



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER FAKÜLTESİ  
DÖLERME VE SUNİ  
TOHURLAMA ANABİLİM  
DALI



MELİH ERTÜRK

DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

**ÇÖZÜNDÜRME SICAKLIKLARININ SWIM-UP VE  
PERCOL GRADİENT SONRASI SPERM PLAZMA  
MEMBRAN FONKSİYONEL BÜTÜNLÜĞÜ VE SPERM  
MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Melih ERTÜRK

(Doktora Tezi)

BURSA-2022

2022



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER FAKÜLTESİ  
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA  
ANABİLİM DALI



**ÇÖZÜNDÜRME SICAKLIKLARININ SWİM-UP VE PERCOL  
GRADİENT SONRASI SPERM PLAZMA MEMBRAN  
FONKSİYONEL BÜTÜNLÜĞÜ VE SPERM MORFOLOJİSİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Melih ERTÜRK**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof. Dr. Hakan Sağırkaya**

**BURSA-2022**

**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum “özündürme Sıcaklıklarının Swim-up ve Percol Gradient Sonrası Sperm Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlüğü ve Sperm Morfolojisi Üzerine Etkileri” 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.

Melih ERTÜRK  
26.01.2022

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

26/01/2022

**Adı Soyadı:** Melih Ertürk

**Anabilim Dalı:** Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı

**Tez Konusu:** Çözündürme Sıcaklıklarının Swim-up ve Percol Gradient Sonrası Sperm Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlüğü ve Sperm Morfolojisi Üzerine Etkileri

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	■	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	■	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	■	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	■	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	■	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	■	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	■	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	■	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	■	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	■	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	■	<input type="checkbox"/>	

### DANIŞMAN ONAYI

**Unvanı Adı Soyadı:** Prof. Dr. Hakan Sağırkaya

**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

<b>Dış Kapak</b>	<b>I</b>
İç Kapak	<b>II</b>
ETİK BEYANI	<b>III</b>
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE	<b>IV</b>
<b>TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU</b>	<b>V</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>VII</b>
<b>ÖZET</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Boğalarda Spermatolojik Özellikler	4
2.2. Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi	4
2.2.1. Fertilité ile İlişkili Spermatolojik Muayeneler	6
2.2.1.1. Spermanın Makroskobik Muayenesi	7
2.2.1.2. Spermanın Mikroskobik Muayenesi	9
2.2.1.3. Spermanın Fizikokimyasal Muayeneleri	19
2.2.1.4. Spermanın Mikrobiyal Muayenesi	21
2.2.1.5. Spermanın Potansiyel Fertilitésinin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Fonksiyon Testleri	22
2.3. Sperma Kirleticileri ve Biyogüvenlik	24
2.3.1. Sperma Kirleticilerinin Ortamdan Uzaklaştırılarak Fertil Spermatozoonların Ayrıştırılması	24
2.4. Spermanın Saklanması	25
2.4.1. Sperma Sulandırıcıları ve Kriyoprotektif Maddelerin Etkileri	27
2.4.2. Spermanın Dondurulması ve Çözündürülmesi	29
2.4.3. Çözündürme Sıcaklığının Sperma Üzerine Etkileri	30
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>31</b>
3.1. Çalışma Materyali	31
3.2. Spermanın Çözündürülmesi	31
3.3. Spermatolojik Özelliklerin İncelenmesi	32
3.3.1. Motilite	32
3.3.2. Akrozom Bütünlüğü (FITC-Pisum sativum agglutinin: FITC-PSA)	32
3.3.3. Plazma Membran Bütünlüğü (Hypoosmotic Swelling Test=HOST)	33
3.3.4. Canlı Spermatozoon Oranının Belirlenmesi	34
3.4. Spermatozoon Seperasyon Yöntemleri	35
3.4.1. Percoll	35
3.4.2. Swim-Up	36
3.5. Thoma Lamı ve Sperm Konsantrasyonunun Belirlenmesi	37
3.6. İstatiksel Analizler	39
3.7. Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve Medyumların Hazırlanması	39
3.7.1. Percoll gradient solüsyonunun hazırlanması	39
3.7.2. HOST solüsyonunun hazırlanması	40
3.7.3. Swim-up metodunda TALP medyumunun hazırlanması	41
3.7.4. TL Hepes (Yıkama) Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve İçeriği	41

3.7.5. TL Hapes (Yıkama) Medyumunun Hazırlanması ve İçeriği	42
<b>4. BULGULAR</b>	<b>43</b>
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	52
<b>REFERANSLAR</b>	<b>60</b>
SİMGELER VE KISALTMALAR	71
TEŞEKKÜR	72
ÖZGEÇMİŞ	73

## ÖZET

Son yıllarda üreme biyoteknolojilerinden in vitro embriyo üretimi sığırlarda yaygın olarak kullanılmakta ve her geçen günde artarak devam etmektedir. Bu kapsamda in vitro fertilizasyon aşamasında kullanılan sperma kalitesinin önemi de artmaktadır. Sunulan çalışmanın amacı 37°C/30 sn, 50°C/15 sn ve 70°C/5 sn su banyosunda çözündürülen Brown Swiss ırkına ait dondurulmuş spermaların Percoll ve Swim up ayırıştırma yöntemleriyle ayırıştırılmış deneme grupları ve herhangi bir ayırıştırma işlemi yapılmamış kontrol grubuyla karşılaştırarak Percoll ve Swim up yöntemlerinin spermanın motilitesi, ölü ve canlı oranları, akrozomal yapısı ve plazma membran bütünlüğü üzerindeki etkilerini incelemektir. 37°C/30 sn, 50°C/15 sn ve 70°C/5 sn sürede çözündürme koşullarında FITC-PSA ortalama değerleri sırasıyla Percoll grubunda %32,35, %41,35 ve %56,30; Swim-up grubunda %25,25, %32,45 ve %63,90; Kontrol grubunda %17,90, %18,35 ve %17,45'tir. Aynı sıcaklıklarda ölü hücre oranları sırasıyla Percoll grubunda %31,38, %14,95 ve %30,65; Swim up grubunda %15,85, %13,60 ve %13,50; Kontrol grubunda %35,58, %46,18 ve %35,82'tir. Aynı sıcaklıklarda canlı hücre oranları sırasıyla Percoll grubunda %68,63, %85,05 ve %69,35; Swim up grubunda %69,15, %86,40 ve %86,50; Kontrol grubunda %68,43, %53,83 ve %64,18'tir. Aynı sıcaklıklar için motilite oranları sırasıyla Percoll grubunda %55,75, %58,50 ve %48,25; Swim up grubunda %59,75, %55,75 ve %54,75; Kontrol grubunda %49,25, %45,75 ve %48,75'tir. Aynı sıcaklıklarda HOST sonuçları sırasıyla Percoll grubunda %73,95, %69,50 ve %42,20; Swim up grubunda %77,55, %72,00 ve %50,15; Kontrol grubunda %62,65, %70,50 ve %50,60'tır.

Sonuç olarak, yardımcı üreme teknikleri uygulanırken sperma ayırıştırma yöntemlerinden yararlanılması ve çözündürme işleminin pratik olması ve çözündürme sürecinin uzamasından kaynaklanacak olumsuz etkiden korunmak maksadıyla 37°C'nin kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Boğa, Sperma, Percoll, Swim-up, Sıcaklık

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF THAWING TEMPERATURES ON SPERM PLASMA MEMBRANE FUNCTIONAL INTEGRITY AND SPERM MORPHOLOGY AFTER SWIM-UP AND PERCOLL GRADIENT

In recent years, in vitro embryo production from reproductive biotechnologies has been widely used in cattle and continues to increase day by day. In this context, the importance of semen quality used in the in vitro fertilization phase is also increasing. The aim of the present study is to compare the frozen semen of Brown Swiss breed thawed in 37°C/30 sec, 50°C/15 sec, and 70°C/5 sec water bath with the experimental groups, separated by Percoll and Swim-up separation methods, and the control group without any separation process. In this way, the effects of Percoll and Swim-up methods on sperm motility, dead and viable ratios, acrosomal structure, and plasma membrane integrity are examined. At 37°C/30 sec, 50°C/15 sec and 70°C/5 sec thawing conditions, the mean FITC-PSA values were 32.35%, 41.35% and 56.30% in the Percoll group; 25.25%, 32.45% and 63.90% in the swim-up group; 17.90%, 18.35% and 17.45% in the control group, respectively. Dead cell rates at the same temperatures were 31.38%, 14.95% and 30.65% in the Percoll group; 15.85%, 13.60%, and 13.50% in the Swim-up group; 35.58%, 46.18%, and 35.82% in the control group, respectively. In addition, at the same temperatures, viable cell rates were 68.63%, 85.05%, and 69.35% in the Percoll group; 69.15%, 86.40%, and 86.50% in the Swim-up group; 68.43%, 53.83%, and 64.18% in the control group, respectively. Furthermore, at the same temperatures, the motility rates were 55.75%, 58.50%, and 48.25% in the Percoll group; 59.75%, 55.75%, and 54.75% in the Swim-up group; 49.25%, 45.75%, and 48.75% in the control group, respectively. Lastly, at the same temperatures, the HOST results were 73.95%, 69.50%, and 42.20% in the Percoll group; 77.55%, 72.00%, and 50.15% in the Swim up group; 62.65%, 70.50%, and 50.60% in the control group, respectively.

As a result, it was concluded that 37°C would be the optimum temperature in order to benefit from semen separation methods when applying assisted reproductive techniques, to make the thawing process practical, and to avoid the negative effects that may arise from the prolongation of the thawing process.

**Key Words:** Bull, Sperma, Percoll, Swim-up, Temperature



## 1. GİRİŞ

Modern hayvan yetiştiriciliğinde başlıca hedefler; istenen üstün genotipleri koruyarak yaygınlaştırmak ve yavru verimini en yüksek düzeyde tutarak, elde bulunan hayvan varlığından maksimum düzeyde yararlanmak şeklinde özetlenebilir. Bahsedilen bu hedeflere; suni tohumlama, embriyo transferi, klonlama, senkronizasyon ve gen transferi gibi modern biyoteknolojik yöntemlerin yanı sıra, tıbbi veya doğal premiks, vitamin ve hormon gibi biyoteknolojik ürünler kullanılarak da ulaşılabilir (Bedasa, Kebede, & Abraha, 2017; Moore & Hasler, 2017).

İnsanlarda suni tohumlama biyoteknolojisinin tarihçesi, resmi olmayan kayıtlara göre ilk kez Kastilya'nın kısır olan IV. Kralı Henry (1425-1474)'nin çocuk sahibi olması olayına dayandırılmaktadır. Spermatozoa, ilk olarak 1678'de Hollanda'da Antoni van Leeuwenhoek ve asistanı Johannes Ham tarafından görüntülenmiş ve insan semeninde yaşayan hayvancıklar olarak tarif edilmiştir. Evcil hayvanlarda suni tohumlama dalındaki ilk bilimsel çalışmalar ise, spermatozoonun keşfinden yaklaşık 100 yıl sonra, İtalyan filozof L. Spallanzani tarafından gerçekleştirilmiştir (Ombelet & Van Robays, 2015). Yapılan çalışmada, kızgınlık gösteren dişi köpeğin uterusuna vücut sıcaklığındaki sperma enjektör yardımıyla bırakılmış ve uygulama sonrası sağlıklı yavrular elde edilmiştir. Spallanzani'nin yapmış olduğu çalışmalar 1782 yılında P. Rossi tarafından başarı ile tekrarlanmıştır (Orland, 2017). Fransız veteriner hekim Repiquet, 1890 yılında at yetiştiriciliğinde suni tohumlama uygulamalarını başlatmış ve bu uygulamaları infertilite tedavisinde kullanmaya çalışmıştır. Uygulamaya yönelik ilk ciddi çalışmalar 1922 yılında Rus araştırmacı E. I. Ivanoff tarafından başlatılmıştır. Araştırmacı 1900'lü yılların başlarında kanatlı, sığır ve koyunlarda bu tekniği başarı ile uygulamıştır (Moore & Hasler, 2017). Türkiye'de ise, ilk suni tohumlama çalışmaları 1926 yılında Prof. Dr. Michailov'un öncülüğünde atçılık alanında yapılmıştır (Küçükaskan, Yerlikaya, & Yiğit, 2018). 1926 yılında koyunlarda ve 1949 yılında da sığırlar üzerinde suni

tohumlama yöntemi kullanılmıştır. Sığırlarda dondurulmuş sperma ile ilk suni tohumlama uygulamaları 1952 yılında gerçekleştirilmiştir (Moore & Hasler, 2017).

Süt sığırcılığında üreme programının başarısı; kirleticilerden arı bir şekilde spermanın uygun teknik kullanılarak alınması, muayenesi, sulandırılması, soğutulması, dondurulması, saklanması, çözündürülmesi ve dişi genital organına uygun zamanda bırakılması gibi birçok faktör ile ilişkilidir. Günümüzde sığırcılık alanında suni tohumlama yöntemiyle elde edilen yüksek fertilité oranları doğal aşım ile karşılaştırılabilecek düzeye ulaşmış ve dondurulmuş boğa sperması uzun yıllardır süt sığırcılığı endüstrisinde ticari olarak kullanılmaktadır. Bu teknik sayesinde mevcut hayvan popülasyonunda kısa sürede istenen yönde genetik ilerleme sağlanabilmekte, erkek damızlık besleme külfetinden kurtulunulabilmekte, değerli bir damızlık bireyden geniş ölçüde yararlanılabilmekte, venereal yolla bulaşan hastalıkların önüne geçilebilmekte ve mevcut sürüde bir örneklik sağlanabilmektedir (Morrell, 2011). Projeni test ve genomik analiz gibi seleksiyon yöntemleri yardımıyla damızlık hayvan seçiminin yüksek doğrulukta gerçekleştirilebilmesi, payet yöntemi ile mükemmel yakın dondurma, depolama ve tohumlama tekniklerinin geliştirilmesinin yanında, dişilerde reproduksiyonu kontrol eden endokrinolojik mekanizmaların detaylarıyla aydınlatılması ile suni tohumlama teknolojisi dünya genelinde hızla yaygınlaşmıştır (Vishwanath, 2003).

Spermanın dondurulması işlemi; genetik materyalin geleceğe aktarılması, ülkeler arası taşınması gibi birçok alanda avantaj sağlamaktadır (Kusakabe, Szczygiel, Whittingham, & Yanagimachi, 2001). Özellikle süt sığırcılığı alanında suni tohumlama endüstrisi alanındaki gelişmeler hızla ilerlemiş ve günümüzde bütün dünyaya yayılmıştır. Son yıllarda, bu reproduksiyon biyoteknolojisi yılda ortalama 130 milyondan fazla dişi sığıra uygulanmaktadır (Moore & Hasler, 2017). Türkiye İstatistik Kurumu 2017 verilerine göre ülkemizde 15,9 milyon baş boğa altı olmak üzere toplam 16,1 milyon büyükbaş hayvan bulunmaktadır. Aynı yıl boğa altı hayvanların yaklaşık 3,2 milyonuna suni tohumlama uygulanmıştır. Gebelik başına yaklaşık 2,5 tohumlama hesaplandığında, ülkemizde yaklaşık 8 milyon adet tohumlama yapılmaktadır.

Spermanın dondurulması, yabani ve evcil hayvanlarda yardımcı üreme tekniklerin yaygınlaşmasını ve uygulanabilirliğini artırmaktadır. Ayrıca, çoğu memelide spermanın sıvı nitrojen (-196°C) ile dondurularak saklanmasından başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Moore & Hasler, 2017).

Sağlam yapıya sahip motil spermatozoonları immotil hücrelerden ayırma işlemi; testiküler dokudan köken alan hücre döküntüleri, erkek donörün ürogenital kanalı ve sperma alırken oluşan kontaminasyonlardan köken alan mikroorganizmaların ve seminal plazma içeriğinde bulunan sperm metabolizmasını etkileyen bileşenlerin uzaklaştırılması, in vitro fertilizasyon, intrauterin tohumlama (IUI) ve diğer yardımcı üreme tekniklerinde de rutin bir uygulama olarak kullanılmaktadır (Seidel, 2012). Özellikle, son yıllarda donör hayvanlardan toplanan oositlerden in vitro fertilizasyon yöntemiyle üretilen embriyo sayısındaki artış Percoll ve swim up gibi ayırma yöntemlerini daha önemli hale getirmiştir.

Sunulan tezin amacı, farklı sıcaklık ve sürede çözündürme değerlerinde (37°C/30 saniye, 50°C/15 saniye, 70°C/5 saniye) çözündürülüp, farklı sperma ayırma yöntemleri (Percoll ve Swim up) ile ayrıştırılan Brown Swiss ırkına ait boğa spermatozoonlarının akrozomal yapı, motilite ve plazma membran bütünlüğüne ilişkin özelliklerini karşılaştırarak incelemek ve yardımcı üreme teknolojileri açısından en ideal olan uygulamayı tespit etmektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Boğalarda Spermatolojik Özellikler

Spermatogenezisin son aşamasında biyosentez, kendini onarma, büyüme, bölünme ve yenilenme yeteneğini kaybeden spermatozoon; hareket etme özelliğine sahip haploid yapıda bir hücredir. Baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç ana kısımdan oluşan spermatozoon, özellikle uzunluk ve baş yapısı bakımından türler arası farklılık göstermektedir. Memeli spermatozoon uzunluğu 28,3  $\mu$  ile 356,3  $\mu$  arasında olmakla birlikte (Cummins & Woodall, 1985), boğa spermatozoonu ise yaklaşık 68  $\mu$  uzunluğundadır (İleri, Ak, Pabuçcuoğlu, & Birler, 1998).

### 2.2. Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi

Evcil hayvanların spermasının toplanması, ekonomik nedenlerin yanı sıra, genetik özelliklerinin sonraki yıllara aktarılabilmesi, bilimsel çalışmalar yapılabilmesi, aşım yapamayan hastalıklı, yaşlı veya deneyimsiz hayvanlardan yararlanılabilmesi, erken yaşta yavru elde edilebilmesi, tohumlanacak dişinin ve erkeğin birbirlerinden uzak yerlerde olduğu durumlarda yavru elde edilebilmesi ve/veya bireyin cinsel sağlık kontrolünün gerçekleştirilmesi gibi amaçlara dayanmaktadır (Ax ve ark., 2016; İleri ve ark., 1998; Nur, 2019).

Memeli hayvanlardan suni vajen, elektro-ejakülatör, vajinaya bırakılan spermanın alınması ve ampullanın masajı gibi farklı yöntemler kullanılarak sperma toplanmaktadır. Boğalardan genellikle; suni vajen, elektroejakülasyon veya ampullanın masajıyla sperma alınabilmektedir (Pickett, & Berndtson, 1980). Bu yöntemler arasında yer alan suni vajen yönteminde elde edilen sperma doğala en yakın özellikte olup, dondurulabilirliği diğer yöntemlere göre daha üstün özelliktedir. Bu nedenle, boğa sperması üretim merkezlerinde suni vajen ile sperma alma yöntemi yaygın bir şekilde tercih edilmektedir (Ax ve ark., 2016; Barth, 2007; İleri ve ark.,

1998; Nur, 2019). Beslenme, çevre sıcaklığı ve mevsim, sperma alma sıklığı, sperma alınırken hayvana yapılan muamele, damızlığın sağlık durumu, nakli, yaşı, egzersiz durumu, ön sekretin spermaya karışması, sperma alma öncesi boğanın boşa atılması, kullanılan malzemenin asepsi ve antiseptisi, sperma alma sırasında ortamın sıcaklığı, su, nem ve güneş ışığı gibi birçok faktör spermanın kalitesini etkilemektedir (Ax ve ark., 2016; İleri ve ark., 1998; Nur, 2019). Sperma kalitesi fertilizasyon kapasitesi üzerinde büyük öneme sahiptir. Suni tohumlama çalışmalarının ekonomik ve verimli olabilmesi kullanılan spermaların fertilitesi ile ilişkilidir.

Fertilizasyon, fertiliteden farklı bir anlama sahiptir. Fertilizasyon, spermatozoonun kapasitasyonunu, yumurta ile birleşerek oosite penetrasyonunu, polispermi bloğunu ve pronükleusların oluşumu ve füzyonunu, maternal ve paternal kromozomların birbirine karışmasını ve ardından embriyonik bölünmelerin başlamasını içeren moleküler olayların bir dizisidir. Fertilité ise, sağlıklı bireylerin doğru zamanda çiftleşmeleri sonrası dişinin gebe kalması olarak tanımlanmaktadır. Boğanın fertilité yeteneği ise; sağlıklı bir inek ile doğru zamanda yapılan çiftleştirme sonrası dişiye gebe bırakma yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Ax ve ark., 2016; Nur, 2019). Doğru zamanda yapılan suni tohumlama veya doğal aşım sonucu %90-95 düzeyinde fertilizasyon oranına ulaşılabilir. Ne yazık ki fertilize olmuş bu oositlerin %35-70'i erken embriyonik ölümle, %10'u ise daha sonraki dönemlerde şekillenen düşüklere bağlı olarak kaybedilmektedir. Boğalarda, taze sperma veya doğal aşım sonrasında (>%75) donmuş spermaya göre daha yüksek fertilité oranı (>%50) elde edilmektedir. Bu oranlardan daha düşük gebelik oranı ise infertilité olarak tanımlanır (Diskin, Parr, & Morris, 2012).

Bir boğanın fertilité yeteneği, aşım sonrası direkt gebelik sonuçlarına bakılarak veya gebelik oranı ile ilgili parametrelere bakılarak tahmin edilmektedir. İstatistiksel olarak gebelik sonuçlarına bakarak boğanın fertilité yeteneğini ortaya koyabilmek için, güvenilir sayıda (en az 300) tohumlama veya çiftleştirme gerektiğinden, doğal aşım sonrası gebelik ile ilgili boğaya ait verileri elde etmek çok fazla zaman almaktadır. Bunun yerine spermatozoon konsantrasyonu, ejakulatta bulunan toplam spermatozoon sayısı, spermatozoon motilitesi, ileriye doğru hareketin hızı, ölü-canlı oranı, akrozom ve diğer morfolojik bütünlüğün değerlendirilmesinin yanı sıra, DNA kalitesi,

enzimatik aktivite, ozmotik stres testleri (Hypoosmotic Swelling Test; HOST), inkübasyon testleri (viabilite), artırılmış akrozom reaksiyon oranı, mukus veya jel penetrasyon testi, hamster yumurta penetrasyon testi gibi fertilitte ile ilişkili parametrelere bakılarak boğanın fertilitesi hakkında değerlendirme yapılabilmektedir (Ax ve ark., 2016; Nur, 2019).

### **2.2.1. Fertilitte ile İlişkili Spermatolojik Muayeneler**

Veteriner androlojide spermatolojik muayeneler; donör hayvanın reproduktif organlarının sağlık durumu veya potansiyel fertilizasyon yeteneğini belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Sperm kalitesinin değerlendirilmesi, damızlığın testis ve eklenti üreme bezlerinin sağlığı ve fonksiyonel fizyolojisi, ejakülattaki sperm sayısı, sperm viabilitesi ve morfolojisi ile ilgili bilgiler vermesi yanında sperm maturasyonu, spermanın hareket şekli ve hızının yorumlanması klinik androlojinin önemli uygulamalarındandır (Rodriguez-Martinez, 2014).

