow cytometric sorting damages sperm. Theriogenology. 64(5), 1035–1048. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.002

Sunderland, S. J., Crowe, M. A., Boland, M. P., Roche, J. F. & Ireland, J. J. (1994). Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. Journal of Reproduction and Fertility. 101(3), 547–555. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010547

Thomas, J. M., Locke, J. W. C., Vishwanath, R., Hall, J. B., Ellersieck, M. R., Smith, M. F. & Patterson, D. J. (2017). Effective use of SexedULTRA4M sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. Theriogenology. 98, 88–93. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.018

Thomas, J. M., Smith, M. F., Patterson, D. J., Poock, S. E. & Ellersieck, M. R. (2014). Delayed insemination of non-estrous heifers and cows when using conventional semen in timed artificial insemination. Journal of Animal Science. 92(9), 4189–4197. https://doi.org/10.2527/jas.2014-7827

Valenza, A., Giordano, J. O., Lopes, G., Vincenti, L., Amundson, M. C. & Fricke, P. M. (2012). Assessment of an accelerometer system for detection of estrus and treatment with gonadotropin-releasing hormone at the time of insemination in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 95(12), 7115–7127. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5639

Vasconcelos, J. L., Silcox, R. W., Rosa, G. J., Pursley, J. R. & Wiltbank, M. C. (1999). Theriogenology. 52 (1067–1078). https://www.sciencedirect.com/journal/theriogenology

Vishwanath, R. & Moreno, J. F. (2018). Review: Semen sexing - Current state of the art with emphasis on bovine species. Animal. 12(s1), s85–s96. https://doi.org/10.1017/S1751731118000496

Walsh, R.B.J.S., Walton, J.S., Kelton, D.F., Leblanc, S.J., Leslie, K.E., & Duffield, T.F. (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. Journal of Dairy Science, 90, 2788- 2796. https://doi.org/10.3168/jds.2006-560

Walsh, S. W., Williams, E. J. & Evans, A. C. O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. Animal Reproduction Science. 123(3–4), 127–138. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.12.001

Webb, R., Garnsworthy, P. C., Gong, J.-G. & Armstrong, D. G. (2004). Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. Journal of Animal Science. 82(63–74), 2299–2302. https://doi.org/10.2527/2004.8213

Weigel, K. A. (2004). Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. Journal of Dairy Science. 87, 120–130. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70067-3

Whittier, W. D. (1989). Prostaglandin $F_2\alpha$ usage in a dairy reproduction program for treatment of unobserved estrus, pyometra and ovarian luteal cysts. Theriogenology. 32(4), 693–704. https://www.sciencedirect.com/journal/theriogenology

Wiltbank, M. C. & Pursley, J. R. (2014). The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. Theriogenology. 81(1), 170–185. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.017

Xu, Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A., & Youngquist, R. S. (1995). Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. Biology of Reproduction. 53(4), 951–957. https://doi.org/10.1095/biolreprod53.4.951

Xu, Z. (2014). Application of liquid semen technology improves conception rate of sex-sorted semen in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 97(11), 7298–7304. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8507

Yilmazbas-Mecitoglu, G., Karakaya, E., Keskin, A., Alkan, A., Okut, H., & Gümen, A. (2012). Effects of presynchronization with gonadotropin-releasing hormone-prostaglandin F2α or progesterone before Ovsynch in noncyclic dairy cows. Journal of Dairy Science. 95(12), 7186–7194. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5920

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

CBS	Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma
FSH	Foliküler Stimule Edici Hormon
GnRH	Gonodatropin Salınım Hormonu
IFN-τ	İnterferon Tau
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
LH	Luteinleştirici Hormon
PGF	Prostaglandin
PGF2α	Prostaglandin F2α
PP	Post partum
SGS	Sağılan Gün Sayısı
ST	Suni Tohumlama
USM	Ultrasonografik Muayene
VKS	Vücut Kondisyon Skoru

8.EKLER

Ek-1. Bireysel inek kayıt formu

İnek No:							
Grup		**Sperma**		**Tek.**		**Toh. Saati Grup**	
Tarih	**Muayene**	**Sol Ovaryum**			**Sağ Ovaryum**		**NOT**
	İlk PGF Zamanı CL Kontrol						
	Ovsynch Başlangıcı Ovaryum Muayenesi						
	Ovsynch PGF Zamanı CL Kontrol						
	ST Anında Folikul Çapı						
	Ovulasyon Kontrolü						
	1. Gebelik Muayenesi				**2. Gebelik Muayenesi**		
VKS		**SÜT**					

Ek-2. Siklik durum kayıt formu

	İnek No	CL VAR/YOK	Not			İnek No	CL VAR/YOK	Not
1					26			
2					27			
3					28			
4					29			
5					30			
6					31			
7					32			
8					33			
9					34			
10					35			
11					36			
12					37			
13					38			
14					39			
15					40			
16					41			
17					42			
18					43			
19					44			
20					45			
21					46			
22					47			
23					48			
24					49			
25					50			

Ek-3. Tohumlama ve folikül çapı kayıt formu

Tarih:

Tohumlama ve Folikül Çapı Kayıt Formu

	İnek No	Sol Ovaryum	Sağ Ovaryum	Teknisyen	Sperma Tipi	Tohumlama Saati
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						

Ek-4. Etik kurul raporu

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı: 2019/2-5 **28/02/2019**
Konu: Etik Kurulu Kararı

Sayın: Doç. Dr. Gülnaz MECİTOĞLU
Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D.

