

İNEKLERDE FÖTAL SIVILARDAKİ TESTOSTERON HORMONU DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI İLE CİNSİYET TAYİNİ

Erol ALAÇAM¹,

Tevfik TEKELİ¹,
Semin ÖZSAR²,

Bülent GÜVEN²,
Mehmet GÜLER¹

D. Ali DİNÇ¹

Prenatal Diagnosis of Sex in Cattle by Determination of Testosterone Concentration in Fetal Fluids

Summary : In this study, testosterone levels in fetal fluids was measured in cows during the first trimester of pregnancy period for the differentiation of fetal sex. For this purpose, total 30 pregnant uteruses were grouped in Konya Slaughterhouse, which are less than 60 days, between 60-90 and 90-120 days, including 10 cows each group.

Fetal fluid samples were collected in aseptic manners, quantity of 20 ml each, from amniotic and allantoic sacs. After this fetal sex was recorded.

Samples was santrifuged at 1500 g for 10 minutes and the supernatant was decanted into polyethylene assay tubes. Testosterone hormone levels measured by Radioimmunoassay (RIA) in Lalahan Animal Health Nuclear Research Center.

According to the results, allantoic hormone levels were favorable for the differentiation of the fetal sex. In addition this, the hormone values obtained from all groups were appropriate for diagnosing of the sex.

As a result, testosterone hormone assay is a choice of practical method additionally to the cytological and biochemical methods for the application on fetal fluids to the differentiation of fetal sex.

Özet : Bu çalışmada, gebeliğin ilk üçte birinde bulunan inek fötüslerinin cinsiyetini belirlemek üzere fötal sıvılardaki testosteron hormonu düzeyleri araştırıldı.

Bu amaçla, Et ve Balık Kurumu Konya Et Kombinası'ndan, postmortem olarak; 60 günden küçük, 60-90 günler ve 90-120 günlerde olmak üzere onar adet gebe uterus seçildi. Her uterusun allantois ve amnion keselerinden, aseptik şartlarda, sıvı örnekleri 20'şer ml miktarında aspire edildi. Bu arada uteruslar tamamen açılarak fötüsün cinsiyeti belirlendi. Toplanan fötal sıvı örnekleri 1500 devir/dk santrifüje edildi ve üstte kalan sıvı assay tüplerine nakledilerek, hormon analizlerine kadar -20 °C'de saklandı. Testosteron hormonu düzeyleri Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü'nde 3H-radioimmunoassay (RIA) yöntemi ile tayin edildi.

Çalışma bulgularına göre, allantois sıvılarından testosteron hormonu düzeyleri cinsiyet ayırımı yönünden fikir verirken amnion sıvısı değerleri tanıya yeterli derecede yardımcı olamadı. Diğer taraftan her üç dönemde de allantois sıvısı hormon düzeylerinin tanı için uygun olduğu görüldü.

Sonuç olarak, amniosentez yoluyla elde edilen fötal sıvılara uygulanabilecek sitolojik ve biyokimyasal yöntemlerin yanısıra daha pratik bir yöntem olan

RIA ile testosteron hormonu düzeylerinin tayininin de uygun bir yöntem olduğu kanısına varıldı.

Giriş

Evcil hayvanlarda gebeliğin erken tanısının yanısıra fötüsün cinsiyetinin önceden bilinmesi de giderek ilgi çekici olmaktadır.

Fötüsün cinsiyetinin önceden tayini veya yönlendirilmesi, fekondasyondan önce spermatozoa üzerinde, daha ileri aşamada da embrio üzerinde yapılan çalışmalarla mümkün olabilmektedir (8, 12, 20, 23). Ayrıca gebelik sırasında amniosentez ile elde edilen fötal sıvılara çeşitli yöntemler uygulanarak da fötüsün cinsiyeti, farklı başarı oranlarında belirlenebilmektedir (2, 3, 16).

Fötal cinsiyeti yönlendirmek üzere, X ve Y kromozomu taşıyan spermatozoonlar ayrılarak arzulanan cinsiyette fötüs için uygun spermatozoon kullanılması yönünde birçok yöntem önerilmektedir (17). Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda; santrifugasyon, sedimentasyon elektroforezis, selektif imha, basınç değişikliği, Ph değişikliği, vb. yöntemler ile, düşük oranda da olsa bazı sonuçlar alınabilmekte birlikte, evcil hayvanlar üzerindeki çalışma ve uygulamalar henüz yetersiz kalmaktadır (5, 17, 19).