Alınan spermanın kalitesi; boğanın sağlık durumu, boğanın nakli, boğanın yaşı, ön sekret, sperma alma öncesi boğanın atlatılması, kullanılan malzemenin asepsi ve antisepsisi, sperma alma sırasındaki ortamın sıcaklığı, su, nem, güneş ışığı, damızlığın beslenme rejimi, çevre sıcaklığı ve mevsim, sperma alma sıklığı, sperma alınırken boğanın etkilenme düzeyi gibi faktörlerden etkilenmektedir (İleri ve ark., 1998). Ejakülata potansiyel fertilitte yeteneğinin belirlenmesinde ejakülatta bulunan toplam spermatozoon sayısı, spermatozoon motilitesi, ileriye doğru hareketin hızı, ölü/canlı spermatozoa oranı, akrozom ve diğer morfolojik bozukluklar gibi değerlendirmeler görsel olarak mikroskopiye dayalı yöntemlerle değerlendirilmektedir. Bunun yanı sıra DNA kalitesi, enzimatik aktivite, ozmotik stres testleri (HOST), yüksek veya düşük ısılarda inkübasyon testleri, artırılmış akrozom reaksiyon oranı, mukus veya jel penetrasyon testi ve hamster yumurta penetrasyon testi gibi spermanın fonksiyonel aktivitesi ile ilgili mikroskopiye ek olarak daha ileri teknolojileri gerektiren testlerden de yararlanılmaktadır (Aisen, Alvarez, Venturino, & Garde, 2000; Ax et al., 2016; Bag, Joshi, Rawat, & Mittal, 2002; Barroso et al., 2006; Benchaib ve ark., 2003; Nur ve ark., 2012). Ejakülata fertilitte yeteneğini ortaya koymak için yapılan subjektif testlerin hiçbiri, infertiliteye neden olan spermatozoondaki biyolojik farklılıkları

tümüyle aydınlatamamaktadır. Belirtilen testlerin birlikte kullanılmaları halinde ise, daha yüksek doğrulukta bireyin fertilitesi hakkında tahmin yürütülmesine olanak sağlanmaktadır (Ax ve ark., 2016; Ball, Sabeur, & Allen, 2008; Yanagimachi, 1994). Günümüzde fertilitenin tahmininde doğru sonuç insidensini artırmak ve test yapan bireyler ve laboratuvarlar arası farklılığı azaltmak için otomatize metotlar geliştirilmiştir.

Spermanın muayenesi; makroskobik muayene, mikroskobik muayene, fizikokimyasal muayene ve fonksiyonel muayene olmak üzere dört ayrı başlıkta değerlendirilmektedir. Bazı çalışmalarda spermanın mikrobiyal içeriğinin değerlendirildiği mikrobiyolojik muayene de spermatolojik muayeneler içine dahil edilmiştir (Ax ve ark., 2016; İleri ve ark., 1998).

#### **2.2.1.1. Spermanın Makroskobik Muayenesi**

**Hacim:** Boğa sperması spermatozoonlar ile hacminin büyük bir kısmını oluşturan testiküler doku ve eklenti üreme bezlerinden köken alan sıvılardan (seminal plazma) oluşmaktadır. Hacim, boğanın bir ejakülasyonundan elde edilen ml cinsinden toplam sperma (hücre ve sıvı) miktarının ifadesidir. Genellikle dereceli sperma toplama kadehinden veya pipetle ml cinsinden belirlenmektedir. Spermanın hacmi, ejakülatta bulunan toplam spermatozoon sayısı, sulandırma oranı ve elde edilebilecek payet sayısının hesaplanması için önemlidir. Boğanın yaşı, ırkı, beslenme durumu, yaşadığı çevre koşulları, sperma alma sıklığı toplam sperma hacmini etkilemektedir (Murphy ve ark., 2018). Ayrıca sperma alınmadan önce, libidonun uyarılması, suni vajen koşulları ve hayvana yapılan uyarımlar sperma hacmini etkilemektedir (İleri ve ark., 1998). Sperma hacmi boğalar arasında farklılık göstermektedir. Genç boğalar 1-2 mL sperma verirken, erişkin ve yaşlı boğalar 15 mL'ye kadar sperma verebilmektedir. Ortalama sperma hacmi 5-6 mL olarak kabul edilmektedir (Ball ve ark., 2008; İleri ve ark., 1998). Ejakülasyonun gerçekleşmemesi durumu aspermi olarak adlandırılmaktadır (Ax ve ark., 2016; Nur, 2019). Ejakülasyon sıklığı ile sperma hacmi arasında negatif ilişki bildiren çalışmalar art arda iki ejakülat alındığında, genellikle ikinci ejakülatın daha düşük hacme sahip olduğunu bildirmiştir. Seksüel

dinlenme sonrası sperma hacminde hafif bir artış görülebilir (Ax ve ark., 2016; Pruneda ve ark., 2005).

**Renk:** Sperma görünümü alınan numunenin miktarına göre değişmekle birlikte süt beyazından koyu kreme kadar değişiklik göstermektedir. Boğa ejakulatı görünüm olarak üniform yapıdadır. Opak görünümü, içerdiği hücre yoğunluğuna bağlıdır. Yarı saydam ve ışığı geçiren örnekler az sayıda hücre içerir. Bazı boğalar riboflavin içeriğinden dolayı sarı renkte sperma verebilirler (İleri ve ark., 1998). Normal renk dışındaki pembe, kırmızı, kahverengi, kirlili sarı ve yeşilimsi renk değişiklikleri patolojik renk farklılıkları olarak tanımlanmaktadır. Spermanın pembe, kırmızı kahverengi renkte olması spermaya kanamadan ileri gelen kanın (hemospermi) olduğunu, sarı renk olması spermaya idrarın (ürospermi) karıştığını ve yeşilimsi bir renk olması ise spermaya irin karıştığını (piyospermi) göstermektedir (İleri ve ark., 1998; Nur, 2019). Sperma saç, kir, dışkı, saman ve diğer kirlenici maddelerle kontamine olmamalıdır. Tortu içeren, pıhtılaşmış görünümlü sperma, bir enfeksiyon varlığını işaret etmektedir (Ax ve ark., 2016).

**Kıvam (Viskozite):** Spermanın kıvamı akışkanlığı ile ölçülmektedir. Spermanın kıvamı, spermatozoit sayısına bağlı olarak sulu kıvamdan krema kıvamına kadar değişen viskozite gösterebilmektedir. Boğa sperması 1,7-10,5 santipuz arasında. Viskozite, ejakülattaki spermatozoon yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Spermanın görünümündeki opaklık kriterinde olduğu gibi, viskozitesi yüksek olan spermaların yoğunluğunun da yüksek olduğu bildirilmiştir (İleri ve ark., 1998).

**Koku:** Elde edildiği hayvan türüne bağlı olarak spermanın kendine has aromatik bir kokusu vardır. İçine dışkı, idrar ve irin gibi herhangi bir maddenin karışması kokusunda değişikliklere yol açabilir (İleri ve ark., 1998).

**Mass aktivite (Kitle hareketi):** Mass aktivite, spermanın kitlesel olarak yaptığı kaynama veya girdap hareketi olarak tanımlanmaktadır. Özellikle yoğun spermatozoit içeren ejakülatlara sahip koç, teke ve boğalarda değerlendirilen parametrelerden birisidir. Özellikle sperması çok yoğun ve yüksek mass aktiviteye sahip koç ve tekelerde ( $1,5-4,0 \times 10^9$  mL/spermatozoit) sperma alma tüpünde de



gözlemlenebilmektedir. Bu nedenle, bazı araştışıcılar tarafından makroskobik muayene içinde değerlendirilmektedir. Koç ve tekelere göre boğa sperması ( $0,6-2,0 \times 10^9$  mL/spermatozoit) daha düşük spermatozoit içermektedir. Özellikle düşük spermatozoit içeren ejakülatlarda sperma alma tüpünden bakı ile mass aktivite tespit edilememektedir. Bunun yerine mikroskoptan faydalanılarak mass aktivite değerlendirilmektedir. Dolayısıyla, bazı araştışıcılar tarafından mikroskobik muayene olarak da değerlendirilebilmektedir (Codognoto ve ark., 2018; Nagata ve ark., 2019). Bu amaçla ejakülasyon sonrası zaman geçirmeden spermadan bir damla alınarak ısıtılmış lam üzerine damlatılarak (lamel kapatılmaksızın) mikroskop altında 10 X büyütmede değerlendirilir. Değerlendirmede spermanın yapmış olduğu girdap hareketi gözlemlenir (İleri ve ark., 1998). Spermada kitle hareketi 0 ile 5 arasında skor verilerek değerlendirilmektedir (Tablo 1) (Hossain, Khatun, Islam, & Miazi, 2012).

**Tablo 1.** Spermada kitle hareketindeki canlılığın skor yöntemiyle belirlenmesi (Hossain ve ark., 2012)

SKOR	KİTLE HAREKETİNİN ÖZELLİKLERİ
0	Hareket yoktur
1	Spermatozoonların %30'undan azında hareket vardır. Hareket zayıftır, titreşimli değildir.
2	Spermatozoonların %30-50'sinde hareket vardır. Hareket güçlüdür fakat dalga ve girdap hareketi yoktur.
3	Spermatozoonların %50-75'inde hareket vardır. Hareket güçlüdür fakat dalga ve girdap hareketi çok yavaş olmaktadır.
4	Spermatozoonların %70-80'inde hareket vardır. Hareket güçlüdür, dalga ve girdap hareketi hızlıdır fakat mükemmel olacak kadar canlı değildir.
5	Spermatozoonların %80'inden fazlasında hareket vardır. Dalga ve girdap hareketi spermlerin sürekli ve hızlı bir şekilde hareketiyle olmaktadır. Hareket o kadar güçlüdür ki sulandırıcı katmadan bireysel hareketin incelenmesi mümkün değildir.

### 2.2.1.2. Spermanın Mikroskobik Muayenesi

Morfolojik olarak birbirinden ayırt edilebilen parçacıklara sahip spermatozoit kendine has bir metabolizmaya sahiptir (Barbas & Mascarenhas, 2009). Spermatozoitin yoğunlaşmış nükleer materyali içeren bir baş, enerji merkezi olarak görev yapan mitokondrileri içeren orta parça ve hareket yeteneğine sahip kuyruk olmak üzere, morfolojik olarak ayırt edilebilen üç fonksiyonel bölgesi bulunmaktadır

(Varner, 2007). Sperma muayenesinde spermanın morfolojik görüntüsünü, fonksiyonlarını, metabolizmasını ve içeriğini değerlendirmek amacıyla spermatozoitin belirli bölgelerine spesifik basit veya floresan bağlanmış boyalar kullanılarak gerçekleştirilen basit ışık, faz kontrast ve floresan mikroskopunun yanı sıra bilgisayar destekli görüntüleme sistemleri ve flow sitometri gibi ileri mikroskopik yöntemler de kullanılmaktadır (Ax ve ark., 2016).

Sperma ancak hızlı ve etkin bir biçimde incelenerek fertilité gücü hakkında gerçekçi bir fikir edinilebilir. Bu nedenle spermanın mevcut sıcaklığı korunarak, taze spermada sperma alınır alınmaz, donmuş sperma da ise sperma çözündürülür çözündürülmez muayene işleminin gerçekleştirilmesi önerilir. Bilgisayar destekli görüntüleme sistemleri ve flow sitometri gibi ileri mikroskopik yöntemler hızlı değerlendirmeye daha uygundur (Vincent ve ark., 2014).

#### **Motilite (Hareket Yeteneği):**

Spermatogenesis kendi içinde spermatositogenesis ve spermiyogenesis (spermiasyon) olmak üzere iki aşamada şekillenmektedir. Spermatositogenesis aşamasının bitimiyle birlikte spermatidler şekillenir (Staub & Johnson, 2018). Bu aşamadan sonra, spermatidlerin nükleus ve sitoplazmasında bazı değişiklikler şekillenerek tür spesifik morfolojik yapıya dönüşüm süreci (spermiyogenesis) başlar. Bu dönemde spermatozoonlar protoplazmik damlacık adı verilen bir sitoplazma kalıntısına sahiptir. Boğa spermatozoitinin epididimise ulaşması ile 7 gün süren epididimal migrasyon aşamasında protoplazmik damlacıklarından kurtularak son olgunlaşma aşamasını geçirir (Staub & Johnson, 2018). Sperm motilitesi, testiste spermatogenezin tamamlanması ile fertilizasyon aşamasına kadar erkek ve dişi genital kanaldan köken alan birçok faktör tarafından düzenlenir (Ax ve ark., 2016). Spermatozoonlar, sertoli hücrelerinden salgılanan sıvı ile birlikte testiküler kanallar içine salındığında motiliteye sahip değildir.

Sperma spermatozoonlarla birlikte seminal plazmadan oluşur. Seminal plazmanın büyük bir kısmı erkek eklenti üreme bezlerinden köken alan salgılardır. Seminal plazma spermatozoonlar için enerji kaynağı ve vajinanın asidik olan pH'ını

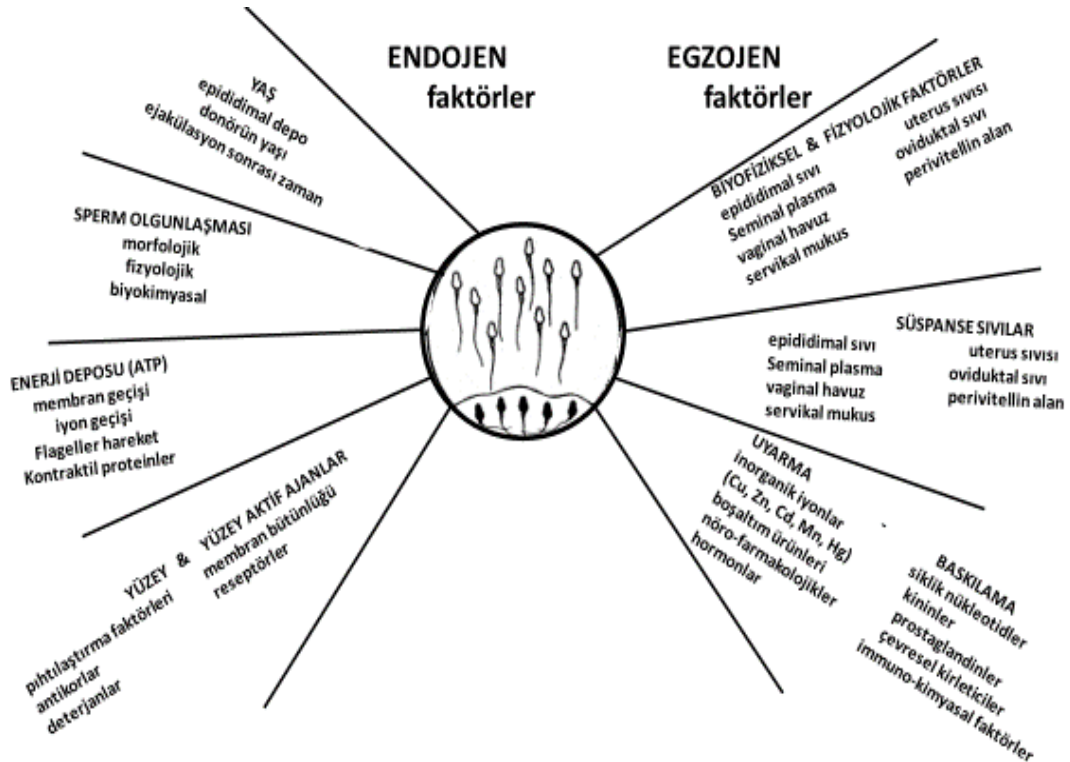
dengelemek için tampon görevi bulunan maddeleri ve epididimisten köken alan motiliteyi baskılayan faktörleri de barındırır (Juyena & Stelletta, 2012; Velho ve ark., 2018). Ejakülasyon ile birlikte epididimisten köken alan ve motiliteyi baskılayan faktörler, erkek eklenti üreme bezi salgılarının oluşturduğu seminal plazma ile seyreltilerek bu faktörlerin baskılayıcı etkisi azaltılmaktadır. Ayrıca, erkek ve dişi genital kanaldan köken alan bazı enerji kaynakları (fruktoz), spermin, spermidin, düşük moleküler ağırlıklı epididimal baskılayıcı faktör (akrozom baskılayıcı faktör), heparin, asetilkolin ve adenozin, düşük moleküler ağırlıklı motilite uyarıcı faktör, siklik adenozin monofosfat (cAMP), tiroksin ve triiyodotironin sperm motilitesinin başlamasını stimüle etmektedir. Kısacası, ejakülasyon ile hücre içi ve dışında şekillenen iyon konsantrasyonlarındaki değişiklikler spermatozoit aksonemine ait motor proteinlerinin fosforilasyonunu aktive ederek motiliteyi uyarmaktadır (Lindemann & Kanous, 1989). Glikoliz ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ATP üretiminin ana kaynağıdır. Glikoliz asıl kuyruk parçasında meydana gelirken, OXPHOS mitokondrilerin bulunduğu orta kısımda şekillenir. OXPHOS yolu ile üretilen ATP miktarı, glikoliz ile üretilen ATP miktarından daha fazladır ve bu nedenle, sperm motilitesi için gerekli ATP'nin ana kaynağı orta kısımdaki mitokondrilerdir (Tourmente, Villar-Moya, Rial, & Roldan, 2015).

Spermiyogenezisin tamamlanmasından fertilizasyon aşamasına kadar, erkek ve dişi genital kanaldan köken alan birçok faktör tarafından etkilenen spermatozoon motilitesi, eşeyli üreyen türlerin fertilizasyonunda önemli fonksiyonlara sahiptir. Bu nedenle spermatolojik muayeneler arasında motilitenin önemli bir yeri bulunmaktadır (Yamada, Sakase, Fukushima, & Harayama, 2018). Spermatozoon hareket şekline göre, ileri doğru hareket edenler (progressif), yerinde durarak dairesel hareket edenler (sirküler), yerinde durarak titreşenler (vibratör), geriye doğru hareket edenler (revers) olarak da sınıflandırılmaktadır (Nur, 2019). Motilite ise, başı istikametinde ileriye doğru hareket eden spermatozoonların yüzdesel olarak ifadesidir (İleri ve ark., 1998). Bu amaçla ısıtılmış lam üzerine bir damla sperma, yoğunluğuna bağlı olarak 1:1, 1:2 oranında serum fizyolojik veya uygun bir solüsyon ile sulandırılır. Üzerine lamel kapatıldıktan sonra, ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopta 400× büyütmede incelenir. Gerçekçi bir değerlendirme için aynı preparatta üç ayrı saha incelenerek karar verilir. Muayene sırasında sadece ileriye doğru giden spermatozoonlar dikkate alınır. Taze

boğa spermasının motilitesi >%65-80 düzeyindedir (İleri ve ark., 1998). Sperm motilitesi, subjektif olarak mikroskopik muayene dışında bilgisayar-yardımlı sperm analizi (computer-aided sperm analysis-CASA) ve sperm kalitesi analizörü (sperm quality analyzer-SQA) gibi gelişmiş analiz sistemleri ile objektif olarak da değerlendirilmektedir. Genellikle ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop, kamera ve bilgisayar birimlerinden oluşan bu sistemler spermanın motilitesi, hızı, hareket şekli, yoğunluğu ve sulandırma oranı hakkında ayrıntılı bilgi sunmaktadır. Ayrıca sonuçları karşılaştırma, saklama ve grafik şeklinde verebilme özellikleri de bulunmaktadır (Ax ve ark., 2016; Maes, Lopez Rodriguez, Rijsselaere, Vyt, & Van Soom, 2011).

Ejakülasyon sonrasında dişi genital kanalına çok sayıda spermatozoon bırakılır. Ancak, belirli özelliğe sahip spermatozoonun oosite ulaşarak oositi fertilize etmesi, geriye kalan spermatozoonların elimine edilmesi arkasındaki mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir (García-Vazquez, Gadea, Matas, & Holt, 2016). Spermatozoonun fertilizasyon sahasına başarıyla ulaşması ve oositi döllemesi iyi motiliteye, yeterli düzeyde morfolojik bütünlüğe ve normal DNA'ya sahip olmasına bağlıdır (Holt & Fazeli, 2016). Çoğu memelide olduğu gibi boğa sperması farklı motilite, DNA bütünlüğü, morfoloji veya şekil ve büyüklük, sinyal moleküllerine duyarlılık ve diğer birçok özellikteki farklılıklar ile karakterize alt popülasyonları barındırmaktadır (Valverde ve ark., 2016). Buna bağlı olarak, hareket şekli ve hızı farklı olan spermatozoonlar aynı ejakülatta bulunabilir. Motilite, sağlıklı bir spermatozoonun temel koşuludur; fakat anormal yapıdaki bazı spermatozoonlar da normal hareket edebilmektedir. Motilite spermatozoonun dişi genital organı içinde fertilizasyon bölgesine ulaşmasında, oosit yüzeyinde bulunan kumulus hücreleri ve zona pellusidayı geçişinde önemli rol oynar. Dişi genital sistemindeki spermatozoon seçim süreci, yüksek oranda hareketli spermlerin lehinedir. Morfolojik olarak normal, kuvvetli motilite yeteneği olan spermatozoonlar servikal mukus içinde hızla yüzerek fertilizasyon bölgesine ulaşır. Servikal mukus, motiliteleri iyi olmayan veya zayıf bir hidrodinamik yapıya sahip anormal spermatozoonlar için bir bariyer oluşturur. Zayıf veya farklı motilite sergileyen spermler ile tohumlama yapıldıktan kısa bir zaman sonra, servikal kanal akıntıları yolu ile atıldığı gözlemlenmiştir (Valverde ve ark., 2016).

Sperm motilitesi, ortam sıcaklığı, sulandırıcı çeşidi, kullanılan lam ve lamelin ısıtılmış olması gibi çok sayıda iç ve dış faktörden etkilenmektedir (Şekil 1) (Ax ve ark., 2016). Bu nedenle, muayeneler gerçekleştirilirken sperma dış ortamın sıcaklığından kaynaklanan farklılıklara karşı korunmalıdır (Ax ve ark., 2016; İleri ve ark., 1998). Christensen, Brockhoff, & Lehn-Jensen (1999) 117 boğanın 1635 ejakülatını kullanarak yaptıkları bir çalışmada, taze sperma motilitesi ile fertilité arasında ( $P=0,0002$ ) ve çözündürme sonrası sperm motilitesi ile fertilité arasında ( $P<0,0001$ ) yüksek bir korelasyon olduğunu bildirmiştir.



**Şekil 1.** Spermada Motiliteyi Etkileyen Endojen ve Ekzojen Bazı Parametreler

Spermanın dişi genital kanaldaki motil yaşam süresi ve fertilizasyon oranı arasında da sıkı bir ilişki vardır. Bu ilişki taze spermada donmuş spermaya göre daha güçlüdür. İnek genital kanalına bırakılan taze sperma yaklaşık 30-48 saat canlı kalırken, donmuş sperma 12-24 saat kadar canlılığını sürdürmektedir (Thompson, 2004). Spermatozoonun yaşlanmasına bağlı olarak, normal ve anormal spermatozoon popülasyonunda değişik zamanlarda ve farklı oranlarda motilitede düşüklük gözlemlenmektedir. Seksüel dinlenme, sıcak ve soğuk gibi çevresel faktörler, sulandırıcının bileşenleri ve ozmotik basınç değişimleri sperm motilitesinde düşüslere

yol açmaktadır (Payan-Carreira, Miranda, & Nizanski, 2011). Seksüel dinlenme sonucu spermatozoonun yaşlanmasına bağlı olarak oluşan reaktif serbest oksijen parçacıkları sperm hücre zarı fosfolipidlerine bağlanarak dejenere olmuş yağ asitlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Dejenere olmuş yağ asidinden türeyen peroksitler ve açığa çıkan diğer dejeneratif etkili ürünler spermanın motilite yeteneğini olumsuz etkiler (Bollwein & Bittner, 2018).

### **Spermatozoon Yoğunluğu:**

Spermatozoon yoğunluğu, birim hacimde bulunan spermatozoon sayısının ifadesidir. Boğalarda spermatozoon yoğunluğu  $2 \times 10^8$  sperm/mL (genç boğalarda) ile  $1,8 \times 10^9$  (erişkin boğalarda) arasında değişiklik göstermektedir. Sperma yoğunluğu hemositometrik, fotometrik, elektronik sayaç yöntemi gibi değişik yöntemlerle saptanmaktadır (Anzar, Kroetsch, & Buhr, 2009; Hafez, & Hafez, 2020). Hemositometre, skorlanmış bölmelere sahip bir mikroskop lamıdır. Lamdaki alan başına düşen sperm sayısının manuel olarak sayılmasının zaman alıcı olmasına rağmen, doğru sonuçlar elde edilmektedir. Bu amaçla kalibre edilmiş bir spektrofotometre veya kolorimetre ile hassas ve hızlı bir şekilde spermanın yoğunluğu belirlenebilmektedir (Anzar ve ark., 2009; Ax ve ark., 2016). Ayrıca flow sitometri ve bazı hücre analiz sistemleri gibi görüntü analizi yapabilen cihazlar da sulandırma oranı dikkate alınarak sperma yoğunluğunu tespit etmek için kullanılabilir.