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun, başvurunuzla ilgili 28/02/2019 tarih ve 2019/2-5 sayılı kararı ekte sunulmaktadır.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Elif AKSÖZ
Başkan

EKLER:
Ek – 1 : Karar Örneği (1 sayfa)
Ek – 2 : Başvuru Onay Formu (2 sayfa)

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Toplantı Yeri: Deney Hayvanları Üretim Bakım Uygulama ve Araştırma Merkezi Toplantı Salonu
Toplantı Tarihi: 28 Şubat 2019
Toplantı Saati: 14:00
Toplantı Sayısı: 2019/2

Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 28 Şubat 2019 tarihinde Başkan Dr. Öğr. Üyesi Elif AKSÖZ Başkanlığında toplandı.

KARAR :5

Doç. Dr. Gülnaz MECİTOĞLU'nun "*Sütçü İneklerde Zaman Ayarlı Tohumlama Protokolü Başarısını Artırmaya Yönelik Uygulamalar ve Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ile Kullanımlarının Değerlendirilmesi* " başlıklı projesinin görüşülmesine geçildi.

Görüşme Sonunda; proje dosyasının etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ÜYELERİ
(İMZA)

Dr. Öğr. Üyesi Elif AKSÖZ
BAŞKAN

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Çağış Yerleşkesi, (Bigadiç yolu üzeri 17. km) 10145, BALIKESİR-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*"Sütçü İneklerde Zaman Ayarlı Tohumlama Protokolü Başarısını Artırmaya Yönelik Uygulamalar ve Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ile Kullanımlarının Değerlendirilmesi"*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Gülnaz MECİTOĞLU Bursa Uludağ Üni. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji AD.
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Prof. Dr. Ahmet GÜMEN BUÜ Veteriner Fak. Doğum ve Jinekoloji AD. Prof. Dr. Abdülkadir KESKİN BUÜ Veteriner Fak. Doğum ve Jinekoloji AD. Dr. Araş. Gör. Barış GÜNER BAÜN Veteriner Fak. Doğum ve Jinekoloji AD. Doktora Öğrencisi Vet. Hek. Enes SERİM BUÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Öğrencisi Vet. Hek. Nisa DEMİRCAN BUÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Doktora
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	15/09/2019 – 15/09/2022
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	Sığır - 1200 Adet

	Belge Adı	Tarihi
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	HADYEK BAŞVURU FORMU	**21.02.2019**

KARAR BİLGİLERİ

Karar No : 2019/2-5 **Tarih : 28.02.2019**

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırıcıya iletilmesine oy birliği ile karar verildi.

1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması,
2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması,
3) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması,
4) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Elif AKSÖZ Başkan	Tıbbi-Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H	
Doç. Dr. Gülten ERKEN Başkan Yardımcısı	Tıbbi- Fizyoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H	
Prof. Dr. Ziya İLHAN Üye	Veteriner - Mikrobiyoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H	
Doç. Dr. Hatice YILDIRIM Üye	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ■ H	
Dr. Öğr. Üyesi Fatih UGÜN Üye	Tıp-Anesteziyoloji ve Reamnimasyon	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H	
Dr. Öğr. Üyesi Muharrem EROL Üye	Veteriner Cerrahi	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H	
Hacer ERDEN Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ev Hanımı	☐ E ■ H	
Mehmet UÇAR Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ■ H	
Vet. Hek. Mustafa H. YARANOĞLU Üye	Veteriner Hekim	BAUNDEHAM	☐ E ■ H	

(*) Başvuruları Projelerde Proje Sahibi veya Yardımcı Araştırmacılardan birinin Yerel Etik Kurul Üyesi veya 1. Derece Akrabası olması halinde ilgili üye proje kurul görüşmesine katılamaz.

9. TEŞEKKÜR

Doktora hayatım boyunca iyi bir eğitim almamı sağlayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülnaz YILMAZBAŞ-MECİTOĞLU'na, gerek doktora hayatıma gerek özel hayatıma yön vermemi sağlayan ve her zaman manevi desteklerini hissettiğim Sayın Prof. Dr. Ahmet GÜMEN ve Sayın Prof. Dr. Abdülkadir KESKİN'e, her zaman destek olan arkadaşım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Barış GÜNER'e, tezimin bulgularının istatistiki değerlendirmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Serdal DİKMEN'e ve bu günlere gelmemi sağlayan aileme çok teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

2007-2013 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde eğitim görmüştür. 2016 yılında aynı fakültenin Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başlamıştır. Uludağ Üniversitesi'nde 2016-2018 yılları arasında Araştırma Görevlisi olarak çalışmıştır. 2018 yılından itibaren özel sektörde çalışmaktadır.