Embrio nakli sırasında, emrio'nun zona pellucida'sı mikromanuplasyon ile kesilerek birkaç hücresi aspire edilmekte ve metafazdaki hücrelerin kromozom analizleri yapılarak sex kromozomlarına göre cinsiyet tesbiti yapılabilmektedir (15, 21, 23). Bearden ve Fuguay (5), bu yolla doğru tanı oranını % 33-63 arasında bildirmişlerdir. Alternatif bir yöntem olarak, erkek memeli hücrelerindeki HY antijeninin varlığı araştırılmaktadır. Sadece erkek fötüste mevcut Y kromozomu HY antijeni olarak bilinen bir protein oluşturur. Bu antijenin varlığı immunolojik yöntemlerle araştırılmaktadır (2, 11, 19, 21). White ve ark. (24), floresanlanmış HY antikoru ile birleşen erkek embrioların belirlenmesine dayanan bir test yardımı ile fare embriolarında % 80 doğrulukla cinsiyet tayini yapabildiklerini ve bu yöntemin büyükbaş evcil hayvanlara da uygulanabileceğini bildirmişlerdir.

Fötüsün cinsiyetini tayin etmek üzere amniosentez ile elde edilen fötal sıvılara biyokimyasal (3), sitolojik (16, 22) ve endokrinolojik (9) yöntemler uygulanabilmektedir.

Amniosentez, vaginal yolla (4) veya ağız çukurluğundan uygulanan özel iğnelerle (10) ya da ağız çukurluğundan yapılan laparotomi ile (16) uterusu ulaşılarak, 20-25 ml miktarındaki fötal sıvının aspire edilmesi şeklinde yapılmaktadır. Amniosentez için gebeliğin ilk 1/3'ünün daha uygun olduğunu bildirilmektedir (7, 22). Basrur ve Bongso (4), ineklerde gebeliğin 80-120. günleri arasında amnion sıvısında 12.000 - 31.000/ ml hücre bu-

1. S. Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya.

2. Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Merkezi, Ankara.

lunduğu ve bunlardan 11.000 - 21.000/ ml'sinin canlı hücreler olduğunu bildirmekte ve kromozom analizi için kültüre elverişli olduklarını eklemektedirler. Amnion hücrelerinin kültüre edilmesi ile metafaz dönemindeki kromozomlardan dişi ve erkek fötüsler ayırt edilebilmektedir (22).

Fötal sıvılardaki testosteron hormonu düzeylerinin immunolojik assay yöntemleri ile ölçülmesi, cinsiyet tayininde diğer bir yöntem olarak bildirilmektedir (9, 13). Embryo'nun indifferent döneminde primitif Wolffman ve Müller kanalları mevcuttur. Normal şartlarda cinsel farklılaşma başladığında, sex kromozomlarına bağlı olarak bu kanallardan bir tanesi gelişir diğeri ise rudimenter kalır. Y kromozomu bulunduğu Wolffman kanalı gelişirken, erken fötal dönemde testislerden salgılanan androjenler fötal sıvılarda tespit edilebilir düzeylerde bulunurlar (13). Basrur ve Bongso (4), ineklerde gebeliğin 100. gününde fötal sıvılardaki testosteron hormonu düzeylerinin araştırılması ile fötüsün cinsiyetinin yüksek bir doğrulukla tanınabileceğini bildirmektedirler.

Sunulan çalışmanın amacı, gebeliğin ilk 1/3'ünde bulunan ve değişik günlerde gruplandırılan ineklerden postmortem olarak toplanan fötal sıvı örneklerinde testosteron hormonu düzeylerini radioimmunoassay (RIA) yöntemi ile ölçerek fötüsün cinsiyetini belirleme şanslarını araştırmaktır.

Materyal ve Metot

Materyal :

Bu çalışma Et ve Balık Kurumu, Konya Et Kombinasyonunda, postmortem olarak seçilen gebe inek uterusları üzerinde yapıldı. Materyal 60 günden küçük, 60-90 günler ve 90-120 günler olmak üzere üç farklı gebelik döneminde gruplandırıldı ve her grupta onar adet hayvan değerlendirildi.

Metot :

Örnek alınacak uterusların duvarı bir makas yardımı ile aseptik koşullarda açıldı ve önce allantois daha sonra da amnion keselerinden ayrı ayrı sıvı örnekleri, steril enjektörlerle, 20'şer ml miktarında aspire edildi.

Daha sonra yavru keseleri açılarak fötüsün cinsiyeti kayıt edildi ve gebelik süresini belirlemek üzere başsağı uzunluğu bir cetvel yardımı ile ölçüldü. Buna göre gebelikler; 6 cm'den kısa: 60 günden küçük, 6.5-14.5 cm: 60-90 gün, 15-28 cm : 90-120 günler olarak değerlendirildi (18).

Toplanan sıvı örnekleri 1500 devir/dk'da, 10 dakika santrifüje edildi ve üstte kalan sıvı plastik assay tüplerine aktararak topluca değerlendirilmek üzere, derin dondurucuda -20 °C derecede saklandı.