Spermatolojik özellikler ile fertilité arasındaki ilişki diğer hayvanlara göre boğalarda daha iyi aydınlatılmıştır. Boğalarda kabul edilebilir fertilité oranı bakımından gerekli motil spermatozoon sayısı bireyler arasında farklılık göstermektedir. Genellikle doğal aşım sonrası kabul edilebilir düzeyde gebelik oranı elde etmek için, boğa ejakülatındaki spermatozoon sayısının mililitrede  $500 \times 10^6$ , motilitenin %70, morfolojik bütünlüğe sahip spermatozoon oranının ise %80'den fazla olması gerekmektedir (Ax ve ark., 2016). Donmuş sperma kullanılması halinde boğaya bağlı olarak tohumlama dozu en az  $7,5-15 \times 10^6$  spermatozoa olmalıdır (Nur, 2019). Fertilizasyonun gerçekleşmesi için, dişi genital kanalda kaliteli ve yeterli sayıda spermatozoon bulunmalıdır (Malmgren, 1998). Bu nedenle, spermatozoon konsantrasyonunun doğru saptanması, sulandırma oranının hesaplanması ve uygun

şekilde dozaj edilebilmesi yönünden önem arz etmektedir. Özellikle üretici firmalar, ekonomik nedenlerden dolayı ellerinde bulunan kıymetli damızlığa ait ejakülattan mümkün olduğunca fazla payet elde edebilmek için payetteki spermatozoit sayısını düşürme eğilimindedir (Ball ve ark., 2008; Nur ve ark., 2012).

### **Ölü/Canlı spermatozoit oranı:**

Canlılık spermanın kalitesi için önemli bir belirteç ve başarılı bir fertilizasyon için ön koşuldur. Hücre zarı, diğer hücreler ve ortamlar ile etkileşimi düzenler. Bu nedenle ölü canlı muayenesi genelde spermatozoona ait hücre zarının fonksiyonel bütünlüğü (geçirgenliği) ile ilişkilidir (Bailey, Bilodeau, & Cormier, 2000; Bilodeau, Chatterjee, Sirard, & Gagnon, 2000). Plazma membranı hasar gördükten sonra, plazma membranı sperm viabilitesi için gerekli olan iyon ve kofaktör konsantrasyonlarını koruyamaz (Woelders, 1991). Spermanın testis dokusu içinde üretimi sırasında, kanal sistemi ve epididimiste, ejakülasyon sırasında, ejakülasyon sonrası aşamada olduğu gibi sulandırma, dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında ve sonrasında oluşan hücre ölümü ve hücre fonksiyonlarının kaybı, oksidatif stres ile açıklanmaktadır (Bailey ve ark., 2000; Bilodeau ve ark., 2000).

Boğa sperması her zaman belli oranda (%20-30) ölü veya membran fonksiyon bütünlüğü hasarlı spermatozoitleri barındırmaktadır. Bir boğanın spermatolojik özellikleri ortaya konulurken; canlı spermatozoon oranına da bakılmalıdır (Ax ve ark., 2016). Canlı ve ölü spermatozoonların ayırt edilmesinde; eosin-nigrosin, Propidyum iodid, karboksifluoresin diasetat gibi mikroskopiye dayalı vital boyalardan yararlanılır (Ax ve ark., 2016; Barth, 2007; Nur ve ark., 2012). Membran bütünlüğünü belirlemeye yönelik kullanılan bu yöntemlerden elde edilen sonuçlar kullanılan boya miktarı, lamın sıcaklığı, froinin kalınlığı, kuruma sıcaklığı, sperma sulandırıcısının içeriği, ortamdaki spermatozoon sayısı ve uygulayıcı gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (Nur ve ark., 2012).

Sadece hasarlı hücre membranından geçebilen nükleik asit, intrasitoplazmik enzim veya membran potansiyelini belirleyen florofor boyama teknolojisinin gelişmesi, taze ve dondurulmuş çözündürülmüş spermatozoonların işlevselliğini

değerlendirmek için yeni imkanlar sağlamıştır (Januskauskas & Zilinskas, 2002). Bu boyaların çoğu floresan mikroskop gerektirdiği için, floresan mikroskop kullanma imkanı bulunmayan durumlarda ışık mikroskopuyla uyumlu eosin-nigrosin boyası sıklıkla ölü/canlı muayenesi için kullanılmaktadır. Eosin ölü hücrenin sitoplazmasını pembeye boyarken, nigrosin zeminde fon oluşturmaktadır. Bu yöntemde, sağlam membran yapısına sahip spermatozoitler (canlı hücreler) renk almazlar.

### **Morfolojik Muayene:**

Morfolojik olarak anormal yapıdaki spermatozoonların fertilité yetenekleri yoktur. Bu nedenle, morfolojik muayeneler fertilitenin tahmini için önemli bir parametredir (Barth, 2007; İleri ve ark., 1998). Morfolojik muayene, özellikle düşük fertilitéye sahip ejakülatların eliminasyonunu sağlar. Ayrıca infertil veya subfertil damızlık boğaların üretimden çıkarılmasıyla suni tohumlama merkezi ve yetiştiricilerin ekonomisine katkı da sağlar (Januskauskas & Zilinskas, 2002). Normal bir ejakülatta her zaman sağlıklı spermatozoitler ile birlikte morfolojik bozukluğa sahip spermatozoitler de bulunabilir. Normal sağlıklı bir ejakülatta bu oranın %20'yi geçmesi istenmez (Ax ve ark., 2016; İleri ve ark., 1998).

Kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, sperm-oosit füzyonu ve protein tirozin fosforilasyonu gibi sperma fonksiyonları için belirli bir miktar serbest oksijen parçacıklarına (ROS) gereksinim vardır (Agarwal & Allamaneni, 2004). Ancak, yüksek seviyede ROS sperm fonksiyonlarını olumsuz etkileyerek infertiliteye yol açar (Gil-Guzman ve ark., 2001). Olgunlaşmamış ve morfolojik olarak anormal olan spermatozoon ve seminal lökositler ROS üretimini artırır ve bu artış fertilizasyonu olumsuz etkiler (Aitken & West, 1990).

Evcil hayvanların spermasındaki morfolojik bozuklukların saptanması amacıyla eosin-nigrosin, opal blue, fast green, Giemsa gibi boyama yöntemleri dışında Hancock, hayem eriği gibi bazı sıvı tespit solüsyonlarının da kullanılabileceği bildirilmiştir. Sınırlı sayıda hücrenin değerlendirildiği mikroskopiye dayalı bu subjektif yöntemlerin sonuçları, kullanılan solüsyonların pH'sı, sıcaklığı, boyama süresi ve ozmotik basıncı gibi özelliklerinden etkilenmektedir. Morfolojik



değerlendirmede, fertilitenin tahmininde doğru sonuç insidensini artırmak ve testi yapan birey ve laboratuvarlar arası farklılığı azaltmak için flow sitometri ve görüntü analiz sistemleri gibi otomatize metotlar geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden kısa bir zaman zarfında binlerce hücreyi analiz ederek gerçeğe yakın ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip sonuçlar elde edilmektedir (Ax ve ark., 2016).

Kullanılan yöntem ve laboratuvarlara bağlı olarak, morfolojik bulguların değerlendirilmesi için çeşitli sınıflandırma yöntemleri kullanılmaktadır. Morfolojik bozukluklar infertiliteye neden olan (mayor) ve infertiliteye neden olmayan (minor) morfolojik bozukluklar olmak üzere iki alt başlıkta değerlendirilmektedir. Bazı araştırmacılar ise morfolojik bozuklukları; birincil, ikincil ve üçüncül olarak sınıflandırmaktadır. Bu yöntemde birincil bozukluklar spermatogenesis sırasında, ikincil bozukluklar spermanın kanal sisteminden geçişinde ve üçüncül bozukluklar ejakülasyon sırasında veya sonrasında (spermanın alınması, sulandırılması, dondurulması, depolanması vb) şekillenen bozukluklar olarak sınıflandırılmıştır (Menon, Barkema, Wilde, Kastelic, & Thundathil, 2011).

Baş, boyun, orta bölüm ve kuyruktan oluşan spermatozoonun herhangi bir kısmında meydana gelen değişiklik morfolojik bozukluk olarak değerlendirilmektedir (Ax ve ark., 2016; İleri ve ark., 1998; Nur ve ark., 2012). Anomalileri lokalize olduğu yere göre (akrozoma, başa, implantasyon çukurluğuna, başın orta bölüme bağlanma noktasına, orta bölüme ve kuyruğa bağlı bozukluklar) sınıflandıran bu yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroskopiye dayalı bu yöntemde de morfolojik bozukluklar primer, sekonder ve tersiyer olarak sınıflandırılmaktadır. Genellikle primer bozuklukların spermatozoonun baş ve akrozomunda, sekonder bozuklukların spermatozoon kuyruğunun orta kısmında, tersiyer bozuklukların ise diğer kuyruk kısımlarında lokalize olduğu bildirilmiştir (Ax ve ark., 2016). Bu yöntemde primer, diğer bir deyişle baş ve akrozoma bağlı bozuklukların %20'yi geçmesi veya total morfolojik bozukluk oranının %30'un üzerinde olmasının infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (Ax ve ark., 2016; Deswal, 2018; Garcia-Paloma, 2015).

Memeli spermatozoidinin apikal ucunda bulunan akrozomal yapı, korona penetrasyon enzimi, hiyaluronidaz, nöroaminidaz, proakrozin, akrozin, proteinaz,

esteraz, fosfataz, fosfolipaz A<sub>2</sub>, asit fosfataz, aril sülfataz, beta-N-asetil glukozaminidaz, aryl aminidaz ve kollagenaz gibi proteolitik enzimleri içerir (Ax ve ark., 2016; İleri ve ark., 1998). Bu enzimlerin fertilizasyonda önemli rolü bulunmaktadır. Akrozomal enzimlerin miktarı ve çeşidi türler arasında farklılık gösterir (Ax ve ark., 2016).

Morfolojik incelemelerde akrozomun ayrı bir önemi vardır. Boğa spermatozoonunun yaşlanması veya zararlı etkilere bağlı olarak apikal bölgede bulunan akrozomal enzimleri içeren yapılar bozularak akrozomal enzim kayıpları şekillenir. Bu akrozomal enzimlerdeki kayıplar akrozomal bütünlüğün görünümünde değişikliklere yol açar. Muayene sırasında gözlemlenen bu akrozomal değişiklikler; geniş, granüllü, küçük eğrilmiş, dejenere akrozom ve akrozomsuz spermatozoit olarak sınıflandırılır (Aalseth & Saacke, 1986).

İstenilen oranda gebelik elde etmek için motilitenin tek başına yeterli olmadığını bunun yanında hiyaluronidaz, corona penetrasyon enzimi (CPE), nöroaminidaz ve tripsin gibi fertilizasyonda etkin rol oynayan enzimleri içeren akrozomal yapının bütünlüğünün bozulmamış olması gerekmektedir (İleri ve ark., 1998). Fertilizasyona yakın zamanda şekillenen akrozom reaksiyonu; spermatozoonun baş bölgesinin apikal ucunda bulunan akrozoma ait dış membran ile hücre membranının bütünlüklerini kaybederek akrozomal içeriği oluşturan enzimlerin ortaya çıkması ile karakterizedir. Bu aşamadan sonra, spermatozoidin fertil yaşam ömrü hızla kısalmaktadır (Januskauskas & Zilinskas, 2002).

Mikroskopik değerlendirmede bazı spermatozoitler birden çok morfolojik defekte sahip olabilir. Morfolojik değerlendirme yaparken başın uç kısmına (akrozoma) en yakın bozukluk sayılır. Bu amaçla en az 100 hücre değerlendirilmelidir. Ne kadar çok hücre değerlendirilirse doğruluk insidensi o kadar yüksek olacaktır. Bu nedenle, spermatozoonun morfolojik görüntüsünü, fonksiyonlarını, metabolizmasını ve içeriğini değerlendirmeye yönelik bilgisayar destekli görüntüleme sistemleri ve flow sitometri gibi ileri yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemler kısa bir zaman diliminde binlerce spermatozoitin morfolojik yapısı hakkında hızlıca sonuçlar vermektedir.

Genetik materyali barındıran başa ait bozukluklar; dar, mızrak ucu formlu, kürek, ampul, kuyruksuz, iri, küçük, büzülmüş, armut ve iki başlı olarak sınıflandırılır. Başa ait bozukluklar primer bozukluklar olarak değerlendirilmektedir. Bu bozukluklar genellikle spermatozogenezis aşamasında oluşmaktadır (Ax ve ark., 2016). Kuyruğun kapitulununun yerleştiği implantasyon çukurluğunun görünümü ile ilgili bozukluklar; düz, fazla girintili, dar ve geniş olarak sınıflandırılır. Başın orta bölüme bağlanması ile ilgili bozukluklar kuyruğun başa bağlanma şekli ile ilişkilidir ve abaksiyal bağlanma, paraksiyal bağlanma, retroaksiyal bağlanma, kırılmış ve kopmuş olarak sınıflandırılır. Spermatozoitin enerji kaynağını barındıran orta kısma ait bozukluklar; kalın, kısa, ince, deforme, kıvrık, katlanmış, axillar tip, fibrilli ve protoplazmik damlacık bulunduruyor şeklinde sınıflandırılmaktadır. Hareketin şekli ve kaynağı olan kuyruk kısmına ait bozukluklar ise; yumak şeklinde, kırık kuyruk, başa sarılmış, rudimenter, başsız kuyruk, geriye dönme, çift kuyruk ve fibrilleşme şeklinde sınıflandırılır (Menon ve ark., 2011).

### **2.2.1.3. Spermmanın Fizikokimyasal Muayeneleri**

Spermatozoa ve seminal plazma içeriği; ejakülasyondan fertilizasyona kadar, gametlerin dişi genital kanalda migrasyonu, kolonizasyonu, kapasitasyonu ve fertilizasyonu gibi fizyolojik olguları koordine etmektedir. Spermatozoa ve seminal plazmada şekillenen değişiklikler fertilitiyi olumsuz etkileyerek infertiliteye neden olabilir (Ax ve ark., 2016; Nur, 2019). Bu nedenle, ejakülatın pH'sı, dayanıklılık ve temizliği ile ilişkili değerlendirmeler hayvan sağlığı ve ejakülat kalitesi hakkında önemli bilgiler verir.

#### **pH:**

Ejakülat ortamında bulunan  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  gibi iyonlar birçok türün sperm motilitesini etkilemektedir (Pegg, 2002). Ayrıca, bazı sperma fonksiyonları bikarbonatlar ( $\text{HCO}_3$ ) tarafından aktive edilmektedir (Gagnon & de Lamirande, 2006). Biyokimyasal olarak  $\text{HCO}_3$ 'lar intraselüler pH değerini yükseltip  $\text{Ca}^{2+}$  ve cAMP'ı artıran olaylar zincirini başlatarak sperm motilitesini uyarır (Gagnon & de Lamirande,

2006; Ho & Suarez, 2001). Bu nedenle, ortamın pH değerinin sperm motilitesi ve canlı kalma süresi üzerine etkileri bulunur. Ayrıca, kontaminasyonun şekillendiği durumlarda pH etkilenir. Klasik olarak pH ölçümünde indikatör kağıdından faydalanılır. Boğa sperması nötre yakın 6,9 pH değerine sahiptir.

### **Dayanıklılık Testi:**

Ortam sıcaklığı ile ilişkilendirilen ısıya dayanıklılık testlerinde; taze veya dondurulmuş spermanın 5°C veya 40-44°C gibi farklı ısılarda ne kadar sürede motilite ve morfolojik bütünlüğünü koruduğunu belirlemek amacıyla gerçekleştirilir. Bu testler, hücre membranının geçirgenliği ve dondurma sırasında kullanılan kriyoprotektanlardan kaynaklanan ozmotik farklılıklara karşı dayanıklılığı ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilmektedir (Guthrie, Liu, & Critser, 2002). Bu testlerin hedeflerinden bir tanesi de hipoozmotik veya hiper ozmotik ortama maruz kalan bir spermatozoitin tekrar izoozmotik ortama alındığında fonksiyonel bütünlüğünü sürdürüp sürdüremediğinin değerlendirilmesidir.

### **Metilen Mavisı Redüksiyon Testi:**

Spermatozoa, ortamda bulunan fruktozu hücre içine alarak enerji üretiminde (fruktolizis) kullanır. Fruktolizis sonrası hidrojen (H) açığa çıkar. Aerobik ortamda H, oksijen (O) ile birleşerek su ve laktik asit oluşmaktadır. Metilen mavisı bulunan anaerobik bir ortamda ise fruktolizis sonrası oluşan H, metilen mavisini redükte ederek löko metilen mavisı gözlemlenmektedir. Metilen mavisinin redüksiyon hızının değerlendirildiği bu testte metilen mavisı redüksiyon hızı 3-6 dk (normal), 6-9 dk (şüpheli) ve 9 dk'dan uzun ise sperm fruktolizis hızı düşük olup çoğu spermatozoitin inaktif olduğuna işaret eder (İleri ve ark., 1998).

### **Katalaz Deneyi:**

Bakteri, kan, irin, dışkı gibi sperma kirleticileri boğanın genital kanalı, vücut yüzeyi ve çalışma ortamından köken alır. Katalaz deneyi, boğanın cinsel sağlığı ve

sperma alırken kontaminantların spermaya bulaşıp bulaşmadığının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmektedir. Hemen hemen bütün vücut hücrelerinde bulunan katalaz enzimi hidrojen peroksiti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) parçalar. Eğer ortamda kirletici ve piyojen etkenler varsa aşırı bir reaksiyon meydana gelerek aşırı gaz çıkışı gözlemlenmektedir. Çıkan gaz miktarının ölçülmesi temeline dayanan bu testte bir skalaya sahip katalaz deney tüpleri kullanılır. Yirmi dakika sonra deney tüpündeki skaladan reaksiyon sonucu açığa çıkan gaz miktarı ölçülür. Ölçülen değer 300'e kadar temiz, 300-400 arasında ise şüpheli kabul edilmektedir. Bu değer 400'den büyük olması ise spermada kontaminasyonun meydana geldiğini göstermektedir (İleri ve ark., 1998).

#### **2.2.1.4. Spermanın Mikrobiyal Muayenesi**

Hem dişi hem de erkek reproduktif sistemini etkileyen bakteriyel, protozoon, viral ve mantar kökenli enfeksiyöz hastalıklar; erken embriyonik ölüm, abort, ölü doğum ve premature doğumlara neden olur. Bu nedenle, hayvancılık alanında venereal kontaminasyonların önüne geçmek için donörler belirli aralıklarla kan, kan serumu, prepusyal yıkantı ve sperma gibi örnekleri alınarak sağlık taramasından geçirilmektedir (İleri ve ark., 1998). Donör hayvanların ejakülatlarının fiziksel ve mikrobiyolojik muayenesi, hayvanın daha önce geçirmiş veya geçirmekte olduğu enfeksiyöz, metabolik ve travmatik hastalıklar ile gelecekteki verimlilik durumu hakkında genel bir ön bilgi vermektedir (İleri ve ark., 1998).

Genital kanal enfeksiyonları, erkek infertilitesinde sadece sperm hücresi fonksiyonuna değil, tüm spermatogenezise etki eden en önemli nedendir (Henkel & Schill, 2009). Spermatogenezisin bozulması, seminal kanal daralmaları ve spermatazoon fonksiyonlarının hasara uğraması sonucu mikrobiyal ajanlara karşı hücrel reaksiyonlar veya seminal plazmada akyuvarların aktivasyonuna da neden olur (Keck, 1998). Birçok araştırma, genital kanal enfeksiyonlarının erkek fertilitasını etkilediğini ortaya koymuştur (Haidl, 1990). Genital kanaldaki mikroorganizmaların neden olduğu invazyonlar oksidatif strese ve pro-inflamatuvar sitokinlerin oluşmasına neden olmaktadır (Naz & Evans, 1998; Sanocka, Frączek, Jędrzejczak, Szumała-Kąkol, & Kurpisz, 2004; Simon & Polan, 1994). Yüksek seviyede ROS sperm fonksiyonlarını olumsuz etkileyerek infertiliteye yol açar (Gil-Guzman ve ark., 2001;

Reda, Almaw, Abreha, Tadeg, & Tadesse, 2020). Mikroorganizmaların neden olduğu yangısal değişimler motil spermatozoonun aglütinasyonuna (Monga & Roberts, 1994), akrozom ve sperm hücre morfolojisinde geriye dönüşümsüz değişimlere neden olmaktadır (Köhn ve ark., 2009).

Ejekülattaki bakteri prevalansı sperm hareketliliğini, yaşayabilirliğini ve morfolojisini etkiler (Reda ve ark., 2020). Taze boğa ejakülata 4-5 logs CFU/mL düzeyinde mikroorganizma bulunabilir (Thibier & Guerin, 2000). *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter* ve *Stenotrophomonas* türleri boğa spermasında en sık görülen kirleticilerdir (Reda ve ark., 2020). Çoğu ortam kirleticileri olan bu mikroorganizmalar erkek genital kanalından da kaynaklanabilir.

#### **2.2.1.5. Spermanın Potansiyel Fertilitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Fonksiyon Testleri**

Damızlık amacıyla kullanılan bir boğa kısa bir dönem içinde doğal aşım veya suni tohumlama yolu ile çok sayıda dişiyi tohumlar. Bu nedenden dolayı, sahada boğanın fertilite yeteneği ineklerin fertilite yeteneğinden çok daha fazla öneme sahiptir. Spermatozoitlerin zamana bağlı oluşan yıkımların yanında, dişi immün sistemine direnç göstererek kendini koruması, aynı ejakülatta bulunan diğer spermatozoonlar ve başka ejakülata veya bireylere ait spermatozoonlarla da yarışması ve fertilizasyon bölgesine önce ulaşarak oositi fertilize etmesi gerekir (William, & Fazeli, 2016; Moore & Hasler, 2017; Staub & Johnson, 2018). Aktif bir hücre çekirdeği ve organelleri bulunan spermatozoon, biyosentez, kendini onarma, büyüme, bölünme ve yenilenme yeteneği olmaksızın, fertilizasyon aşamasına kadar uzun süre fizyolojik aktivitesini korumak zorundadır (García-Vazquez ve ark., 2016; William, & Fazeli, 2016).

Rutin sperma analizleri, fertilite hakkında önemli bilgiler vermesine rağmen, bazen fertilite ile çelişebilmektedir, bu problem floresan boyalar, spermatozoon-oosit bağlanma testi ve hipoozmotik şişme testi gibi fonksiyon testlerinin uygulanmasıyla büyük ölçüde çözülebilmektedir (Nur ve ark., 2012; Rodriguez-Martinez, 2014).

Fertilite yeteneği tek bir teste dayandırılarak tahmin edilemediğinden, hücrenin yapısal, biyokimyasal ve metabolik ayrıntılarını ya da membran işlevselliği açısından çevre ile etkileşim yeteneğini ortaya koymak için birtakım testler ile desteklenmesi gerekir. Yoğunluk, morfoloji ve motilite gibi standart sperma değerlendirmede kullanılan klasik spermatolojik testler, spermatozoonun görünümü ve viabilitesindeki temel değişimleri basit bir şekilde ortaya koymaktadır (García-Vazquez ve ark., 2016; Vincent ve ark., 2014). Ancak, spermatozoonun fizyolojik bütünlüğünün bir göstergesi olan hücrenin hareket şekli, spermanın dişi kanalda ilerleme gücü, oosite bağlanma ve hücrenin donma yeteneği gibi testler mutlaka dikkate alınmalıdır (Gagnon & de Lamirande, 2006; Murphy ve ark., 2018).

Spermadan ileri gelen fertilite düşüklükleri de kendi içinde, (i) tohumlama dozundaki spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanabilen nedenler ve (ii) karşılanamayan nedenler olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir. Tohumlama dozundaki spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanabilen nedenler spermatozoitin dişi genital kanalda ilerleme yeteneği ve yaşama süresi ile ilgilidir. Toplam motil spermatozoit sayısı, viabilite yeteneği ve morfolojik bütünlüğün devamlılığı ile ilişkili olan faktörlerdir. Spermatozoon sayısının artırılması ile karşılanamayan enzimatik, morfolojik ve DNA bozuklukları gibi nedenler ise, fertilizasyon ve daha çok erken embriyonik ölümlerle ilgilidir (Saacke, 2008; Nur, 2019).

Spermanın fertilite gücünü tahmin etmek amacıyla çok sayıda teknik geliştirilmiştir. Bu testlerin çoğu motilite, membran bütünlüğü, metabolik aktivite, hücre içi maddelerin salınımı ve servikal mukus veya ovuma bağlanma gibi hücrenin motor sistemi, metabolizması ve membran bütünlüğü ile ilgilidir (Ax ve ark., 2016; Bedasa ve ark., 2017).

## 2.3. Sperma Kirleticileri ve Biyogüvenlik

### 2.3.1. Sperma Kirleticilerinin Ortamdan Uzaklaştırılarak Fertil Spermatozoonların Ayrıştırılması

Genital kanal enfeksiyonları, erkek infertilitesinde sadece sperm hücresi fonksiyonuna değil, tüm spermatogenezise etki eden en önemli nedendir (Henkel & Schill, 2009). Spermatogenezisin bozulması, seminal kanal daralmalarına neden olması ve spermatozoon fonksiyonlarının hasara uğraması sonucu mikrobiyal ajanlara karşı hücrel reaksiyonların gelişmesine veya seminal plazmada akyuvarların aktivasyonuna neden olur (Keck, 1998). Birçok araştırma, erkek fertilitesinde genital kanal enfeksiyonlarının etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (Haidl, 1990). Mikroorganizmaların neden olduğu yangısal değişimler motil spermatozoonların aglütinasyonuna (Monga & Roberts, 1994), akrozom reaksiyonunun gerilemesine (Köhn ve ark., 2009) ve sperm hücre morfolojisinde geriye dönüşümsüz değişimlere neden olmaktadır. Genital kanaldaki mikroorganizmaların neden olduğu invazyonlar oksidatif strese ve proinflamatuvar sitokinlerin oluşmasına neden olmaktadır (Naz & Evans, 1998; Sanocka ve ark., 2004; Simon & Polan, 1994). Bu nedenle, sperma alınırken veya dondurma işlemleri sırasında hijyenik tedbirler alınmalı ve kontaminasyon kaynaklarına dikkat edilmelidir. Yardımcı üreme teknikleri kullanılırken spermadan ileri gelebilecek kontaminantları elimine etmek ve kaliteli sperma kullanılmasını sağlamak için percoll gradient, swim up, swim down ve glasswool gibi çok sayıda yıkama veya sağlıklı sperm hücrelerini ayırma metotları geliştirilmiştir (Marti, Perez-Pe, Muino-Blanco, & Cebrian-Perez, 2006). Yardımcı üreme tekniklerinde sağlıklı sperm hücresi kullanımı başarı oranını önemli oranda artırmaktadır. Bu metotların etkinlikleri ile ilgili çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Batista ve ark., 2011; Bisla, 2020; Marti ve ark., 2006; Yamanaka ve ark., 2016).



## **Percoll Gradient**

Sperma seperasyon yöntemlerinden biri olan Percoll, temel olarak dansite farklılığı esasına dayanır (Bolton & Braude, 1984). Normal morfolojiye sahip sağlıklı bir spermatozoon, ejakülat içerisinde dansitesi en yüksek olan yapıdır. Bu nedenle, hazırlanmış konik tüpün en alt kısmında, gradienti en yüksek olan sperm hücreleri toplanır. Percoll PVP ile kaplanmış 15-30 nm çapında kolloidal silika partiküllerini içeren bir solüsyondur. Bu solüsyondan yoğunluğu 1,0-1,3 gr/mL arasında olacak şekilde gradientler (katmanlar) oluşturulabilir, percoll yoğunluk-gradient (katman) yöntemiyle sperma içindeki yabancı partiküllerden (bakteri ve hücre parçaları) ve ölü spermatozoonlardan arındırılır. Ancak, percollün bazı endotoksik etkilerinin bulunması nedeniyle beşeri tıpta klinik kullanım alanının kaldırıldığı bildirilmiştir (Chen & Bongso, 1999).

## **Swim-Up**

Bu yöntemde esas amaç, hareketli sperm hücrelerinin hareketsiz olanlardan ayrılmasını sağlamaktır. Swim-up prosedüründe genellikle çözündürülmüş payet içeriğinin üzeri uygun miktarda bu yöntem için hazırlanmış vasat ile kaplanır. Motil durumdaki sperm hücreleri hareket ederek vasat içerisine geçerler. Bu yolla motilitesi çok iyi olan sperm hücrelerinin elde edilmesi mümkün olmakla birlikte, elde edilen sperm hücre miktarının az olacağı gerçeği özellikle pahalı spermanın kullanıldığı durumlarda göz ardı edilmemelidir (Gordon, 2003). Dondurulmuş spermanın motilitesi genel olarak değişkenlik gösterir. Swim-up prosedürü dondurulmuş boğa spermasında, çözündürme sonrası görülen motilite farklılıklarını ortadan kaldırarak yüksek motiliteye sahip sperma eldesini sağlar.

## **2.4. Spermanın Saklanması**

Diğer hayvancılık alanlarında olduğu gibi sığırcılık alanında da genetik materyalin korunması ve verim özelliği yüksek olan bireylerden daha fazla yararlanabilmek için, spermanın dondurulması, spermanın liyofilizasyonu, embriyo transferi, *in vitro* fertilizasyon, *in vitro* maturasyon, klonlama ve intrasitoplazmik

sperm enjeksiyonu gibi diğerk yardımcı üreme tekniklerinden de faydalanılmaktadır (İleri ve ark., 1998; Nur, 2019). Spermanın dondurulması yabani ve evcil hayvanlarda olduğu kadar insanlarda da yardımcı üreme tekniklerinin yaygınlaşmasını ve uygulanabilirliğini artırmıştır. Çoğu memelide spermanın sıvı nitrojen (-196°C) ile dondurularak saklanması başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Donmuş sperma ile yapılan suni tohumlama uygulamalarından elde edilen başarı oranları her geçen yıl artmış ve günümüzde taze sperma ile yapılan tohumlama sonuçları ile karşılaştırılabilecek seviyeye ulaşmıştır (Vishwanath & Shannon, 2000; Watson, 2000).

Günümüzde gamet hücrelerinin saklanması, 5°C’de sıvı saklama, dondurma ve liyofilizasyon olmak üzere başlıca üç yöntem kullanılmaktadır (Ax ve ark., 2016). İlk iki yöntemde (5°C’de sıvı saklama ve dondurma) spermanın yaşamsal fonksiyonlarını saklama sıcaklığı, soğutma/çözündürme hızı, sulandırıcının kimyasal bileşenleri ve kullanılan kriyoprotektan maddeler etkiler (Ax ve ark., 2016; İleri ve ark., 1998; Nur, 2019). Sıvı saklama yöntemi olarak da adlandırılan 5°C’de sıvı saklama yönteminde, spermayı sulandırdıktan sonra, 5°C’deki düşük ısıda saklama esasına dayanır. Sıvı saklama yönteminde, sperma yaşamsal aktivitesini ancak 2-3 gün koruyabilmektedir (Hafez, & Hafez, 2020; İleri ve ark., 1998; Nur, 2019). Dondurma yönteminde ise, sperma daha düşük ıslarda saklanır. Dondurma yöntemi, spermayı soğuk şokunun etkilerinden koruyan kriyoprotektan maddeler içeren sulandırıcılarla sulandırılan spermanın, ampul (etil alkol banyosunda), pellet (-79°C kuru buzda) veya payet (-110°C sıvı azot buharında) yöntemiyle dondurularak -196°C’de saklanması temeline dayanmaktadır (Hafez, & Hafez, 2020; İleri ve ark., 1998; Nur, 2019). Dondurma yönteminde uygun saklama koşulları sağlanması halinde sperma potansiyel fertilitasını yıllarca korur (Hafez, & Hafez, 2020; İleri ve ark., 1998; Nur, 2019).

Yaygın bir şekilde kullanılan dondurma yönteminde sperma, soğutma ve dondurma prosedürü ne kadar optimize edilirse edilsin, başlangıç motilitesinin %20-%70’ini kaybeder (Watson, 2000). Dondurma-çözündürme işlemleri diğerk memeliler gibi boğa spermasının morfolojisini, biyokimyasını ve işlevini olumsuz yönde etkiler (Hafez, & Hafez, 2020; İleri ve ark., 1998; Nur, 2019). Bu olumsuz değışiklikler motilitenin düşmesine, spermanın dişi genital kanalda migrasyon yeteneğinin

azalmasına ve suni tohumlama sonrası fertilite oranının düşmesine neden olmaktadır (Salamon & Maxwell, 1995).

Spermanın sıvı içeriğinin soğuk ortam ve basınç altında uzaklaştırılması ile karakterize liyofilizasyon işleminde ise, spermatozoonun genetik materyali etkilenmeksizin motilite yeteneğini ve morfolojik bütünlüğünü kaybeder. Diğer bir deyişle liyofilize edilmiş spermanın *in-vivo* ve *in-vitro* koşullarda oositi fertilize etme yeteneği bulunmamaktadır. Bunun için spermanın özel ekipmanlarla intrasitoplazmik enjeksiyonunun yapılması gerekmektedir (Hafez, & Hafez, 2020).

#### **2.4.1. Sperma Sulandırıcıları ve Kriyoprotektif Maddelerin Etkileri**

Soğutma ve donma aşamalarında soğuk ortamdaki kaynaklanan zararlı etkilere karşı hücreyi koruma, metabolik artıkları elimine etme, enerji gereksinimini karşılama gibi amaçlarla sperma sulandırılmak zorundadır (Hafez, & Hafez, 2020; İleri ve ark., 1998). Kaliteli bir sperma sulandırıcısı spermatozoitler için gerekli olan enerji gereksinimini karşılamalı, uygun bir ozmotik basınç ve elektrolit denge sağlamalı, bakteriyel üremeyi kontrol etmeli, spermayı soğuk şokuna karşı korumalı ve ortamın pH değerini dengeleyebilmelidir (Nur, 2019).

Sperma sulandırıcıları ve içerdikleri maddeler, spermanın çözündürme sonrası fertilite yeteneğini koruması üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Holt, 2000; İleri ve ark., 1998; Nur, 2019; Vishwanath & Shannon, 2000). Çözündürme işleminden sonra sperm kalitesini artırmak için sperm sulandırıcılarında çeşitli maddeler kullanılmaktadır. Enerji kaynağı olarak fruktoz ve glukoz, ozmotik basınç ve hidrojen iyon konsantrasyonunu ayarlamak için pH tamponlayıcı maddeler (sitrat, tris, fosfat ve sitrik asit gibi), membran koruyucu olarak hücre zarını geçebilme özelliğine sahip internal kriyopektanlar (gliserol, etilen glikol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve amid türevi kriyopektanlar) kullanılmaktadır (Aisen ve ark., 2000; Storey, Noiles, & Thompson, 1998; Woelders, Matthijs, & Engel, 1997). Bunlara ek olarak membranların sıvı ve katyonlara karşı geçirgenliğinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranlarının esnek hale getirilmesinde rol oynayan polietilen glikol, dekstran, BSA gibi makromoleküller ve glukoz, sükroz, trehaloz ve rafinoz gibi sakkaritler, yumurta

sarısı, süt, lipitler gibi membran stabilizatörleri ve antifriz proteinler eksternal kriyopektanlar olarak sulandırıcılara eklenmektedir (Aisen ve ark., 2000; Fiser, Ainsworth, & Fairfull, 1987; Salamon & Maxwell, 1995).

Spermaların dondurulmasında donma işleminden kaynaklanan olumsuz etkilere karşı suyun fizikokimyasal yapısını değiştirerek korumak ve oluşacak hasarı en aza indirebilmek amacıyla hücrelerin bulunduğu ortama kriyoprotektan adı verilen bazı koruyucu maddeler ilave edilmektedir. Sulandırıcılarda kullanılan kriyoprotektan maddelerin etkisi, soğutma hızına ve türe bağlı olarak değişmektedir (Fiser ve ark., 1987). Gliserolün kriyoprotektif etkisi Polge, Smith, & Parkes, (1949) tarafından keşfedildikten sonra, uygun sulandırıcı geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Gliserol, hücre içine girebilen ve çoğu memeli spermasını dondurmak amacıyla sıklıkla kullanılan bir kriyoprotektandır (Hafez, & Hafez, 2020). Gliserol hücre içindeki suyu, hücre dışı ortamın yoğunluğunu arttırarak, dışarıya çıkarır, aynı zamanda ortamdaki suyu bağlayarak spermatozoonu soğüğün zararlı etkilerinden koruyan gliserol, sperm motilitesini, fertilite yeteneğini ve DNA bütünlüğünü düşürür (Nur, Zik, Ustuner, Sagirkaya, & Ozguden, 2010). Fiser ve ark., (1987) gliserollü sulandırıcı ile sulandırma yönteminin çözündürme sonrası motilite ve akrozomal bütünlüğü etkilediğini bildirmiştir. Aynı zamanda, gliserolün sperm akrozom bütünlüğünü etkilediği ve akrozom reaksiyonunu başlattığı da bildirilmiştir (Abdelhakeam, Graham, Vazquez, & Chaloner, 1991).

Gliserolün sperma üzerine olan sitotoksik etkisinden dolayı, çözündürme sonrası başarıyı arttırmak amacıyla dondurma esnasında oluşan buz kristallerini hacmen küçültmek ve spermaya karşı zararlı etkisini minimize etmek amacı ile hücre içine girebilen ve hücre zarını geçemeyen çok sayıda farklı etkiye sahip kriyoprotektan madde kullanılmıştır (Fiser ve ark., 1987; Nur ve ark., 2010; Nur ve ark., 2011; Salamon & Maxwell, 1995). Ayrıca, kriyoprotektan madde miktarını düşürerek, hatta kullanmaksızın buz kristallerinin oluşumunu kontrol etmek için multi termal gradient tekniği (Directional Freezing) ile gamet hücrelerinin dondurulmasına yönelik çalışmalar da yürütülmektedir (Arav & Natan, 2012).

Gliserol ve polyoller hücre zarındaki lipitlerin yapısında bulunan polar kısımlarla hidrojen bağı oluşturarak özellikle düşük ısılarda ve hızlı soğutma esnasında şekillenen mekanik basıncı azaltarak hücreyi yapısal deformasyonlara karşı suyun zararlı etkilerinden korurlar. Yapılan çalışmalarda, 0,2 M sükroz veya trehalozun sığır spermatozoitlerinin dondurma çözündürme sonrası yaşam süresini önemli oranda arttırdığı saptanmıştır (Woelders ve ark., 1997). Sığır spermasını gliserol içermeyen sulandırıcı ile donduran De Leeuw, De Leeuw, Den Daas, Colenbrander, & Verkleij, (1993), çözündürme sonrası morfolojik bütünlüğün korunduğunu, %6 gliserol yerine %6 1,2 propanediol'ün motilite oranını azalttığını ve 62,5 mM sükrozun ise bir miktar artırdığını saptamışlardır. Anılan yazarlar, ayrıca yumurta sarısının motilite oranını artırdığını bildirmiştir.

#### **2.4.2. Spermanın Dondurulması ve Çözündürülmesi**

Dondurma ve çözündürme spermanın morfolojisini, biyokimyasını ve fonksiyonunu olumsuz yönde etkiler. Bu olumsuz değişiklikler motilitenin düşmesine, spermanın dişi genital kanalda migrasyon yeteneğinin azalmasına ve suni tohumlama sonrası fertilite oranının azalmasına neden olur (Watson, 2000). Dondurma/çözündürme hücre organellerindeki çözeltilerin yoğunluğunun artmasına, hücresel su kayıplarına, buz kristallerinin oluşumuna ve bu kristallerin çözülmesine bağlı olarak hücre organellerinde çeşitli hasarlara yol açar (Gilmore, 2000; Larson, 2000; Ritar, Ball, & O'May, 1990). Sperm hücreleri içindeki suyun kristalleşmesini önlemek amacıyla Ampul, Pellet ve Payet yöntemi gibi dondurma yöntemleri kullanılmaktadır (Noakes, Timothy, & England, 2001).

Seri üretime uygunluğu, saklama kolaylığı, yüksek gebelik oranları gibi birçok avantaja sahip olmasından dolayı, payet metodu ile dondurma tekniği tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat yüksek yüzey ve hacim oranından dolayı payetler sıcaklık değişimlerine karşı çok hassastırlar. Bu nedenle, donmuş spermanın fertilizasyon yeteneği çözündürme protokolü ve süresinden fazlasıyla etkilenir (Nur, & Soylu, 2003; Senger, 1980). Çözündürme prosedürü spermatozoonun canlılığını sürdürmesi açısından dondurma prosedürü kadar önemlidir (İleri et al., 1998). Sıcaklıktaki değişim, dondurma ve çözündürme sırasında yapısal, biyokimyasal ve

fonksiyonel hasarlara neden olmakta ve motil spermatozoon oranını kaçınılmaz şekilde azaltmaktadır (Senger, 1980). Bu nedenle, dondurulmuş spermanın en ideal çözündürme teknikleriyle ilgili çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir (Güney & İleri, 1991).

### **2.4.3. Çözündürme Sıcaklığının Sperma Üzerine Etkileri**

Spermatozoonların yaşama yetenekleri ve morfolojik bütünlüklerinin korunmasında çözündürme işleminin ayrı bir yeri ve önemi vardır (Hafez, & Hafez, 2020; İleri ve ark., 1998). Bunun nedeni spermanın fizikokimyasal yapısının hem donma hem de çözündürme işlemleri sırasında şekillenen buz kristalleri nedeniyle zarar görmesidir (İleri ve ark., 1998; Woelders ve ark., 1997).

Günümüzde değişik sulandırıcı ve dondurma yöntemleri uygulanarak (Payet, pellet) sperma dondurulmaktadır. Pratikte kullanılabilirliği en uygun olan payet yöntemi yaygınlaşmıştır. Payetlerin hacim/yüzey alanı oranı oldukça yüksektir. Bu nedenle ısı değişikliğine karşı oldukça duyarlıdırlar (Senger, 1980). Çözündürme sıcaklığının yükseltilmesi ile çözündürme hızının arttığı ve dolayısıyla canlı hücre sayısının olumlu yönde etkilendiği saptanmıştır (Güney & İleri, 1991; Senger, 1980). Saha koşullarında spermanın 35°C'de çözündürülmesi, spermanın canlılığını daha uzun süre korumaktadır. Yüksek ısılarda çözündürme tekniği canlılık oranını artırırsa da kritik sürenin aşılması halinde kitlesel spermatozoon ölümlerine yol açtığından daha risklidir (Güney & İleri, 1991; İleri & Ak., 1993; Senger, 1980). Sperma vücut sıcaklığındakindeki su, hava, cep ve dişi genital kanal vb. değişik ortamlarda çözündürülerek farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Akmal, Anwar, Mehmood, Andrabi, & Lal, 2015; Barth & Bowman, 1988; Correa, Rodriguez, Patterson, & Zavos, 1996). Bu çalışmalar içinde en kullanışlı ve en yüksek gebelik oranının vücut sıcaklığındakindeki suda elde edildiği bildirilmiştir (Correa ve ark., 1996; Hafez, & Hafez, 2020).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Materyali

Çalışmada Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından payet yöntemine göre dondurulmuş Brown Swiss (İsviçre Esmeri) ırkına ait spermalar kullanılmıştır. Bireysel ve ejakülatlar arası farklılığın oluşmaması için çalışmada tek bir boğanın çoklu ejakülatlarından elde edilen payetler; Percoll, Swim-up ve Kontrol grubu olmak üzere toplam üç grup olmak üzere, herbir grup 37°C’de 30 saniye (sn.), 50°C’de 15 sn. ve 70°C’de 5 sn. çözündürme sıcaklık ve sürelerinde çözündürme sonrası değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışma grupları Tablo 2’de sunulmuştur.

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 2.** Çalışma Grupları

ÇALIŞMA GRUPLARI		
Percoll	Swim-up	Kontrol
37°C/30 sn.	37°C/30 sn.	37°C/30 sn.
50°C/15 sn.	50°C/15 sn.	50°C/15 sn.
70°C/5 sn.	70°C/5 sn.	70°C/5 sn.

#### 3.2. Spermının Çözündürülmesi

Konteyner sıvı azot seviyesi çalışma boyunca korunmuştur. Payetler kanisterden maksimum 10 sn. içinde alınarak hızlıca çözündürme kabına aktarılmıştır. Sperma 37°C/30 sn, 50°C/15 sn ve 70°C/5 sn olmak üzere üç farklı ısıdaki su banyosu içerisinde çözündürülmüştür (Nur, & Soylu, 2003). Percoll, Swim-up ve Kontrol gruplarında her bir çözündürme sıcaklığı için 15 payet olmak üzere toplam 135 payet çalışmada kullanılmıştır.

### **3.3. Spermatojik Özelliklerin İncelenmesi**

Donmuş spermaların spermatojik özellikleri, çözündürmeyi takiben Percoll ve Swim-up yöntemi sonrası ve kontrol grubu olarak herhangi bir ayırıştırma işlemi kullanılmayan grup olmak üzere üç grup üç farklı çözündürme sıcaklığı ve süresi açısından incelenmiştir. Bu amaçla; çalışmada incelenen spermatojik özellikler olarak sperm motilitesi, akrozom ile plazma membran bütünlüğü ve canlı spermatozoa oranı belirlenmiştir.

#### **3.3.1. Motilite**

Sperma çözündürme işlemini takiben, Percoll ve Swim-up yöntemi sonrası ve kontrol grubu için herhangi bir işlem uygulamadan ısıtılmış lam üzerine bir damla sperma örneği damlatılıp, üzeri lamel ile kapatılmıştır. Motilite kontrol yönteminin subjektif olması ve muayene eden kişiler arasında farklılık oluşmaması amacıyla 400× büyütmede ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta motilite değerlendirmesi tek bir kişi tarafından yapılmıştır. Motilite değerlendirilmesi ileriye doğru hareket eden spermatozoitler göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Aynı preperatta 3 değişik saha incelenerek yüzde ortalamaları kaydedilmiştir.

#### **3.3.2. Akrozom Bütünlüğü (FITC-Pisum sativum agglutinin: FITC-PSA)**

Akrozomal yapının belirlenmesi için Kawakami, Vandervoort, Mahi-Brown, & Overstreet, (1993) tarafından gerçekleştirilen çalışmada kullanılan FITC-PSA yöntemi kullanılmıştır. Kısaca, spermadan frotiler hazırlanarak havada kurutulmuştur. Daha sonra, kurutulan frotiler, 4°C sıcaklıkta aseton ile 10 dakika tespit edilip, karanlıkta 30 dakika FITC-PSA (50 µg/ml fosfat buffer solüsyonu içeren) ile boyanmıştır. Boyama



işleminde sonra, frotiller fosfat buffer solüsyonu ile yıkayıp gliserol ile kaplanarak floresan mikroskop altında incelenmiştir. Akrozomun tamamı yeşil görünen spermatozoitler sağlam olarak değerlendirilmiştir. Her bir preparattan en az 100 spermatozoit incelenerek sağlam akrozoma sahip spermatozoit oranı yüzde (%) belirlenmiştir.