Testosteron hormonu analizleri, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü'nde yapıldı. Örnekler ODS C 18 silicagel mini kolonlarından geçirilerek saflaştırıldı. Testosteron hormonu düzeyleri 3H radioimmunoassay (RIA) yöntemi ile ölçüldü (23).

RIA ile belirlenen değerler gebeliğin dönemine, allantois ve amnion sıvılarına ve fötüsün cinsiyetine göre karşılaştırmalı olarak değerlendirildiler.

Bulgular

Çalışma bulguları, erkek ve dişi fötüslere bağlı olarak, gebeliğin üç ayrı dönemindeki amnion ve allantois sıvılarında belirlenen testosteron hormonu düzeylerine göre tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo : 1. Allantois ve amnion sıvılarındaki testosteron düzeyleri (pg/ml)

FÖTÜSÜN CINSİYETİ	FÖTAL SIVI ÖRNEĞİ	GEBELİK DÖNEMLERİ		
		60 gün	60-90 günler	90-120 günler
Erkek	Allantois	67.19 ± 15.66	95.34 ± 16.26	84.50 ± 15.38
	Amnion	42.53 ± 11.79	43.28 ± 14.76	29.32 ± 8.20
Dişi	Allantois	22.40 ± 9.61	44.47 ± 5.60	58.08 ± 4.31
	Amnion	43.22 ± 24.13	57.00 ± 36.96	20.16 ± 6.06

Tartışma ve Sonuç

Beşeri ve Veteriner Hekimlik sahalarında, intrauterin yaşamını sürdüren memeli fötüslerinin cinsiyetini belirlemek üzere yapılan çalışmalar giderek daha ilgi çekici hale gelmektedir. Sunulan çalışmada da, fötal sıvılardaki testosteron hormonu yoğunlukları RIA yöntemi ile ölçülerek cinsiyet ayırımı yönünden başarı şansları araştırılmıştır. Çalışma, canlı hayvanlar üzerinde yapılması planlanan daha kapsamlı bir araştırmanın ön çalışması olarak düşünüldüğünden, kesim sonrasında postmortem olarak ve gebeliğin ilk üçte birinde değişik günlerdeki inek uterusları üzerinde yürütülmüştür. Bu konuda, gebeliğin mümkün olduğunca daha erken dönemlerinde tanı şansları araştırılarak muhtemel aseptik abortusların uyarılması sonucunda ortaya çıkabilecek komplikasyonların minimum düzeyde kalması düşünülmüştür. Bunun yanında dölverimi yönünden zaman kaybının önlenmesi de erken tanının diğer bir avantajı olarak düşünülmektedir. Keza canlı hayvanlar üzerinde yapılacak çalışmalarda, amniosentez için en uygun yol olarak önerilen vaginal yöntem için rektal yolla uterusun pelvis boşluğuna çekilebilmesinin ancak gebeliğin ilk 1/3'ünde mümkün olabileceği de göz önünde tutulmuştur. Basrur ve Bongso (4)'da amniosentez için en pratik yöntemin, gebeliğin 80-120. günlerinde, transvaginal yolla uygulanabileceğini ileri sürmektedirler.

Sunulan çalışma postmortem yürütüldüğünden amnion ve allantois keselerinden aseptik fötal sıvı örnekleri ayrı ayrı alınarak değerlendirilmişlerdir. Ancak canlı hayvanlar üzerindeki uygulamalarda alınan örneklerin kesin ayırt edilmesi çoğu kere mümkün olmamaktadır (10). Yapılan bazı çalışmalarda (4, 9, 13) amnion ve allantois sıvılarındaki testosteron hormonu yoğunluklarının değişik bulunmalarına rağmen bu fark erkek ve dişi fötüsler için değerlendirildiğinde cinsiyet ayırımı yönünden örneğin alındığı kesenin fazla önemi olmadığı ve her iki sıvıdaki hormon yoğunluklarının cinsiyet ayırımında doğru olarak değerlendirilebilecekleri ileri sürülmektedir. Sunulan çalışmada ise her üç dönemde de allantois sıvısındaki testosteron hormonu yoğunlukları cinsiyet ayırımı yönünden bir fikir verirken, amnion sıvısı değerleri tanı için elverişli bulunmadı. Bu nedenle canlı hayvanlardaki ör-

neklemelerin bir endoskopi cihazı ya da ultrason gereci rehberliğinde allantois kesesinden yapılmasının yararlı olacağı kanısına varıldı.

Çalışma sırasında 60 günden küçük, 60-90 günler ve 90-120. günlerdeki gebelikler değerlendirilmiş ve tanı için her üç dönemin de uygun olduğu belirlenmiştir. Ancak Basrur ve Bongso (4)'nün da belirttiği gibi, 90-120. günlerde örneklemenin daha kolay olmasının avantajı göz önünde tutulmalıdır.