### **3.3.3. Plazma Membran Bütünlüğü (Hypoosmotic Swelling Test=HOST)**

HOST için ilk önce 100 mOsm'lik sodyum sitrat-fruktoz hipotonik solüsyonu 1,351 g D (-) Fructose reinst ( $C_6H_{12}O_6$ ) + 0,735g Tri-Natriumcitrat-dihidrat reinst + 155 ml distile su ile hazırlanmıştır (Correa ve ark., 1996). Hazırlanan solüsyonun ozmolaritesi ozmometre cihazı ile ölçülerek 100 mOsm olacak şekilde ayarlanmış ve kapalı bir kaptaki kullanım zamanına kadar buzdolabı koşullarında saklanmıştır. Bu solüsyon en fazla üç gün süreyle kullanılmıştır. HOST muayenesi yapılmadan önce, bu solüsyondan 1 ml alınarak 37°C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirilen cam tüplere aktarılarak tüplerdeki solüsyonların ısınması beklenmiştir. Mikropipet yardımı ile çözündürülmüş spermadan 20 µl alınıp içinde 1 ml HOST medyumunda bulunan tüplere aktarılmıştır. Tüpler 37°C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat inkübe edildikten sonra, HOST incelemeleri yapılmıştır. İnkübasyon sonrası lam üzerine bir damla örnek aktararak üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparat faz kontrast mikroskopta 1000 büyütmede incelenmiştir (Correa, Heersche, & Zavos, 1997; İleri ve ark., 1998). İncelemede kuyruk kısmı şişmiş olan hücreler değerlendirilmiştir (Şekil 2). Spermatozoon kuyruğunun fibril kısmını kaplayan hücre zarı, baş kısmına göre daha gevşektir. Bu nedenden dolayı kuyruk kısmı diğer bölgelere göre daha bariz şekilde şişer. Kıvrılma plazma membranının şişmesinden ileri gelir. Düşük ozmotik basınca sahip ortamlarda, kimyasal ve fiziksel yönden sağlam spermatozoonun kuyruk kısmında şişmeler oluşurken, sağlam olmayan hücrelerde bu reaksiyonlar görülmez (Van Der Ven ve ark., 1986). Her preparattan toplam 200 hücre sayılarak yüzde değerleri kaydedilmiştir (İleri ve ark., 1998)

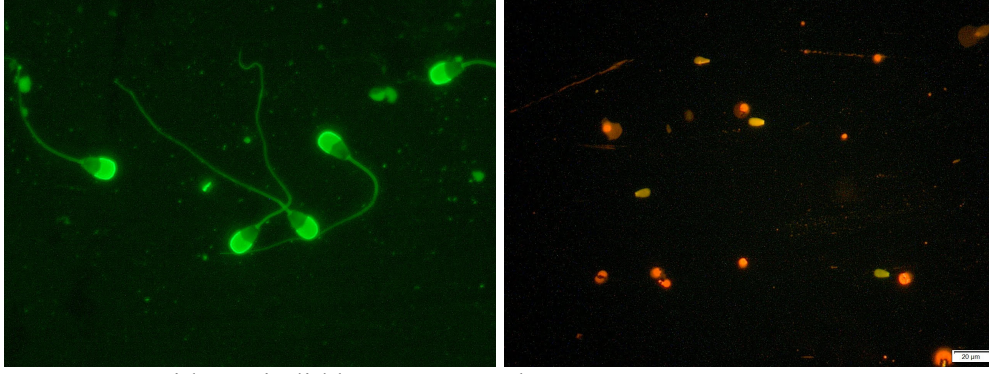


**Şekil 2.** Plazma Membran Bütünlüğü Sağlam spermatozoaların kuyruk kısımlarında düşük ozmotik basınca bağımlı olarak şişmeler gözlemlenirken sağlam olmayan hücrelerde bu durum gözlemlenmemektedir.

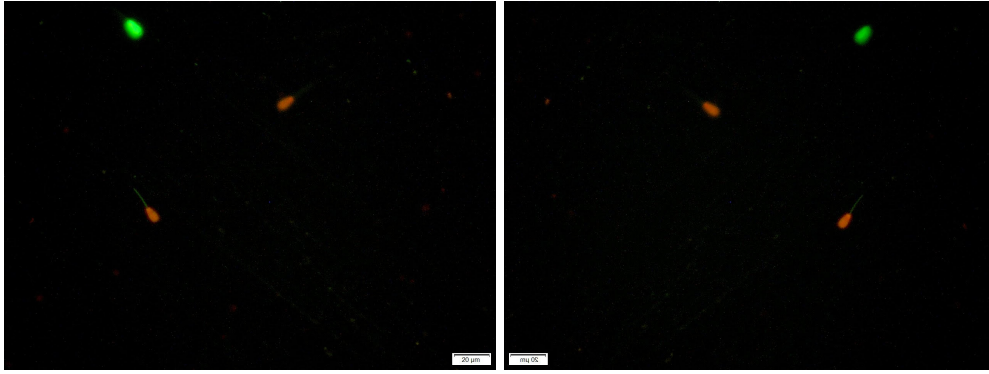
### 3.3.4. Canlı Spermatozoon Oranının Belirlenmesi

Sperm canlılığı, SYBR-14 ve propidium iodide (PI: Canlı/Ölü Sperm Viabilite Kiti [L-7011], Invitrogen–Molecular Probes) floresan boyaları kullanılarak belirlenmiştir. Üretici firmanın kullanım talimatına göre protokol örnekleri 1 ml'den daha az PI olacak şekilde hazırlanmış ve modifiye edilmiştir.

Floresan boya solüsyonu; 980  $\mu$ l DMSO içine 20  $\mu$ l SYBR-14 ile sulandırılmış, ticari olarak temin edilen PI ise 1,6 mg/ml olacak şekilde kullanılmıştır. Hazırlanan floresan boya solüsyonları  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Boyama işlemine başlamadan önce, 10  $\mu$ l çözündürülmüş sperma 290  $\mu$ l fizyolojik tuzlu su ile konik bir santrifüj tüpüne alınmış ve üzerine 8 ml SYBR-14 solüsyonu konularak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi takiben 2  $\mu$ l PI santrifüj tüpü içerisine konularak 5 dakika karanlık bir yerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, karışımdan bir damla alınarak sürme froti hazırlanmış, hemen sonrasında çoklu floresan filtreli mikroskop (Olympus BX51, U-DM-DA/FI/TX2, 460-490 nm excitation ve 530 nm barrier, Japonya) altında incelenmiştir. Sperma canlılığı, froti üzerindeki sahada 100 sperm hücresi sayılarak değerlendirilmiştir. Kırmızı floresan renk veren hücreler ölü, yeşil floresan renk veren spermatozoonlar ise canlı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3 ve 4).



Şekil 3. Propidyum iodid boyama ve Sybr 14.



Şekil 4. Propidyum iodid boyama ve Sybr 14.

### 3.4. Spermatozoon Seperasyon Yöntemleri

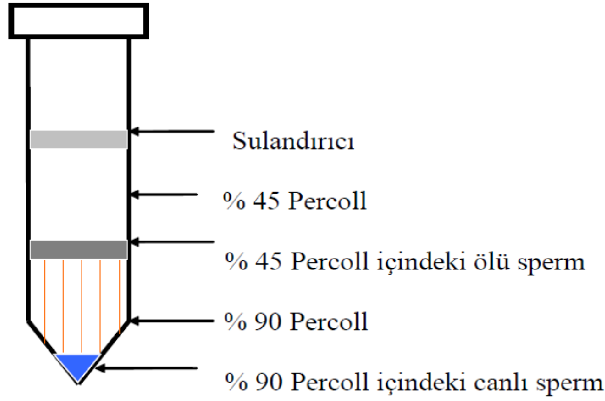
Çalışmamızda IVF çalışmalarında sıklıkla kullanılan Percoll ve Swim-up yöntemleri kullanılmıştır.

#### 3.4.1. Percoll

Percoll katmanları Parrish, Krogenaes, & Susko-Parrish, (1995)'in bildirdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. %90'lık Percoll solüsyonu HEPES-TALP (yıkama) medyumu ile aynı oranda (1:1) karıştırılarak %45'lik Percoll solüsyonu elde edilmiştir.

Bu amaçla, konik bir santrifüj tüpüne katman oluşturacak biçimde, %90'lık Percoll tabana ve bunun üzerine de birbirlerine karıştırmadan %45'lik Percoll eşit miktarlarda (15 ml'lik santrifüj tüpü için 1'er ml) konmuştur. En üst kısma da yine katman oluşturacak biçimde çözündürülmüş sperma dikkatlice ilave edilmiş ve dakikada 700 g'de 10-15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Ölü sperm hücreleri iki

Percoll katmanı arasında ve canlılarda tabanda şekillenen pelet içerisinde toplanmıştır (Şekil 5). Daha sonra santrifüj tüpünde sadece pelet bırakılacak şekilde diğer kısımlar pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Parrish, Krogenaes, & Susko-Parrish, 1995; Samardzija ve ark., 2006).



**Şekil 5.** Santrifüj İşlemini Sonrası Katmanların Görünümü

### 3.4.2. Swim-Up

Bir ya da iki payet 37°C'deki su banyosunda çözündürülmüştür. Daha sonra, 10 ml'lik konik deney tüpüne Sperm TL solüsyonu konulup, payet deney tüpünün dip kısmına kadar dikkatlice indirilerek, spermanın tüpün dip kısmına bırakılması sağlanmıştır. Konik deney tüpü 39°C'de su banyosunda yaklaşık 45°'lik bir eğimle 1 saat inkübe edilmiştir (Şekil 6). İnkübasyon işleminden sonra, süpernatant kısım dikkatlice başka bir deney tüpüne aktarılmış ve 120 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, pelet kısmı mikropipet yardımıyla kullanılmak üzere başka bir tüpe alınmıştır (Centola, Herko, Andolina, & Weisensel, 1998).



**Şekil 6.** İnkübasyon Sonrası Katmanların Oluşumu. Pelet kısmında motil olmayan spermatozoitler ve doku artıkları bulunurken, süpernatant kısmında motil spermatozoitler bulunmaktadır.

### 3.5. Thoma Lamı ve Sperm Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Toplam bölme alanı lamel ile kaplandığında 1 mm x 1 mm alanında ve 0,1mm derinliğinde olan Thoma lamının toplam bölme hacmi ise 0,1 mm<sup>3</sup> (0,1 ml)'dir. Bir bölme 25 eşit kareye bölünmüştür (0,004 ml) (Şekil 7). Sayılan küçük karelerin sayısı konsantrasyona bağlı olacak şekilde; numunenin konsantre olduğu durumlarda sadece 5 karenin sayılması (yaklaşık 110-200 sperm), konsantre olmadığı durumlarda ise, 25 karenin tümünün sayılması daha doğru olacaktır.

Sperm konsantrasyonu aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır;

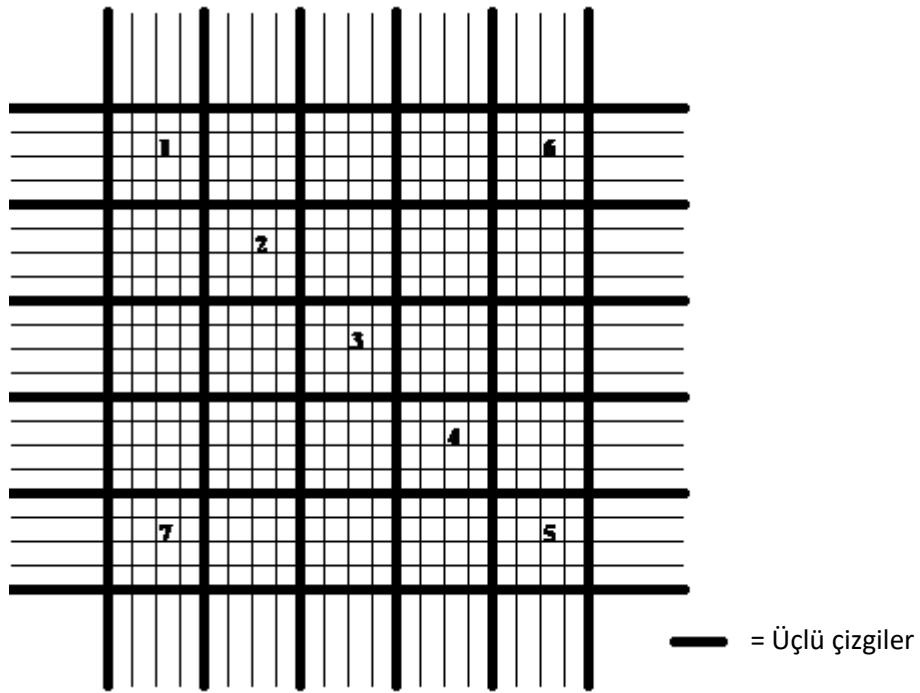
$$SS \times SO \times 50 = \text{sperm/mL}$$

(SS= 5 kare içerisindeki sayılan sperm X SO = sulandırma oranı X 50 = 1 mL / (5 X 0,004): eldeki hacmi ml bazında değere çevirmede kullanılır.)

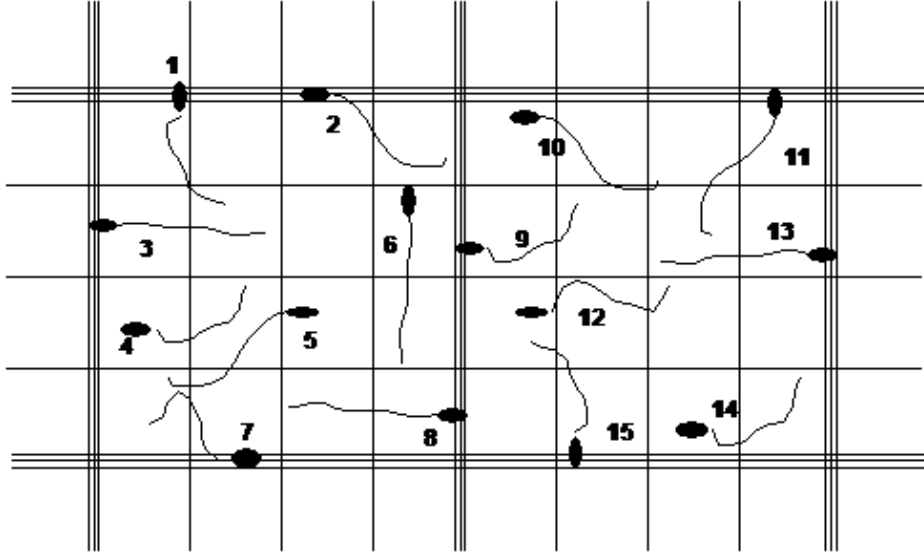
25 karenin sayıldığı durumlarda ise aşağıdaki formül kullanılmaktadır.

$$SS \times SO \times 10$$

Bu doğrultuda; kolay sayım için spermier 10 µl sperm + 190 µl H<sub>2</sub>O oranında sulandırılarak ölmeleri ve hareketsiz hale gelmeleri sağlanmıştır. Elde edilen karışım iyice karıştırıldıktan sonra, Thoma lamının her bir bölmesi 10 µl karışım ile doldurulmuştur. Ardından Thoma lamı mikroskoba yerleştirilerek en az 5 dk olacak şekilde beklenilmiştir. Faz kontrast mikroskopta ve 400X büyütmede her iki bölmedeki sperm hücreleri sayılmış ve ortalama değerler bulunmuştur. Mikroskop altında sayım Şekil 8'de gösterildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Böylece sınırlarda yer alan sperm hücrelerinin iki kez sayılmaması sağlanmıştır.



**Şekil 7.** Thoma lamından bir görünüm. Beş kare sayımı için 1, 2, 3, 4, 5 ya da 1, 6, 3, 7, 5 numaralı kareler sayılabilir.



**Şekil 8.** Sperm hücre sayım işlemi. 1. karede sayılacaklar: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9; 2. karede sayılacaklar: 10, 11, 12, 13, 14

### 3.6. İstatiksel Analizler

Grupların ortalamaları arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile araştırılmış ve farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını incelemek üzere Tukey HSD ve Games Howel çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Verilerin (oransal veriler hariç) karşılaştırılmasında, Tek yönlü varyans analizi gerçekleştirmek için normallik varsayımı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilk testleri kullanılmıştır. Varyansların homojenliği varsayımı Levene testi ile test edilmiştir. Oransal verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-kare testi kullanılmıştır. Önemlilik düzeyi olarak tüm analizler için  $p < 0,05$  seçilmiştir ve tüm istatistiksel analizler SPSS programından (version 20.0, SPSS Inc, USA) yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.7. Çalışmada Kullanılan Solüsyon ve Medyumların Hazırlanması

#### 3.7.1. Percoll gradient solüsyonunun hazırlanması

Hepes-TALP medyumunu ile Percoll (%90) solüsyonu Parrish ve ark., (1995)'nin bildirdiği biçimde hazırlanmıştır. 80 mM 10 x Percoll stok solüsyonunu aşağıdaki formüle göre hazırlanmış ve pH'sı 1 N NaOH ile 7,3'e ayarlandıktan sonra, filtre edilmiştir.

### **80 mM 10X Percoll Stok Solüsyonunun İçeriği**

<u>Tuz ve Diğerleri</u>	<u>Final mM</u>	<u>g/100 ml</u>
KCl	31	0,230
NaCl	800	4,675
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	0,035
Hepes	100	2,380

Sonrasında, %90'lık Percoll solüsyonunu hazırlama için, öncelikle 45 ml Percoll üzerine 5 ml önceden hazırladığımız 10X Percoll stok solüsyonu ilave edildikten sonra aşağıda belirtilen kimyasalları ilave edilmiştir.

### **%90'lık Percoll Solüsyon İçeriği**

<u>Tuz ve Diğerleri</u>	<u>Final mM</u>	<u>mg/50 ml</u>
CaCl <sub>2</sub>	2	14,5
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	0,4	4,0
Laktik asit (%60 şurup)	21,6	0,184 ml
NaHCO <sub>3</sub>	25	104,5

Ozmolarite spermin canlılığı ve fonksiyonu için hayati öneme sahiptir ve hazırlanan %90'lık Percoll solüsyonunun ozmolaritesi 280-300 mOsm arasında olmalıdır.

### **3.7.2. HOST Solüsyonunun Hazırlanması**

<u>Sodyum sitrat-fruktoz hipotonik solüsyonu</u>	<u>100 mOsm</u>
D (-) Fructose reinst (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1,351 gr
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat reinst	0,735 gr
Distile su	155 ml



### 3.7.3. Swim-up metodunda TALP medyumunun hazırlanması

Swim-up metodu için Jamil, Samad, Qureshi, Rehman, Lodhi, (2007) tarafından tarif edilen Tyrode'un albumin laktat piruvat (TALP) medyumunu aşağıdaki kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır.

#### TALP medyumunun içeriği;

<u>Tuz ve Diğerleri</u>	<u>Final mM</u>
NaCl	99 mM
KCl	3,1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,35 mM
Sığır serum albumini	6,0 mg/ml
Sodyum piruvat	1 mM
DL-Laktik asit	21,6 mM
Hepes	10 mM

### 3.7.4. TL Hepes (Yıkama) Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve İçeriği

<u>Tuz ve Diğerleri</u>	<u>Final mM</u>	<u>mg/100 ml</u>
NaCl	114	666
KCl	3,2	120
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0	150
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,5	50
NaHCO <sub>3</sub>	2	84
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,4	28
(ya da anhydrous)		(24)
Na-lactate (%60 şurup)	10	0,930 ml
Penicillin	100 i.u./ml	32,5
Phenol Red (P/R)	-	5
Hepes	10	1200

Yukarıdaki formülasyonda yer alan Ca ve Mg tuzları solüsyonun hazırlanması işleminde en son eklenmiş ve solüsyonun pH değeri 7,4'e ayarlanmıştır. Solüsyonun osmolarite değeri ise, 280-300 mOSM değeri baz alınarak kontrol edilmiştir. Bu işlemten sonra vasat, steril bir şişe içerisine filtre edilmiştir. Hazırlanan solüsyon 1-2 hafta süresince +4°C'de saklanabilmektedir.

### **3.7.5. TL Heps (Yıkama) Medyumunun Hazırlanması ve İçeriği**

Kullanım günü belirlenen miktardaki TL Heps stok solüsyonu üzerine aşağıda belirtilen kimyasallar ilave edilmiş ve solüsyon filtreden geçirilmiştir.

PVP-40 (polivinil pirolidon-40)	3 mg/ml
Piruvat stok (0,2 mM final)	10 µl/ml
Gentamisin stok (25 µg/ml final)	0,5 µl/ml

#### 4. BULGULAR

Çözündürme sıcaklıkları olarak uygulanan 37°C/30 sn, 50°C/15 sn ve 70°C/5 sn koşullarında FITC-PSA ortalama değerleri sırasıyla Percoll grubunda %32,35, %41,35 ve %56,30; Swim-up grubunda %25,25, %32,45 ve %63,90; Kontrol grubunda %17,90, %18,35 ve %17,45 olarak saptanmıştır. Aynı çözündürme sıcaklıkları için ölü hücre oranları sırasıyla Percoll grubunda %31,38, %14,95 ve %30,65; Swim up grubunda %15,85, %13,60 ve %13,50; Kontrol grubunda %35,58, %46,18 ve %35,82 olarak bulunmuştur. Aynı çözündürme sıcaklıkları için canlı hücre oranları sırasıyla Percoll grubunda %68,63, %85,05 ve %69,35; Swim up grubunda %69,15, %86,40 ve %86,50; Kontrol grubunda %68,43, %53,83 ve %64,18 olarak bulunmuştur. Aynı çözündürme sıcaklıkları için motilite oranları sırasıyla Percoll grubunda %55,75, %58,50 ve %48,25; Swim up grubunda %59,75, %55,75 ve %54,75; Kontrol grubunda %49,25, %45,75 ve %48,75 olarak bulunmuştur. Yine aynı çözündürme sıcaklıkları için HOST sonuçları sırasıyla Percoll grubunda %73,95, %69,50 ve %42,20; Swim up grubunda %77,55, %72,00 ve %50,15; Kontrol grubunda %62,65, %70,50 ve %50,60 olarak bulunmuştur.

Varyans analizi sonuçları, incelenen gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılığın olduğunu göstermektedir ( $p < 0,05$ ). Ayrıştırma gruplarında en yüksek FITC-PSA değerlerinin Swim-up 70°C ve Percoll 70°C gruplarında olduğu, en düşük değerlerin ise, Swim-up 37°C grubunda olduğu tespit edilmiştir. Tablo 3'de görüleceği üzere çoklu karşılaştırma testi sonuçları, Percoll 70°C ile Swim-up 70°C grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir ( $p > 0,05$ ). Bu gruplara uygulanan muamele FITC-PSA değerleri açısından anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Bununla birlikte, FITC-PSA değerleri açısından Percoll 70°C ve Swim-up 70°C gruplarının ortalamaları arasında istatistiksel yönden fark olmayıp diğer 4 grupla arasındaki farkın önemli olması ( $p < 0,05$ ), FITC-PSA değerinde grup ortalamaları açısından Percoll ve Swim-up uygulaması fark meydana getirmezken, 70°C'lik sıcaklık uygulamasının daha düşük sıcaklık

uygulamalarına göre farklılık oluşturduğunu göstermektedir. Kontrol grubu içerisinde farklı ısı dereceleri arasında benzer sonuçların çıkmasına rağmen, deneme gruplarında ısı derecesinin artmasıyla birlikte FITC-PSA değerleri de artmıştır.

**Tablo 3.** FITC-PSA Değerleri Yönünden Gruplar Arası Genel Karşılaştırma

GRUPLAR	ORTALAMA	S.S.	S.H.	95% Güven Aralığı		Min	Max	P
				Alt Sınırı	Üst Sınırı			
<b>Percoll</b> <b>37 °C</b>	32,35 <sup>ac</sup>	6,48	1,45	29,32	35,38	19,00	44,00	
<b>Percoll</b> <b>50°C</b>	41,35 <sup>a</sup>	11,04	2,47	36,18	46,52	27,00	62,00	< 0,05
<b>Percoll</b> <b>70°C</b>	56,30 <sup>b</sup>	10,15	2,27	51,55	61,05	33,00	71,00	
<b>Swim-up</b> <b>37°C</b>	25,25 <sup>c</sup>	8,95	2,00	21,06	29,44	11,00	42,00	
<b>Swim-up</b> <b>50°C</b>	32,45 <sup>ac</sup>	11,82	2,64	26,92	37,98	16,00	65,00	< 0,05
<b>Swim-up</b> <b>70°C</b>	63,90 <sup>b</sup>	12,38	2,77	58,10	69,70	40,00	89,00	
<b>Kontrol</b> <b>37°C</b>	17,90 <sup>c</sup>	3,28	0,73	16,37	19,43	11,00	24,00	
<b>Kontrol</b> <b>50°C</b>	18,35 <sup>c</sup>	3,27	0,73	16,82	19,88	14,00	28,00	< 0,05
<b>Kontrol</b> <b>70°C</b>	17,45 <sup>c</sup>	3,73	0,83	15,70	19,20	11,00	26,00	

<sup>a,c</sup>: Aynı sütunda farklı harflerle işaretlenen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir. (P < 0,05)

Farklı sıcaklıklara göre gruplar arasında FITC-PSA değerleri karşılaştırılmıştır. Gerçekleştirilen analizlerde 37°C sıcaklık gruplarında, FITC-PSA değerleri incelendiğinde, diğer gruplara göre en yüksek ortalama değer Percoll 37°C grubunda; en düşük ortalama değer ise, Kontrol grubunda hesaplandığı görülmektedir. Tablo 3' de görüleceği üzere varyans analizi sonuçları gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık sergilememiştir. 50°C'de bahsi geçen grup ortalamaları arasında FITC-PSA değerleri bakımından sadece Percoll 50°C ile Kontrol 50°C grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmaktadır (p<0,05).

Bu sıcaklık derecesinde en yüksek ortalama FITC-PSA değeri Percoll 50°C grubunda; en düşük değer ise Kontrol grubunda hesaplanmıştır. 70°C’de ise, FITC-PSA değerleri grup ortalamaları arasında Kontrol 70°C grubu Percoll ve Swim-up 70°C gruplarından istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu sıcaklık derecesinde en yüksek ortalama FITC-PSA değeri Swim-up 70°C grubunda; en düşük değer ise, Kontrol grubunda hesaplanmıştır. Grup ortalamaları arasındaki farklılığın Kontrol grubundan kaynaklandığı görülmektedir. Özetle; düşük sıcaklık gruplarında yapılan uygulama açısından FITC-PSA değerleri arasında belirgin farklılık saptanmıştır. Ayrıca, 70°C’de Percoll ve Swim-up uygulamaları arasında anlamlı fark görülmekte ( $p<0,05$ ) ve her ikisi de kontrol grubundan daha yüksek FITC-PSA değerine sahip olmaktadır.

Percoll, Swim-up ve Kontrol grupları olmak üzere üç farklı sıcaklık derecesinde (37°C, 50°C ve 70°C) ölü, canlı ve motilite değerlerine ilişkin veriler Tablo 4’te karşılaştırılmıştır. 37°C’de ölü değerlerin grup ortalamaları arasındaki en düşük değer Swim-up grubunda saptanmış ve diğer iki grubun değerlerinden istatistiksel anlamda farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Percoll ve Kontrol gruplarında ise, değerler benzer bulunmuştur. 50°C’de ölü değerlerin grup ortalamaları arasındaki en yüksek değer Kontrol grubunda belirlenmiş ve diğer iki grubun değerleriyle arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Kontrol grubunun Percoll ve Swim-up gruplarından çok daha yüksek ölü spermatozoon oranına sahip olduğu, 50°C’de Percoll ve Swim-up uygulamalarının ölü spermatozoon değerleri açısından fark oluşturmadığı yani her iki uygulamanın da benzer düzeyde düşük ölüm değerini sağladığı tespit edilmiştir. 70°C’de ölü değerlerin grup ortalamaları arasındaki en düşük değer Swim-up grubunda saptanmış ve diğer iki grubun değerlerinden istatistiksel anlamda düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). 37°C’deki karşılaştırmaya benzer şekilde, 70°C’de de grup ortalamaları arasındaki en düşük değer Swim-up grubunda tespit edilmiştir. Her üç sıcaklık seviyesindeki ölü spermatozoon değerleri içinde, en yüksek ortalama değer Kontrol 50°C grubunda, en düşük değer ise Swim-up 70°C grubunda tespit edilmiştir.

**Tablo 4:** Grupların Sıcaklıklara Göre Ölü, Canlı ve Motilite Değerlerinin Karşılaştırılması

	SICAKLIK	GRUPLAR	ORTALAMA (%)	S.S.	S.H.	95% Güven Aralığı		Min	Max	P
						Alt Sınırı	Üst Sınırı			
Ö L Ü	37 °C	Percoll	31,38 <sup>a</sup>	28,60	6,40	49,36	76,14	12,00	98,00	<0,05
		Swim-up	15,85 <sup>b</sup>	11,83	2,64	26,16	37,24	16,00	68,00	
		KONTROL	35,58 <sup>a</sup>	12,71	2,84	65,20	77,10	50,00	95,00	
	50 °C	Percoll	14,95 <sup>b</sup>	9,48	2,12	25,46	34,34	18,00	48,00	<0,05
		Swim-up	13,60 <sup>b</sup>	11,17	2,50	21,97	32,43	12,00	56,00	
		KONTROL	46,18 <sup>a</sup>	8,94	1,99	88,17	96,53	81,00	112,00	
	70 °C	Percoll	30,65 <sup>a</sup>	20,68	4,62	51,62	70,98	24,00	100,00	<0,05
		Swim-up	13,50 <sup>b</sup>	13,10	2,93	20,87	33,13	12,00	74,00	
		KONTROL	35,82 <sup>a</sup>	7,15	1,60	68,31	74,99	60,00	85,00	
C A N L I	37 °C	Percoll	68,63 <sup>b</sup>	28,60	6,40	123,86	150,64	102,00	188,00	<0,05
		Swim-up	69,15 <sup>a</sup>	11,83	2,64	162,76	173,84	136,00	184,00	
		KONTROL	68,43 <sup>b</sup>	12,71	2,84	122,90	134,80	105,00	150,00	
	50 °C	Percoll	85,05 <sup>a</sup>	9,48	2,12	165,66	174,54	152,00	182,00	<0,05
		Swim-up	86,40 <sup>a</sup>	11,17	2,50	167,57	178,03	144,00	188,00	
		KONTROL	53,83 <sup>b</sup>	8,94	1,99	103,47	111,83	88,00	119,00	
	70 °C	Percoll	69,35 <sup>b</sup>	20,68	4,62	129,02	148,38	100,00	176,00	<0,05
		Swim-up	86,50 <sup>a</sup>	13,10	2,93	166,87	179,13	126,00	188,00	
		KONTROL	64,18 <sup>b</sup>	7,15	1,60	125,01	131,69	115,00	140,00	
M O T İ L İ T E	37 °C	Percoll	55,75 <sup>a</sup>	10,29	2,30	50,93	60,57	35,00	75,00	<0,05
		Swim-up	59,75 <sup>a</sup>	5,25	1,17	57,29	62,21	50,00	70,00	
		KONTROL	49,25 <sup>b</sup>	4,06	0,91	47,35	51,15	40,00	55,00	
	50 °C	Percoll	58,50 <sup>a</sup>	8,29	1,85	54,62	62,38	40,00	75,00	<0,05
		Swim-up	55,75 <sup>a</sup>	9,77	2,18	51,18	60,32	35,00	70,00	
		KONTROL	45,75 <sup>b</sup>	5,45	1,22	43,20	48,30	35,00	55,00	
	70 °C	Percoll	48,25	15,83	3,54	40,84	55,66	10,00	65,00	>0,05
		Swim-up	54,75	8,347	1,87	50,84	58,66	40,00	70,00	
		KONTROL	48,75	4,25	0,95	46,76	50,74	40,00	55,00	

<sup>a,b,c</sup>: Aynı parametreye ait farklı sıcaklık grupları arasındaki farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

37°C’de canlı değerlerin grup ortalamaları arasındaki en yüksek ortalama değer Swim-up grubunda belirlenmiş ve diğer iki grubun değerlerinden istatistiksel anlamda farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Percoll ve Kontrol gruplarında ise, değerler istatistiksel bakımdan benzer bulunmuştur. 50°C’de canlı değerlerin grup ortalamaları arasındaki en dūřuk değer Kontrol grubunda saptanmış ve diğer iki grubun değerleriyle arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Kontrol grubunun Percoll ve Swim-up gruplarından daha dūřuk canlı spermatozoon oranına sahip olduğu, 50°C’de Percoll ve Swim-up uygulamalarının canlı spermatozoon değerleri açısından istatistiksel fark oluşturmadığı yani her iki uygulamanın da benzer dūzeyde yüksek canlı spermatozoon değerini sağladığı tespit edilmiştir. 70°C’de canlı değerlerin grup ortalamaları arasındaki en yüksek değer Swim-up grubunda tespit edilmiş ve diğer iki grubun değerlerinden istatistiksel anlamda yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Percoll ve Kontrol gruplarının ortalama değerleri arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Her u sıcaklık seviyesindeki canlı spermatozoon değerleri içinde, en yüksek ortalama değer Swim-up 70°C grubunda, en dūřuk değer ise Kontrol 50°C grubunda saptanmıştır.

37°C’de motilite değerlerinin grup ortalamaları arasındaki en dūřuk ortalama değer Kontrol grubunda belirlenmiş ve diğer iki grubun değerlerinden istatistiksel anlamda farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Percoll ve Swim-up grup ortalama değerleri ise istatistiksel bakımdan benzer bulunmuştur. 50°C’de motilite değerlerinin grup ortalamaları arasındaki en dūřuk değer, yine Kontrol grubunda saptanmış ve diğer iki grubun değerleriyle arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Kontrol grubunun Percoll ve Swim-up gruplarından daha yüksek motil spermatozoon oranına sahip olduğu, 50°C’de Percoll ve Swim-up uygulamalarının motil spermatozoon değerleri açısından aralarında istatistiksel fark oluşmadığı yani her iki uygulamanın da benzer dūzeyde yüksek motil spermatozoon değerini sağladığı saptanmıştır. 70°C’de motilite değerlerinin grup ortalamaları arasındaki en yüksek değer Swim-up grubunda tespit edilmiş olmasına rağmen, Percoll, Swim-up ve Kontrol grupları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Her u sıcaklık seviyesindeki motil spermatozoon değerleri içinde, en yüksek ortalama değer Swim-up 37°C grubunda, en dūřuk değer ise Kontrol 50°C grubunda tespit edilmiştir.

Tablo 5’de Kontrol gruplarına ilişkin grup ortalamaları karşılaştırmaları yer almaktadır. FITC-PSA parametresi bakımından Kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Ölü spermatozoon oranı açısından grup ortalamaları arasındaki farklılıkta istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Grup ortalamaları arasında meydana gelen farklılık Kontrol 50°C grubundan kaynaklanmaktadır. Kontrol 37°C ve Kontrol 70°C gruplarından elde edilen değerler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Canlı spermatozoon oranı açısından elde edilen sonuçlar incelendiğinde, ölü parametresi sonuçları ile benzer şekilde grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Canlı parametresi için grup ortalamalarında hesaplanan en yüksek değer Kontrol 37°C ve Kontrol 70°C’de; en düşük değer ise Kontrol 50°C’de görülmektedir. Motilite parametresi ile gerçekleştirilen analizlerde ise, grup ortalamaları arasındaki farklılıklar arasında da istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Grup ortalamalarında Kontrol 70°C grubunun motilite değeri her iki gruba da benzerlik gösterirken, hesaplanan en yüksek değer Kontrol 37°C’de; en düşük değer ise Kontrol 50°C’de görülmektedir ve 37°C ile 50°C grupları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



**Tablo 5.** Kontrol Gruplarının FITC-PSA, ölü, canlı ve motilite değerlerinin Karşılaştırılması

PARAMETRE	GRUPLAR	ORTALAM A(%)	S.S.	S.H.	95% Güven Aralığı		Min	Max	P
					Alt Sınırı	Üst Sınırı			
FITC-PSA	KONTROL 37 °C	17,90	3,28	0,73	16,37	19,43	11,00	24,00	> 0,69
	KONTROL 50 °C	18,35	3,27	0,73	16,82	19,88	14,00	28,00	
	KONTROL 70 °C	17,45	3,73	0,84	15,70	19,20	11,00	26,00	
ÖLÜ	KONTROL 37 °C	35,58 <sup>a</sup>	12,71	2,84	65,20	77,10	50,00	95,00	< 0,05
	KONTROL 50 °C	46,18 <sup>b</sup>	8,94	1,99	88,17	96,53	81,00	112,00	
	KONTROL 70 °C	35,82 <sup>a</sup>	7,15	1,60	68,31	74,99	60,00	85,00	
CANLI	KONTROL 37 °C	68,43 <sup>a</sup>	12,71	2,84	122,90	134,80	105,00	150,00	< 0,05
	KONTROL 50 °C	53,83 <sup>b</sup>	8,94	1,99	103,47	111,83	88,00	119,00	
	KONTROL 70 °C	64,18 <sup>a</sup>	7,15	1,60	125,01	131,69	115,00	140,00	
MOTİLİTE	KONTROL 37 °C	49,25 <sup>a</sup>	4,06	0,91	47,35	51,15	40,00	55,00	< 0,05
	KONTROL 50 °C	45,75 <sup>b</sup>	5,45	1,22	43,20	48,30	35,00	55,00	
	KONTROL 70 °C	48,75 <sup>ab</sup>	4,25	0,95	46,76	50,74	40,00	55,00	

<sup>a,b</sup>: Aynı parametreye ait farklı sıcaklık grupları arasındaki farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Percol ve Swim-up yöntemlerinin 3 farklı parametreye göre karşılaştırılma sonuçları Tablo 6'da gösterilmiştir. Ölü parametresine göre, farklı sıcaklıklarda incelenen gruplar arasında Percoll yöntemi için 50°C'de istatistiksel bir farklılık görülürken ( $p < 0,05$ ), 37°C ve 70°C'de elde edilen sonuçlar birbiriyle benzer bulunmuştur. Ayrıca, Swim-up gruplarına ait ortalamalar analiz edildiğinde, kullanılan üç sıcaklıkta da istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Öte yandan, canlı parametresine göre de yine 37°C ve 70°C'de elde edilen sonuçlar birbiriyle benzer bulunmuşken, 50°C'de istatistiksel bir farklılık görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ölü parametresinde elde edilen sonuçlar ile benzer olarak, Swim-up gruplarına ait ortalamalar arasında kullanılan üç sıcaklıkta da istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Motilite parametresi incelendiğinde ise, Swim-up 37°C ve Percoll 70°C grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık saptanmıştır. Ayrıca, Percoll 50°C ve Percoll 70°C gruplarına ait ortalamalar da istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $p < 0,05$ ). İncelenen diğer gruplarda ise herhangi bir fark gözlemlenmemiştir.

**Tablo 6.** Percoll ve Swim-up Yöntemlerinin 3 Farklı Parametreye Göre Karşılaştırılması

PARAMETRE	GRUPLAR	ORTALAMA (%)	S.S.	S.H.	95% Güven Aralığı		Min	Max	P
					Alt Sınırı	Üst Sınırı			
ÖLÜ	Percoll 37 °C	31,38 <sup>b</sup>	28,60	6,40	49,36	76,14	12,00	98,00	<0,05
	Swim-up 37 °C	15,85 <sup>a</sup>	11,83	2,64	26,16	37,24	16,00	68,00	
	Percoll 50 °C	14,95 <sup>a</sup>	9,48	2,12	25,46	34,34	18,00	48,00	
	Swim-up 50 °C	13,60 <sup>a</sup>	11,17	2,50	21,97	32,43	12,00	56,00	
	Percoll 70 °C	30,65 <sup>b</sup>	20,68	4,62	51,62	70,98	24,00	100,00	
	Swim-up 70 °C	13,50 <sup>a</sup>	13,10	2,93	20,87	33,13	12,00	74,00	
CANLI	Percoll 37 °C	68,63 <sup>b</sup>	28,60	6,40	123,86	150,64	102,00	188,00	<0,05
	Swim-up 37 °C	69,15 <sup>a</sup>	11,83	2,64	162,76	173,84	136,00	184,00	
	Percoll 50 °C	85,05 <sup>c</sup>	9,48	2,12	165,66	174,54	152,00	182,00	
	Swim-up 50 °C	86,40 <sup>a</sup>	11,17	2,50	167,57	178,03	144,00	188,00	
	Percoll 70 °C	69,35 <sup>b</sup>	20,68	4,62	129,02	148,38	100,00	176,00	
	Swim-up 70 °C	86,50 <sup>a</sup>	13,10	2,93	166,87	179,13	126,00	188,00	
MOTİLİTE	Percoll 37 °C	55,75 <sup>c</sup>	10,29	2,30	50,93	60,57	35,00	75,00	<0,05
	Swim-up 37 °C	59,75 <sup>a</sup>	5,25	1,17	57,29	62,21	50,00	70,00	
	Percoll 50 °C	58,50 <sup>a</sup>	8,29	1,85	54,62	62,38	40,00	75,00	
	Swim-up 50 °C	55,75 <sup>c</sup>	9,77	2,18	51,18	60,32	35,00	70,00	
	Percoll 70 °C	48,25 <sup>b</sup>	15,83	3,54	40,84	55,66	10,00	65,00	
	Swim-up 70 °C	54,75 <sup>c</sup>	8,347	1,87	50,84	58,66	40,00	70,00	

a,b; b,c: Aynı sütunda ve gruplar arasında farklı harflerle işaretlenen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir.

Tablo 7’de Host’tan elde edilen oransal değerlere ilişkin sonuçlar yer almaktadır. Percoll grupları arasında farklı sıcaklık derecelerinde yapılan karşılaştırma sonucunda, 70°C’de istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ). Kontrol grupları arasında farklı sıcaklık değerlerinde yapılan karşılaştırmada ise 37 °C’de istatistiksel bir fark görülmektedir ( $p<0,05$ ). Buna rağmen, Swim-up gruplarında sıcaklık derecelerinin kendi içinde bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 7:** Host Oransal Değerlerin Karşılaştırılması

GRUPLAR	SICAKLIK	ORTALAMA (%)	<i>P</i>
PERCOLL	37 °C	73,95 <sup>a</sup>	p<0,05
	50 °C	77,55 <sup>a</sup>	
	70 °C	62,65 <sup>ac</sup>	
SWIM-UP	37 °C	69,50 <sup>a</sup>	p>0,05
	50 °C	72,00 <sup>a</sup>	
	70 °C	70,50 <sup>a</sup>	
KONTROL	37 °C	42,20 <sup>b</sup>	p<0,05
	50 °C	50,15 <sup>bc</sup>	
	70 °C	50,60 <sup>bc</sup>	

<sup>a,c</sup>: Aynı sütunda farklı harflerle işaretilenen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir. (P <0,05)

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Hayvan ıslahını hızlandırmak ve hayvanların verim düzeylerini artırmak amacıyla biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla, süperovulasyon ve *in-vitro* fertilizasyon ile embriyo üretimi, spermanın fertilizasyon yeteneğinin değerlendirilmesi, spermanın dondurulması ve suni tohumlama yönteminin kullanılması hayvan üreme teknolojisinde önemli bir yere sahiptir. Günümüzde süt sığırcılık alanında sıklıkla kullanılan suni tohumlama yöntemi sayesinde fertilite oranları yüksek düzeye çıkarılmıştır ve bu alanda dondurulmuş boğa sperması ticari olarak kullanılmaktadır. Suni tohumlama kullanılarak elde edilen gebelik oranlarının seviyesi, kullanılan yüksek sayıda spermatozoon ve spermanın fertilizasyon kabiliyeti ile ilişkilidir (Moore & Hasler, 2017). Spermanın uygun bir teknik ile alınması, dondurulması-çözündürülmesi, saklanması gibi birçok faktör spermanın fertilizasyonunu etkilemektedir (Morrel, 2011). Boğalardan alınan sperma sulandırma, soğutma, dondurma, konteynerde depolama, çözündürme ve çözündürme sonrası işlemler ve ani sıcaklık değişimleri gibi faktörlerden etkilenmekte ve bunun sonucunda spermatozoonlar hasara uğrayabilmektedir (Senger, 1980). Bahsedilen bu işlemler arasından çözündürme teknikleri ve bu işlem esnasında uygulanan sıcaklıklar spermatozoonların spermatolojik özelliklerinin değişimi üzerinde oldukça etkilidir (Yavaşca, Ak, & İleri, 1999). Motilite, ölü-canlı durumu, morfolojik bozukluklar (özellikle akrozom kısmında), membran bütünlüğü gibi faktörlerin incelenmesi spermanın fertilitesi ile ilgili önemli bilgiler vermektedir. Sunulan bu çalışmada, farklı çözündürme sıcaklıklarının ve sperma ayrıştırma yöntemlerinin spermanın kalitesi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır ve bu amaçla Brown Swiss ırkına ait ejakülatlardan elde edilen payetler Percoll, Swim up ve kontrol olarak 3 farklı metot ve 3 farklı çözündürme derecesinde (37°C, 50°C ve 70°C) incelenmiştir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda donmuş spermanın eritilmesinde; giysi cebi, farklı su banyosu sıcaklıkları, avuç içinde ve dişi genital kanalda çözündürme gibi birbirinden farklı teknikler uygulanmıştır (Pickett & Berndtson, 1974; Robbins, Saacke, & Chandler, 1976). Yapılan çalışmalarda, optimum çözündürme sıcaklığı

süresinin belirlenmesi adına çeşitli araştırmalar yapılmış ve spermanın morfolojik özelliklerinin yanında potansiyel fertilesi de korunmaya çalışılmıştır (Dhami, Sahni, & Mohan, 1992; Pace, Sullivan, Elliott, Graham, & Coulter, 1981). Selçuk, Akal, & Çelebi (2014) tarafından yapılan bir çalışmada dondurulmuş sperma su banyosu kullanılarak (37,5°C/25 sn) ve cihaz içinde (37,5°C/25 sn) çözündürülmüştür. Yapılan uygulamalar sonucunda, benzer spermatozoon canlılığı ve morfolojik bozukluklar gözlemlenmiştir. Elde edilen verilere göre, her iki yöntemin de kullanılabilirliği kanısına varılmıştır. Tez kapsamında da gerçekleştirilen farklı sıcaklık uygulamaları sonucunda 37°C, spermanın kalitesi için optimum değer olarak belirlenmiştir ve sonuçlar literatürde belirtilen çalışma ile birbirini destekler niteliktedir. Suni tohumlama uygulamalarının başarısı, su banyosunun sıcaklığı, burada geçen süre ve çözündürme hızı ile ilişkilidir (Saacke, & White, 1970; Saacke, 1972; Senger, 1980). Danasouri (1988) tarafından yapılan bir çalışmada, 5°C/50 sn, 37°C/15 sn ve 70°C/7 sn parametreleri dondurulmuş sperma üzerinde uygulanmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek akrozomal bozukluklar 5°C’de çözündürme işlemi sonucunda gözlemlenmiştir. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan en düşük sıcaklık değeri 5°C tez çalışmasında kullanılmamıştır. Tez kapsamında incelenen gruplar arasındaki genel kıyaslamada, 37°C ve 50°C için Percoll uygulamasının Swim up yöntemine göre daha fazla bozukluğa sebep olduğu görülmektedir. Ayrıca, Percoll yöntemine kıyasla, Swim up uygulaması 70°C de daha az bozukluğa sebep olmaktadır. Genel olarak yaptığımız çalışmalarda düşük sıcaklıklarda FITC-PSA değerleri bakımından anlamlı farklılıklar saptanmıştır (Tablo 3). Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde, 37°C’de donmuş spermanın çözündürülmesine kıyasla 21°C’de çözündürülmesi spermatozoonlarda ozmotik basınç ve sıcaklıklarda değişimin daha yavaş geliştiğini ve bunun sonucunda spermatozoonlarda daha az hasarla karşılaşıldığı sonucuna varılmıştır (Borg, Colenbrander, Fazeli, Parlevliet, & Malmgren, 1997; Correa ve ark., 1997; Correa & Zavos, 1995). Bu alanda yapılan diğer çalışmalarda ise, donmuş spermanın düşük sıcaklık ve uzun sürede çözündürme işleminin akrozomal bütünlüğe ve motiliteye zarar verdiği ve spermanın potansiyel fertilesini azalttığı sonucuna varılmıştır (DeJarnette, Barnes, & Marshall, 2000; Forde & Gravir, 1974; Senger, 1980). Tez kapsamında yapılan motilite incelemeleri doğrultusunda elde edilen sonuçlara göre ise, 50°C diğer sıcaklık değerlerine kıyasla (37°C ve 70°C) spermanın motilite ve canlılık durumlarını olumsuz etkilemiştir. Literatürdeki bir çalışmada, dondurulmuş