Fötal sıvı örnekleri, hormon yoğunlukları yönünden değerlendirilmeden önce, 3 ay süre ile -20 °C derecede saklanmışlar ve analizler sırasında örneklerin ve içerdikleri testosteron hormonunun olumsuz olarak etkilenmediği görülmüştür. RIA çalışmaları sırasında önce ng/ml düzeyinde değerlendirmeler yapılmış ancak elde edilen değerler cinsiyet ayırımı yönünden bir fikir vermediğinden daha sonra pg/ml düzeyindeki ölçümlerle uygun tanı konulabilmiştir.

Sonuç olarak; ineklerde intrauterin fötal cinsiyeti tayin için gebeliğin 90-120. günlerinde amniosentez ile elde edilen fötal sıvılarda komplike sitolojik ve biyokimyasal yöntemlerin yanısıra daha pratik bir yol olan, RIA yöntemi ile testosteron hormonu düzeylerinin tayininin yeterli bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Alabay, B. (1985) Koyunlarda amniosentezle antenatal tanının sitogenetik yöntemi üzerinde çalışmaları. *Doğa, Vet. ve Hay.*, 9, 3, 223-228.
2. Arthur, G. H. (1969) Fetal fluids of domestic animals. *J. Reprod. Fert.*, (Suppl.), 9, 45.
3. Baetz, A. L., Hubbert, W. T. and Braham, C. K. (1976) Changes of biochemical constituents in bovine fetal fluids with gestational age. *Am. J. Vet. Res.*, 37, 1047-1052.
4. Basrur, P. K. and Bongso, A. T. (1985) Amniocentesis for prenatal detection of sex and cytogenetic defects in cattle, "In", D. A. Morrow (Editor) *Current Therapy in Theriogenology*, 1185-1189, W. B. Saunders, London.
5. Bearden, H. J. and Fuguay, J. W. (1984) *Applied Animal Reproduction* Second Ed., Reston Publishing, Comp., Virginia.
6. Beardsley, T. (1983) Embryo sexing cattle now, people next. *Nature*, 301-304.
7. Bongso, T. A. and Basrur, P. K. (1975) Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis. *Vet. Rec.*, 96, 124-127.
8. Bongso, T. A. and Basrur, P. K. (1976) Fetal fluids in cattle. *Can. Vet. J.*, 17, 38-41.
9. Bongso, T. A., Barur, P. K. and Younglai, E. V. (1976) Prediction of fetal sex in cattle by testosterone levels in allantoic fluid. *J. Reprod. Fert.*, 46, 441-442.
10. Eaglesome, M. D. and Mitchell, D. (1977) Collection and cytogenetics of fetal fluids from heifers during the third month of pregnancy. II. Cytogenetic studies. *Theriogenology*, 7,4,203-214.
11. Gordon, J. W. and Ruddle, F. H. (1981) Mammalian gonadal determination and gametogenesis. *Science*, 211, 1265-1271.
12. Hare, W. C. D. and Betteridge, K. J. (1978) Relationship of embryo sexing to other methods of prenatal sex determination in farm animals: A review. *Theriogenology*, 9, 27.
13. Hunter, R. H. F. (1985) *Reproduction in Farm Animals*. English Language Book Society, Essex.
14. International Atomic Energy Agency (1984) *Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction*, Vienna.
15. King, W. A. (1984) Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*, 21, 1, 7-17.
16. Leibo, S. P. and Rall, W. F. (1990) Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis. *Theriogenology*, 33, 2, 531-552.
17. Morrell, J. M., Keeler, K. D., Noakes, D. E., Mackenzie, N. M. and Dresser, D. W. (1988) Sexing of sperm by flow cytometry. *Vet. Rec.*, 122, 322-324.
18. Noakes, D. E. (1986) *Fertility and Obstetrics in Cattle*. Blackwell Pub. Comp., Oxford.
19. Peters, A. R. and Ball, P.J.H. (1987) *Reproduction in Cattle*. Butterworths Pub. Comp., London.
20. Rieger, D. (1984) The measurement of metabolic activity as an approach to evaluating viability and diagnosing sex in early embryos. *Theriogenology*, 21, 1, 138-149.
21. Short, R. V. (1979) Sex determination and differentiation. *British Medical Bull.*, 35,2, 121-127.
22. Singh, E. L. and Hare, W. C. D. (1977) Collection and cytogenetics of fetal fluids from heifers during the third month of pregnancy. II. Cytogenetic studies. *Theriogenology*, 7, 4, 203-214.
23. Singh, E. L. and Hare, W. C. D. (1980) The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. *Theriogenology*, 14, 243.
24. White, K. L., Linder, G. M., Anderson, G. B. and Durant, R. H. (1982) Sex determination on mouse embryos by the detection of fluorescent HY antigens. *Theriogenology*, 18, 655.