boğa sperması 37°C/30 sn, 20°C/45 sn, 15°C/60 sn ve 5°C/90 sn koşulları altında çözündürülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, ortalama akrozomal bozukluk oranları %3,22, %11,8, %17,78 ve %31,4 ve ortalama motilite değerleri; %57,1, 42,3, 36,8 ve 29,2 şeklinde bildirilmiştir. Ayrıca, diğer morfolojik bozukluklar %3,72, %6,96, %8,89, %9,2 ve toplam morfolojik bozukluklar %6,94, %18,04, %26,67, %40,6 olarak bulunmuştur. Uygulanan soğuk şokunun sperma fertilitelerini etkilediği ve bu yüzden spermanın 20°C altındaki sıcaklıklarda bırakılmaması gerektiği savunulmuştur (Güney & İleri, 1991). Yavaşca ve ark. (1999) tarafından gerçekleştirilen çalışmada,  $\geq 18^{\circ}\text{C}$ ,  $17-13^{\circ}\text{C}$ ,  $12-7^{\circ}\text{C}$  ve  $<6^{\circ}\text{C}$ 'lik çevre ısılarında, sperma 37°C'deki su banyosunda 30 saniye boyunca çözündürülmüştür. Çözündürme işlemi ardından, tohumlama işlemi pistolenin dışı genital kanalına 30., 90., ve 300. saniyelerde yerleştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. 300 saniye bekleyen spermanın sıcaklık farkından bağımsız olarak 30 saniyelik gruba göre fertiliteler bakımından daha düşük verime sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, tüm sıcaklıklarda, çözündürme sonrasındaki artan bekleme süresi sperma fertilizasyonunu olumsuz etkilemektedir. Diğer bir çalışmada ise, dondurulmuş sperma farklı zaman ve sıcaklık koşullarında çözündürülmüştür. Farklı sıcaklıklarda uygulanan deney sonuçlarına göre elde edilen bulgular 17°C'nin altındaki sıcaklıklarda spermanın korunması gerektiğini ortaya koymuştur. Diğer yandan, uygulanan soğuk şokunun spermanın özellikle akrozom kısmında geri dönüşümsüz bozukluklara yol açtığı savunulmaktadır (İleri ve ark., 1993). Genel olarak tez kapsamında, düşük sıcaklık gruplarında yapılan uygulama açısından FITC-PSA değerleri arasında belirgin farklılık saptanmıştır ve 70°C'de Percoll ve Swim-up uygulamaları arasında anlamlı fark görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ayrıca tez kapsamında kullanılan en düşük sıcaklık değerinin 37°C olmasından dolayı bazı ilgili literatür çalışmaları ile tez sonuçları tam olarak kıyaslanamamaktadır.

Çalışmada kullanılan sperma ayırıştırma yöntemlerinden Percoll yöntemi yoğunluk farklılığına dayanmaktadır; normal morfolojideki spermatozoa yoğunluğu en yüksek olan yapıdır ve kullanılan konik tüpün en alt kısmında toplanacaktır. Diğer bir ayırıştırma yöntemi olan Swim up yönteminde ise motilite durumu esastır ve sadece hareketli sperm hücreleri hareketsiz olanlardan bu yöntem ile ayrılabilir. Belirtilen bu yöntemlerin spermanın morfolojik özelliği, motilitesi ve canlılığı üzerine olan etkileri ile ilişkili birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Plazma membran ve

akrozom bütünlüğünde meydana gelen hasarların ve dondurma işlemi sırasında oluşan soğuk ortam ve ozmotik değişikliklerin, hücre zarında morfolojik bozulmalara ve lipid bileşenlerinin kompozisyonundaki farklılıklara yol açtığı görülmüştür (Amann & Pickett, 1987). Arias, Andara, Briones, & Felmer (2017) yaptıkları bir çalışmada, Swim-up ve Percoll yöntemlerini kullanarak sığırdan sperma ayırıştırma işlemi gerçekleştirilmiş ve bu yöntemlerin sperma özelliği, fonksiyonu ve gen anlatım seviyesi üzerine etkilerini incelemiştir. Plazma membran bütünlüğü ele alındığında, Percoll yöntemi (%89,8) ve Swim-up yöntemi (%74,9) kullanılarak ayırıştırılan spermalarla ayırıştırma işlemi uygulanmamış kontrol spermayla (%70,3) kıyaslandığında daha yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir. Akrozomal membrana sahip sperma oranı ise, Percoll grubunda %87,5 bulunmuşken, Swim-up (%63,3) ve kontrol (%62,4) gruplarından daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, motilite değerleri kıyaslandığında, ayırıştırma yöntemi kullanılan spermalarda (Percoll için %97,33 ve Swim-up için %83,80) kontrol grubuna (%69,70) kıyasla daha yüksek motilite görülürken, Percoll yönteminde en verimli sonucun alındığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, Percoll yöntemi kullanılarak spermanın ayırıştırma işleminin hareketlilik ve sperma fonksiyon parametrelerini iyileştirdiği gösterilmiştir. Çalışmamız ve Arias ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışma kıyaslandığında, plazma membran bütünlüğündeki sonuçlar benzerlik gösterirken, akrozomal bütünlük ve canlı sperma sonuçları ise farklılık göstermektedir. Diğer bir çalışmada, Swim-up ve Percoll yöntemlerinin dondurulmuş-çözündürülmüş boğa spermatozoonlarının membran ve akrozomal bütünlüğüne olan etkisi irdelenmiştir. Uygulanan her iki yöntemde kontrol grubu ile kıyaslandığında canlı spermatozoa oranının daha fazla olduğu gösterilmiştir. Percoll uygulamasından elde edilen spermaların (%88,2) Swim-up (%69,4) yönteminden elde edilen ile karşılaştırıldığında, Percoll yöntemiyle önemli ölçüde daha yüksek bozulmamış akrozoma sahip canlı hücrelerin elde edildiği saptanmıştır. Bu sonuçlar ile daha yüksek bir canlılığa ve akrozom bütünlüğüne sahip spermatozoanın, Percoll ayırıştırması ile elde edilebileceği gösterilmiştir (Somfai ve ark., 2002). Somfai ve ark. (2002) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın sonuçlarının aksine belirtilen tez çalışmasında en yüksek canlılık ve akrozomal bütünlük Swim-up yöntemi ile ayrılan spermalarda gözlemlenmiştir ve iki çalışmanın verileri birbirleriyle uyuşmamaktadır. Mehmood, Anwar, & Naqvi (2009) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, canlı spermatozoonları ayırıştırmak için Swim-up ve Percoll yöntemlerinin

etkinliğini karşılaştırmak için beş bufalo boğasının dondurulmuş-çözündürülmüş sperması kullanılmıştır. Hareketli spermin geri kazanım oranı (%), membran bütünlüğü (%) ve akrozom bütünlüğü (%) oranları iki sperma ayırıştırma yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Swim-up yöntemiyle ayırıştırılmış sperma daha yüksek bir motilite ( $p<0,05$ ) gösterirken, hareketli spermanın geri kazanım yüzdesi Percoll yöntemi ile ayırıştırılmış olan spermada daha yüksek olarak bildirilmiştir ( $p<0,05$ ). Swim-up ile ayırıştırılan spermanın membran bütünlüğü (%77,3), Percoll (%70,5) ile ayırıştırılan sperma ile karşılaştırıldığında, önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Spermanın akrozom bütünlüğündeki artışın, iki ayırıştırma yöntemi arasında farklılık göstermediği gözlemlenmiştir ( $p>0,05$ ). Sonuç olarak, Swim-up ve Percoll yöntemlerinin, dondurulmuş-çözündürülmüş bufalo spermasından canlı sperm elde etmede etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Spermaların dondurulmuş-çözündürülmüş bufalo sperminden Swim-up yöntemi ile ayrılmasının IVF için daha uygun olabileceği sonucuna varılmıştır. En yüksek motilite değerlerinin elde edildiği sperma ayırıştırma yöntemi sonuçları birbirini destekler nitelikte iken, akrozomal bütünlük ve plazma membran bütünlüğü sonuçları tez çalışmasında Swim-up yöntemiyle elde edildiğinden dolayı literatürdeki çalışmanın sonuçları ile farklılık göstermektedir. Literatür araştırmaları sonucunda, Percoll ve Swim-up yöntemleri kullanılarak ayırıştırılan spermaların her iki yöntemde de daha yüksek akrozomal ve membran bütünlüğüne veya motiliteye sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Özetle, literatürdeki çalışmaların sonuçları ile tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları kıyaslandığında benzerliklerin yanı sıra bazı farklılıklar da gözlenmektedir.

Sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda, çoklu karşılaştırma testi ile FITC-PSA değerlerine göre akrozomal bozukluk bakımından gruplar arasında yapılan genel kıyaslamada, 37°C ve 50°C için Swim up uygulamasının Percoll yöntemine göre daha az bozukluğa sebep olduğu görülmektedir (Tablo 3). Yüksek sıcaklıklarda elde edilen sonuçlar incelendiğinde, Percoll ve Swim up yöntemleri arasında anlamlı fark görülmekte ve her iki grubun kontrol gruplarından daha yüksek FITC-PSA değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Düşük sıcaklıklarda yapılan uygulamalarda FITC-PSA değerleri bakımından anlamlı bir farklılık görülmektedir (Tablo 3). Bu sonuçlara göre; kontrol grupları diğer gruplara kıyasla genel olarak daha düşük akrozomal bozukluk göstermektedir. Canlı spermatozoon oranı incelendiğinde



ise; ölü parametresi sonuçları ile benzer olarak grup ortalamaları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Tablo 5). 37°C ve 70°C sıcaklık değerleri kontrol gruplarında ölü, canlı, akrozomal bozukluk ve motilite bakımından istatistiksel bir farklılığa neden olmazken, 50°C diğer sıcaklık değerlerine kıyasla spermanın motilite ve canlılık durumlarını olumsuz etkilemektedir.

3 farklı grubun 3 farklı sıcaklık seviyesinden elde edilen ölü, canlı ve motilite parametre sonuçları ele alındığında; kontrol grubu, Percoll ve Swim-up gruplarından daha yüksek ölü spermatozoon oranına sahip grup olarak tespit edilmiştir. Ölü spermatozoon değerlerine bakıldığında, 50°C'de en yüksek ortalama değer Kontrol grubunda tespit edilmiştir ve her üç sıcaklık seviyesinde en düşük değer ise Swim-up 37°C grubunda ölçülmüştür. Canlı spermatozoon oranı açısından ise, en yüksek değer 37°C ve 70°C'de Swim-up grubuna ait iken, en düşük değer sadece 50°C için Kontrol grubunda hesaplanmıştır. Motilite değerleri için 37°C ve 50°C sıcaklıklarda en düşük değer kontrol grubundadır ( $p<0,05$ ) ve kontrol gruplarının her üç sıcaklıkta da diğer gruplara kıyasla en yüksek ölü, en düşük canlı değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Diğer iki grup arasında ise Percoll yönteminin Swim up yöntemine kıyasla daha fazla ölü spermaya sahip olduğu tespit edilmiştir. Motilite açısından kıyaslandığında ise, kontrol grubundaki spermanın diğer iki gruba göre daha düşük değere sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda Percoll yöntemi uygulamasında yüksek canlılık ve motilite, düşük ölü değerleri için 50°C, diğer sıcaklıklarla kıyaslandığında daha uygun görülmektedir. Swim-up yönteminin ölü, canlı ve motilite değerleri sıcaklıktan bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır. İncelenen Host/100 değerlerine göre ise Percoll grupları arasında 50°C'de istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın oluştuğu görülürken ( $p<0,05$ ), Kontrol ve Swim-up için sıcaklık derecelerinin bir farklılık göstermediği ( $p>0,05$ ) tespit edilmiştir (Tablo 5). Belirtilen 3 grubun kıyaslanması sonucunda en fazla sperma plazma membran bütünlüğüne sahip grup Percoll grubu olarak belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında uygulanan sıcaklık değerleri göz önüne alındığında; 37°C'nin diğer iki sıcaklık gruplarına kıyasla daha az akrozomal bozukluğa sebep olduğu görülmüş ve spermanın akrozomal bütünlüğünü korumak için optimum değer 37°C olarak belirlenmiştir. Kontrol grupları için en yüksek canlı, motilite ve en düşük

ölü değerlerinin görüldüğü sıcaklık değeri 37°C optimum olarak belirlenmiştir. Percoll grubunda en yüksek canlı spermatozoon, motilite ve en düşük ölü değeri için optimum 50°C, Swim up grubunda canlı ve ölü parametreleri için optimum sıcaklık değeri 70°C, motilite için 37°C olarak belirlenmiştir. Literatürde bulunan bazı çalışmaların sonuçlarında belirtilen Swim-up ve Percoll sperma ayrıştırma yöntemlerinin ayrıştırılmamış spermaya kıyasla daha yüksek oranda canlı sperma elde edilmesi, sunulan bu çalışma sonuçlarını destekler nitelikte bulunmuştur (Arias ve ark., 2017; Mehmood ve ark., 2009; Somfai ve ark., 2002). En yüksek canlı, en yüksek motilite ve en yüksek akrozomal bütünlüğe sahip spermaların elde edildiği yöntem Swim-up olarak belirlenmiş ve aynı zamanda en düşük ölü sperma değerleri de yine bu yöntemde gözlemlenmiştir. Mehmood ve ark., (2009) tarafından elde edilen motilite sonuçları, sunulan bu çalışmadaki sonuçlar ile birbirini destekler niteliktedir. Arias ve ark (2017) ile Somfai ve ark. (2002) tarafından gerçekleştirilen çalışmaların plazma membran bütünlüğü ile ilişki sonuçlar ele alındığında bu çalışma doğrultusunda elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir. Fakat elde edilen akrozomal bütünlük sonuçları literatürde yer alan ve yukarıda sıralanan sonuçlar ile benzerlik göstermemektedir. Elde edilen bulgulara göre; en yüksek canlı, motilite ve en düşük ölü değerlerinin görüldüğü sıcaklık değeri kontrol grubu için 37°C, Percoll grubu için 50°C, Swim up grubu içinse canlı ve ölü parametreleri için 70°C, motilite için 37°C olarak tespit edilmiştir.

Sunulan çalışmanın sonucunda, genel olarak akrozomal ve plazma membran bütünlüğünün korunduğu optimum sıcaklık 37°C olarak bulunmuştur; ancak, Percoll ve Swim up gruplarının akrozomal bütünlük açısından kontrol grubundan daha olumsuz, plazma membran bütünlüğü açısından ise daha olumlu sonuç verdiği görülmüştür. Ölü/canlı oranları bakımından Percoll ve Swim up grupları için optimum sıcaklığın 50°C olduğu; ancak, 50°C’de kontrol grubunun diğer sıcaklık grubundaki kontrollerden düşük olduğu gözlenmiştir. Motilite oranları açısından Percoll 70°C haricinde elde edilen sonuçlar sıcaklık parametresi bakımından gruplar arasında benzer bulunmuştur. Ayrıştırma işlemi uygulandığından dolayı kontrol gruplarından elde edilen sonuçlar deneme gruplarına göre daha düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak, başta in vitro fertilizasyon olmak üzere, yardımcı üreme tekniklerinden daha iyi sonuçlar alınabilmesi için sperma ayrıştırma yöntemlerinden mutlaka yararlanılması ve çözündürme işleminin daha pratik olması ve çözündürme sürecinin uzamasından kaynaklanacak olumsuz etkiden etkilenmemek amacıyla 37°C zndrme sıcaklığının kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

## REFERANSLAR

- Aalseth, E. P., & Saacke, R. G. (1986). Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete Research*, 15(1), 73–81. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120150108>.
- Abdelhakeam, A. A., Graham, E. F., Vazquez, I. A., & Chaloner, K. M. (1991). Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. *Cryobiology*, 28(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(91\)90006-A](https://doi.org/10.1016/0011-2240(91)90006-A).
- Agarwal, A., & Allamaneni, S. S. R. (2004). Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(3), 338–347. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62151-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62151-7).
- Aisen, E. G., Alvarez, H. L., Venturino, A., & Garde, J. J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 53(5), 1053–1061. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00251-X).
- Aitken, R. J., & West, K. M. (1990). Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13(6), 433–451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1990.tb01051.x>.
- Akmal, I. J., Anwar, M., Mehmood, A., Andrabi, S. M. H., & Lal, C. (2015). Thawing/holding sahiwal semen straws in ice water for artificial insemination in cattle - An adaptive experience. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(3), 867–869.
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(3), 145–173. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4).
- Anzar, M., Kroetsch, T., & Buhr, M. M. (2009). Comparison of different methods for assessment of sperm concentration and membrane integrity with bull semen. *Journal of Andrology*, 30(6), 661–668. <https://doi.org/10.2164/jandrol.108.007500>.
- Arav, A., & Natan, D. (2012). Directional Freezing of Reproductive Cells and Organs. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 193–196. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02075.x>.
- Arias, M. E., Andara, K., Briones, E., & Felmer, R. (2017). Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive Biology*, 17(2), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.03.002>.
- Ax, R. L., Dally, M., Didion, B. A., Lenz, R. W., Love, C. C., Varner, D. D., ... Bellin, M. E. (2016). Semen Evaluation. In B. Hafez, E.S.E. Hafez (Eds.), *Reproduction in Farm Animals* (pp. 363–375). <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch25>.

- Bag, S., Joshi, A., Rawat, P. S., & Mittal, J. P. (2002). Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. *Small Ruminant Research*, 43(1), 23–29. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(01\)00247-4](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(01)00247-4).
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Minireview: Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x>.
- Ball, B. A., Sabeur, K., & Allen, W. R. (2008). Liposome-mediated uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer. *Equine Veterinary Journal*, 40(1), 76–82. <https://doi.org/10.2746/042516407X235786>.
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10(1), pp. 49–62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>.
- Barroso, G., Taylor, S., Morshedi, M., Manzur, F., Gaviño, F., & Oehninger, S. (2006). Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertility and Sterility*, 85(1), 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.06.046>.
- Barth, A. D. (2007). Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (pp. 228–240). <https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50034-9>.
- Barth, A. D., & Bowman, P. A. (1988). Determination of the best practical method of thawing bovine semen. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 29(4), 366–369.
- Batista, A., Silva, S., Soares, A., Monteiro Jr, P. L., Wischral, A., & Guerra, M. M. (2011). Comparison of CapriPure® and Percoll® density gradients for sperm separation of frozen-thawed goat spermatozoa. *Animal Reproduction*, 8(3–4), 81–84.
- Bedasa, S., Kebede, A., & Abraha, A. (2017). Review On Reproductive Biotechnology And Its Role In Dairy Cattle Production And Health, *Report and Opimion*, 9(3), 60–70. <https://doi.org/10.7537/marsroj090317.10.Keywords>.
- Benchaïb, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., & Guérin, J. F. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 18(5), 1023–1028. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg228>.
- Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3), 282–288. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200003\)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7).

- Bisla, A. (2020). Comparative Efficacy of Percoll™ Discontinuous Density Gradient Centrifugation and Glass Wool Filtration Techniques for Spermatozoa Selection in Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Animal Research*, 10(2). <https://doi.org/10.30954/2277-940x.02.2020.3>.
- Bollwein, H., & Bittner, L. (2018). Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. *Animal Reproduction*, 15(Suppl. 1), 703–710. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0041>.
- Bolton, V. N., & Braude, P. R. (1984). Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilization by isopycnic centrifugation on self-generating density gradients. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 13(2–3), 167–176. <https://doi.org/10.3109/01485018408987515>.
- Borg, K., Colenbrander, B., Fazeli, A., Parlevliet, J., & Malmgren, L. (1997). Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 48(4), 531–536. DOI: 10.1016/s0093-691x(97)00269-0.
- Centola, G. M., Herko, R., Andolina, E., & Weisensel, S. (1998). Comparison of sperm separation methods: Effect on recovery, motility motion parameters and hyperactivation. *Fertility and Sterility*, 70(6), 1173–1175. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00352-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00352-5).
- Chen, M. J., & Bongso, A. (1999). Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction*, 14(3), 759–764. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.3.759>.
- Christensen, P., Brockhoff, P. B., & Lehn-Jensen, H. (1999). The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(6), 503–507. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1999.tb01410.x>.
- Codognoto, V. M., Yamada, P. H., Schmith, R. A., de Ruediger, F. R., Scott, C., de Faria Lainetti, P., ... Oba, E. (2018). Functional insights into the role of seminal plasma proteins on sperm motility of buffalo. *Animal Reproduction Science* 195, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.002>.
- Correa, J. R., Heersche, G., & Zavos, P. M. (1997). Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology*, 47(3), 715–721. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00029-0).
- Correa, J. R., Rodriguez, M. C., Patterson, D. J., & Zavos, P. M. (1996). Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, 46(3), 413–420. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00163-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00163-X).
- Correa, J. R., & Zavos, P. M. (1995). Frozen-thawed bovine spermatozoa diluted by slow or rapid dilution method: Measurements on occurrence of osmotic shock and sperm viability. *Theriogenology*, 44(7), 963–971. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00283-E](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00283-E).

- Cummins, J. M., & Woodall, P. F. (1985). On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75(1), 153–175. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0750153>.
- Danasouri, I. El. (1988). Effect of thawing temperature on the loss of acrosin and hyaluronidase enzymes from bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 29(6), 1343–1346. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90014-3).
- De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1993). Effects of Various Cryoprotective Agents and Membrane-Stabilizing Compounds on Bull Sperm Membrane Integrity after Cooling and Freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32–44. <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1005>.
- De Jarnette, J. M., Barnes, D. A., & Marshall, C. E. (2000). Effects of pre- and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*, 53(6), 1225–1238. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00267-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00267-3).
- Deswal, S. A. K. (2018). A Bull Breeding Soundness Evaluation System with Greater Emphasis on Molecular Genetics. *Journal of Dairy Science and Technology*, 7(2), 15–20.
- Dhami, A. J., Sahni, K. L., & Mohan, G. (1992). Effect of various cooling rates (from 30°C to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of and semen. *Theriogenology*, 38(3), 565–574. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90076-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90076-4).
- Diskin, M. G., Parr, M. H., & Morris, D. G. (2012). Embryo death in cattle: An update. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 244–251. <https://doi.org/10.1071/RD11914>.
- Fiser, P. S., Ainsworth, L., & Fairfull, R. W. (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28(5), 599–607. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90276-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90276-7).
- Forde, B., & Gravir, K. (1974). A uniform method of thawing frozen semen. *Animal Breed*, 42, 432.
- Gagnon, C., & de Lamirande, E. (2006). Controls of sperm motility. In C. J. De Jonge & C. Barratt (Eds.), *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration* (pp. 108–133). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511545115.006>
- Garcia-Paloma, J. A. (2015). A bull breeding soundness evaluation system with greater emphasis on scrotal circumference. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 35(9), 817–821. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2015000900008>.
- García-Vazquez, F., Gadea, J., Matas, C., & Holt, W. (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 844–850. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.186880>.
- Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Alvarez, J. G., Thomas, A. J., & Agarwal, A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human*

- Reproduction*, 16(9), 1922–1930. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.9.1922>.
- Gilmore, J. A. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*, 15(2), 335–343. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.2.335>.
- Gordon, I. (2003). Laboratory production of cattle embryos. In I. Gordon (Ed.), *Laboratory production of cattle embryos*. <https://doi.org/10.1079/9780851996660.0000>.
- Guthrie, H. D., Liu, J., & Critser, J. K. (2002). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 67(6), 1811–1816. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.6.1811>.
- Güney, H. Ö., & İleri, İ. K. (1991). Paillette yöntemine göre dondurulmuş boğa spermasının farklı ısı ve sürelerde eritilmesinin ve eritme sonrası düşük ısı uygulamalarının spermatozoitlerin motilite ve morfolojik yapıları üzerine etkisi. *İstanbul Üni., Vet. Fak. Dergisi*, 17(11), 75–91.
- Hafez, B., & Hafez, E. S. E. (Eds.) (2000). *Reproduction in Farm Animals*, 7th Edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119265306>
- Haidl, G. (1990). Macrophages in Semen are Indicative of Chronic Epididymal Infection. *Archives of Andrology*, 25(1), 5–11. <https://doi.org/10.3109/01485019008987587>.
- Henkel, R., & Schill, W.-B. (2009). Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia*, 30(S1), 91–97. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1998.tb02832.x>.
- Ho, H. C., & Suarez, S. S. (2001). An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca<sup>2+</sup> store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biology of Reproduction*, 65(5), 1606–1615. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1606>.
- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4).
- Holt, W. V., & Fazeli, A. (2016). Sperm storage in the female reproductive tract. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 291–310. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111350>.
- Hossain, M., Khatun, M., Islam, M., & Miazi, O. (2012). Semen characteristics of breeding bulls at the Central Cattle Breeding and Dairy Farm of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 41(1), 1–5. <https://doi.org/10.3329/bjas.v41i1.11968>.
- İleri, İ.K. & Ak, K. (1993). Payet yöntemine göre dondurulmuş boğa spermasının eritilmesinde eritme ısı ve sürelerinin spermatozoitlerin motilite ve akrozom yapıları üzerine etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Munich Ludwig-Maximillian Üniversitesi Veteriner Fakültesi Türk-Alman Günleri, 29-30 Nisan-Mayıs Tebliğler*, 58–62.



- İleri, İ.K., Ak, K. & Pabuççuoğlu, S., Birler, S. (1998). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. *İstanbul Üni., Vet. Fak. Yayını*, p. 23.
- Jamil, H, Samad, HA, Qureshi, ZI, Rehman, N, Lodhi, L. (2007). Effect of Bull and Sperm Preparation Method on in Vitro Fertilization of Buffalo Oocytes. *Pakistan Veterinary Journal*, 27(1), 29–34.
- Januskauskas, A., & Zilinskas, H. (2002). Bull Semen Evaluation Post-Thaw and Relation of Semen Characteristics To Bull's Fertility Bulių Spermos Kokyb S Įvertinimas Po Atsildymo Bei Spermos Kokyb S. *Veterinarija Ir Zootechnika*, 17(39).
- Juyena, N. S., & Stelletta, C. (2012). Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33(4), 536–551. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583>.
- Kawakami, E., Vandevort, C. A., Mahi-Brown, C. A., & Overstreet, J. W. (1993). Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biology of Reproduction*, 48(4), 841–845. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.4.841>.
- Keck, C. (1998). Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Human Reproduction Update*, 4(6), 891–903. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.6.891>.
- Köhn, F.M., Erdmann, I., Oeda, T., El Mulla, K. F., Schiefer, H. G., & Schill, W. B. (2009). Influence of urogenital infections on sperm functions. *Andrologia*, 30(S1), 73–80. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1998.tb02829.x>.
- Kusakabe, H., Szczygiel, M. A., Whittingham, D. G., & Yanagimachi, R. (2001). Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13501–13506. <https://doi.org/10.1073/pnas.241517598>.
- Küçükaslan, Ö., Yerlikaya, N., & Yiğit, A. (2018). Contributions of Foreign Scientists to the Turkish Veterinary Medicine and Animal Husbandry in the Early Republican Period (1923-1933). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 24(1), 45–51. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2017.18257>.
- Larson, K. L. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human Reproduction*, 15(8), 1717–1722. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.8.1717>.
- Lindemann, C. B., & Kanous, K. S. (1989). Regulation of Mammalian Sperm Motility. *Archives of Andrology*, 23(1), 1–22. <https://doi.org/10.3109/01485018908986783>.
- Maes, D., Lopez Rodriguez, A., Rijsselaere, T., Vyt, P., & Van Soom, A. (2011). Artificial Insemination in Pigs. In *Artificial Insemination in Farm Animals*. <https://doi.org/10.5772/16592>.
- Malmgren, L. (1998). Effectiveness of two systems for transporting equine semen. *Theriogenology*, 50(6), 833–839. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00188-5).

- Marti, E., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T., & Cebrian-Perez, J. A. (2006). Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 27(6), 746–753. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000109>.
- Mehmood, A., Anwar, M., & Naqvi, S. M. S. (2009). Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science*, 111(2–4), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.02.011>.
- Menon, A. G., Barkema, H. W., Wilde, R., Kastelic, J. P., & Thundathil, J. C. (2011). Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(4), 241–247.
- Monga, M., & Roberts, J. A. (1994). Spermagglutination by Bacteria: Receptor-Specific Interactions. *Journal of Andrology*, 15(2), 151–156. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1994.tb00423.x>.
- Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>.
- Morrell, J.M. (2011). Artificial Insemination: Current and Future Trends. In *Artificial Insemination in Farm Animals*. <https://doi.org/10.5772/17943>.
- Murphy, E. M., Kelly, A. K., O’Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in holstein friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *Journal of Animal Science*, 96(6), 2408–2418. <https://doi.org/10.1093/jas/sky130>.
- Nagata, M. B., Egashira, J., Katafuchi, N., Endo, K., Ogata, K., Yamanaka, K., ... Yamashita, K. (2019). Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0395-9>.
- Naz, R. K., & Evans, L. (1998). Presence and modulation of interleukin-12 in seminal plasma of fertile and infertile men. *Journal of Andrology*, 19(3), 302–307. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb02009.x>.
- Noakes, D. E., Timothy, J. P., & England G. C. W. (Eds). (2001). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, Eight edition, China: WB SAUNDERS. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2556-3.X5001-4>.
- Nur, Z., Seven-Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, C. I., ... Soyly, M. K. (2012). The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43(1), 31–38. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1>.
- Nur, Z., & Soyly, M. K. (2003). Donmuş Boğa Spermasında Plazma Membran Sağlamlığının Morfolojik Bulgularla Karşılaştırılması. Uludag University

Journal of Faculty of Veterinary Medicine. 22(1-2-3), 51-55.

- Nur, Z., Zık, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H., & Ozguden, C. G. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73(9), 1267–1275. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.007>.
- Nur, Z., Zık, B., Üstüner, B., Tütüncü, Ş., Sağırkaya, H., Özgüden CG., ... Doğan İ. (2011). Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 58(4), 267–272. [https://doi.org/10.1501/Vetfak\\_0000002486](https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002486).
- Nur, Z. (2019). Spermanın Alınması ve Muayenesi ve Spermanın Saklanması ve Eritilmesi. In M.K. Soylu (Ed.) *Doğum Bilgisi ve Suni Tohumlama* (2. baskı). (pp. 18-59) Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları. <https://www.aof.tc/dogum-bilgisi-ve-suni-tohumlama-lbv208u-ders-kitabi.html>
- Ombelet, W., & Van Robays, J. (2015). Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts, Views & Vision in ObGyn*.
- Orland, B. (2017). The invention of artificial fertilization in the eighteenth and nineteenth century. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 39(2), 11. <https://doi.org/10.1007/s40656-017-0136-3>.
- Pace, M. M., Sullivan, J. J., Elliott, F. I., Graham, E. F., & Coulter, G. H. (1981). Effects of Thawing Temperature, Number of Spermatozoa and Spermatozoal Quality on Fertility of Bovine Spermatozoa Packaged in .5-ml French Straws I. *Journal of Animal Science*, 53(3), 693–701. <https://doi.org/10.2527/jas1981.533693x>.
- Parrish, J. J., Krogenaes, A., & Susko-Parrish, J. L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44(6), 859–869. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9).
- Payan-Carreira, R., Miranda, S., & Nizanski, W. (2011). Artificial Insemination in Dogs. In *Artificial Insemination in Farm Animals*. <https://doi.org/10.5772/20630>.
- Pegg, D. E. (2002). The History and Principles of Cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 20(1), 005-014. <https://doi.org/10.1055/s-2002-23515>.
- Pickett, B. W., & Berndtson, W. E. (1974). Preservation of Bovine Spermatozoa by Freezing in Straws: A Review. *Journal of Dairy Science*, 57(11), 1287–1301. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)85058-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)85058-7).
- Pickett B.W., Berndtson, W.E . (1980). Procedures for handling frozen bovine semen in the field. In D.A. Morrow. (Ed.). London: W.B. Saunders Company.
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkers, A. S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164(4172), 666–666. <https://doi.org/10.1038/164666a0>.
- Pruneda, A., Pinart, E., Dolors Briz, M., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., ... Bonet, S. (2005). Effects of a high semen-collection frequency on the quality of

- sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology*, 63(8), 2219–2232. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.009>.
- Reda, A. A., Almaw, G., Abreha, S., Tadeg, W., & Tadesse, B. (2020). Bacteriospermia and Sperm Quality of Cryopreserved Bull Semen Used in Artificial Insemination of Cows in South Wollo Zone, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2020, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/2098315>.
- Ritar, A. J., Ball, P. D., & O'May, P. J. (1990). Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 2(1), 27–34. <https://doi.org/10.1071/RD9900027>.
- Robbins, R. K., Saacke, R. G., & Chandler, P. T. (1976). Influence of Freeze Rate, Thaw Rate and Glycerol Level on Acrosomal Retention and Survival of Bovine Spermatozoa Frozen in French Straws1. *Journal of Animal Science*, 42(1), 145–154. <https://doi.org/10.2527/jas1976.421145x>.
- Rodriguez-Martinez, H. (2014). Semen evaluation and handling: Emerging techniques and future development. In *Animal Andrology: Theories and Applications* (pp. 509–549). <https://doi.org/10.1079/9781780643168.0509>.
- Saacke, R.G., White, J. M. (1970). Acrosomal alterations of freezed-thawed bovine sperm. *J. Animal Science*, 31, 229–230.
- Saacke, R.G., White, J. M. (1972). Semen quality tests and their relationship to fertility. *Animal Reproduction*.
- Saacke, R.G. (2008). Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, 70(3), 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.012>.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3–4), 185–249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-I](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I).
- Samardzijaa, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., ... Karadjole, T. (2006). A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*, 91(3–4), 237–247. <https://doi:10.1016/j.anireprosci.2005.04.005>.
- Sanocka, D., Frączek, M., Jędrzejczak, P., Szumała-Kąkol, A., & Kurpisz, M. (2004). Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *Journal of Reproductive Immunology*, 62(1–2), 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2003.10.005>.
- Seidel, G. E. (2012). Several insights on evaluation of semen. *Anim Reprod*, 9(3), 329–332.
- Selçuk, M., Akal, E., & Çelebi, M. (2014). In Vitro Evaluation of Frozen Bull Sperm Thawed in The Different Systems. *Kocatepe Veterinary Journal*, 7(1), 33–37. <https://doi.org/10.5578/kvj.7451>.
- Senger, P. L. (1980). Handling frozen bovine semen — Factors which influence viability and fertility. *Theriogenology*, 13(1), 51–62.

[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(80\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(80)90014-X).

- Simon, C., & Polan, M. L. (1994). Cytokines and reproduction. *Western Journal of Medicine*, 160(5), 425–429.
- Somfai, T., Bodó, S., Nagy, S., Papp, Á. B., Iváncsics, J., Baranyai, B., ... Kovács, A. (2002). Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(5), 285-290. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00350.x>.
- Staub, C., & Johnson, L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal*, 12, s27–s35. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000435>.
- Storey, B. T., Noiles, E. E., & Thompson, K. A. (1998). Comparison of Glycerol, Other Polyols, Trehalose, and Raffinose to Provide a Defined Cryoprotectant Medium for Mouse Sperm Cryopreservation. *Cryobiology*, 37(1), 46–58. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2097>.
- Thibier, M., & Guerin, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 233–251. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00161-5).
- Thompson, F. N. (2004). Female reproduction in mammals. In W. O. Reece (Ed.), *Dukes' physiology of domestic animals* (12th ed., pp. 692–719). USA: Comstock Publishing Associates.
- Tourmente, M., Villar-Moya, P., Rial, E., & Roldan, E. R. S. (2015). Differences in ATP Generation Via Glycolysis and Oxidative Phosphorylation and Relationships with Sperm Motility in Mouse Species. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33), 20613–20626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.664813>.
- TÜİK (2020) Türkiye Suni Tohumlama Faaliyetleri <http://www.tuik.gov.tr> (10.07.2020).
- Valverde, A., Arenán, H., Sancho, M., Contell, J., Yániz, J., Fernández, A., & Soler, C. (2016). Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian Journal of Andrology* 18(6), 851-857. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187579>.
- Van der Ven, H. H., Jeyendran, R. S., Al-Hasani, S., Perez-Pelaez, M., Diedrich, K., & Zaneveld, L. J. (1986). Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *Journal of Andrology*, 7(3), 190-196. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1986.tb00909.x
- Varner, D. D. (2007). From A Sperm's Eye View – Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. *Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 53, 104–177.
- Velho, A. L. C., Menezes, E., Dinh, T., Kaya, A., Topper, E., Moura, A. A., & Memili, E. (2018). Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *PLOS ONE*, 13(4), e0195279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195279>.
- Vincent, P., Underwood, S. L., Dolbec, C., Bouchard, N., Kroetsch, T., & Blondin, P.

- (2014). Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. In *Bovine Reproduction* (pp. 685–695). <https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch74>.
- Vishwanath, R. (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, 59(2), 571–584. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01241-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01241-4).
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 23–53. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6).
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3).
- William, V. H., & Fazeli, A. (2016). Sperm Storage in the Female Reproductive Tract. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 291–310. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111350>.
- Woelders, H. (1991). Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. In *Reproduction in Domestic Animals* (pp. 145–164).
- Woelders, H., Matthijs, A., & Engel, B. (1997). Effects of Trehalose and Sucrose, Osmolality of the Freezing Medium, and Cooling Rate on Viability and Intactness of Bull Sperm after Freezing and Thawing. *Cryobiology*, 35(2), 93–105. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2028>.
- Yamada, A., Sakase, M., Fukushima, M., & Harayama, H. (2018). Reconsideration of the evaluation criteria for bull ejaculated sperm motility in the context of rotation. *Journal of Reproduction and Development*, 64(5), 377–384. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-036>.
- Yamanaka, M., Tomita, K., Hashimoto, S., Matsumoto, H., Satoh, M., Kato, H., ... Morimoto, Y. (2016). Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms. *Journal of Reproduction and Development*, 62(6), 599–606. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-112>.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371–372. <https://doi.org/10.1017/S0967199400002240>.
- Yavaşca, I., Ak, K. & İleri, İ.K. (1999). Einwirkungen verschiedener umgebungstemperaturen und besamungszeiten auf die fertilitat der nach paillettenverfahren tiefgefrorenen und aufgetauten bullenspermien. *Istanbul Üni., Vet. Fak. Dergisi*, 25, 215–223.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	yüzde oranı
$\mu$	mikron
$\mu$ l	mikrolitre
ATP	adenozin trifosfat
BSA	sığır serum albümini
$Ca^{2+}$	kalsiyum iyonu
cAMP	siklik adenzin monofosfat
CFU	koloni oluşturan birim (colony-forming unit )
CPE	corona penetrasyon enzimi
dk	dakika
DMSO	dimetilsülfoksit
FITC-PSA	floresein izotiyosiyanat–pisum sativum agglutinin
FSH	folikül uyarıcı hormon
g	gram
H	hidrojen
$H_2O_2$	hidrojen peroksit
$HCO_3$	bikarbonat
HOST	hyposmotic swelling test
$K^+$	potasyum iyonu
Kg	kilogram
$Mg^{2+}$	magnezyum iyonu
ml	mililitre
mOsm	miliosmol
MTA	maden tetkik arama enstitüsü
N	normalite
$Na^+$	sodyum iyonu
nm	nanometre
nM	nanomolar
IVF	in vitro fertilizasyon
O	oksijen
$^{\circ}C$	santigrat derece
OXPPOS	oksidatif fosforilasyon
P	probability; olasılık
pH	çözeltilinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
ROS	serbest oksijen parçacıkları
sn	saniye

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, embryo transferinin yaygınlaşmasında ülkemizde öncü olan saygı değer danışman hocam Prof.Dr. Hakan Sağırkaya, Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı öğretim üyeleri; Prof.Dr. Mustafa Kemal Soylu, Prof.Dr. İbrahim Doğan, Prof.Dr. Ülgen Günay, Prof.Dr. Zekariya Nur, Doç.Dr. Burcu Üstüner 'e çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen, hayatımın her evresinde bana destek olan değerli eşim Meral Ertürk 'e, kızlarım Defne ve Aslı 'ya, Veteriner Hekimlik mesleğini ve gerekliliklerini yerine getirmemde katkısı olan tüm Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Görevlilerine, ilk öğretmenlerim sevgili Anne ve Babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca ULUOVA Süt Tic. A.Ş. Yönetim Kurulu Başkanı Mehmet Akif Hut, Genel Müdür Mesut Buran 'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Son olarak tezimin tamamlanmasında büyük yardımları olan Doç.Dr. Sercan Karav ve çok değerli araştırma ekibine teşekkür ederim.

Melih ERTÜRK  
Bursa, Ocak 2022



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

İsim SOYİSİM : Melih ERTÜRK

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Bölümü, 2008  
Doktora Öğrenimi : Uludağ Üniversitesi, Lisansüstü, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 2021  
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar

Kaplan, M., Arslan, A., Duman, H., Karyelioğlu, M., Baydemir, B., Günar, B. B., Alkan, M., Bayraktar, A., Tosun, H. İ., Ertürk, M., Eskici, G., Duar, R. M., Henrick, B. M., Frese, S. A., & Karav, S. (2022). Production of Bovine Colostrum for Human Consumption to Improve Health. *Frontiers in Pharmacology*, 12(January)

Arslan, A., Duman, H., Kaplan, M., Uzkuç, H., Bayraktar, A., Ertürk, M., ... & Karav, S. (2021). Determining Total Protein and Bioactive Protein Concentrations in Bovine Colostrum. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (178).

Arslan, A., Kaplan, M., Duman, H., Bayraktar, A., Ertürk, M., Henrick, B. M., Frese, S. A., & Karav, S. (2021). Bovine Colostrum and Its Potential for Human Health and Nutrition. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 8).

Sucu, B., Bayraktar, A., Duman, H., Arslan, A., Kaplan, M., Karyelioğlu, M., Ntelitze, E., Taştekin, T., Yetkin, S., Ertürk, M., Frese, S. A., Henrick, B. M., Kayili, H. M., Salih, B., & Karav, S. (2021). Recombinant Production of Bifidobacterial Endoglycosidases for N-glycan Release. *Journal of Visualized Experiments*, 173.

Guner, B., Erturk, M., Yilmazbas-Mecitoglu, G., Keskin, A., Karakaya-Bilen, E., Cakircali, R., ... & Gumen, A. (2020). Effect of delaying the time of insemination with sex-sorted semen on pregnancy rate in Holstein heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(10), 1411-1417.

Nur, Z., Seven-Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, C. I., ... & Soyly, M. K. (2012). The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43(1), 31-38.

## **b) Bildiriler**

Güner B., Ertürk M., Yenitavşanlı M., Serim E., Yılmazbaş Mecitoğlu G., Keskin A., Gümen A., Sütçü Düvelerde Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma İle Östrusun Farklı Saatlerinde Yapılan Tohumlamanın Gebelik Oranı Üzerine Etkisi. TVJD VII. Ulusal Kongresi & I. Uluslararası Kongresi, Marmaris 12-15 Ekim 2017, Tebliğ Özetleri Kitabı (Sözlü Bildiri).

Ertürk M., Güner B., Çapacı A., Serim E., Keskin A., Gümen A., Sütçü Düvelerde Farklı Boğalara Ait Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ile Yapılan Tohumlamaların Gebelik Oranı Üzerine Etkisi. TVJD VII. Ulusal Kongresi & I. Uluslararası Kongresi, Marmaris 12-15 Ekim 2017, Tebliğ Özetleri Kitabı (Sözlü Bildiri).

ÜSTÜNER B., ERTÜRK M., ALÇAY S., TUNA B., ÜSTÜNER H., NUR Z., The effect of progesterone - supplemented co - synch synchronization method and insemination dose on goat's conception rate. IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Tebliğ Özetleri Kitabı (Sözlü Bildiri), F.Ü. Veteriner Fakültesi, Antalya 4 - 7 Kasım 2010

SAĞIRKAYA H., NAK Y., NAK D., NUR Z., ÜSTÜNER B., TUNA B., ŞİMŞEK G., ERTÜRK M., Kıvırcık Irkı Koyunlarda Sezon İçi ve Dışı Dönemde Süperovulasyon Uygulamaları. V. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Tebliğ Özetleri Kitabı (Poster Bildiri), ELAZIĞ 01 - 04 Ekim 2009.

Çetin S, Temizel E.M, Erturk M, Aytuğ N. Sağlıklı ve renal hastalığa sahip kedilerde thyroid hormonları, bazı serum biyokimyasal ve hematolojik parametrelerin karşılaştırılması. IV. Ulusal küçük hayvan hekimliği kongresi (Uluslararası Katılımlı), Tebliğ Özetleri Kitabı (Sözlü Bildiri). BURSA 24 - 27 Ni san 2008.

Erturk M, Temizel E.M, Çetin S, Aytuğ N. Sağlıklı ve renal hastalığa sahip kedilerde thyroid hormonları, bazı serum biyokimyasal ve hematolojik parametrelerin karşılaştırılması. X. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel AraGtırma Kongresi, Tebliğ Özetleri Kitabı (Sözlü Bildiri). İSTANBUL 15 - 17 May 2008.

Ertürk M., Yalçın M., Merkezi olarak enjekte edilen fosfolipaz A2 aktivatörü olan melittin'in kardiyovasküler etkilerinde periferal adrenerjik, vazopresinerjik ve renin anjiotensin sistemin aracılığı. IX. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel AraGtırma Kongresi, Tebliğ Özetleri Kitabı (Sözlü Bildiri). İSTANBUL 10 - 12 Mayıs 2007.

Ertürk M., Ak F., Yalçın M. Anestezi altındaki sıçanlarda serebral yan ventriküle enjekte edilen eritropoietinin solunum sistemine etkisi. XIII. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel AraGtırma Kongresi, Tebliğ Özetleri Kitabı (Sözlü Bildiri). İSTANBUL 11 - 13 Mayıs 2006

Ertürk M., Ak F. , Yalçın M., Cengiz F. Anestezi altındaki sıçanlarda serebral yan ventriküle enjekte edilen eritropetin kardiyovaskuler parametreler ve beden ısısına etkisi. III. Ulusal küçük hayvan hekimliği kongresi (Uluslararası Katılımlı), Tebliğ Özetleri Kitabı (Poster Bildiri). B URSA 18 - 21 Mayıs 2006.

Ak F. , Ertürk M., Yalçın M. Hemorajik Gok oluşturulmuş sıçanlarda serebral yan ventriküle enjekte edilen melittin'in kardiyovaskuler sistem üzerine etkisi ve beyindeki endogen tromboksan A2' nin aracılığı. III. Ulusal Küçük Hayvan Hekimliği Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Tebliğ Özetleri Kitabı (Poster Bildiri). BURSA 18 - 21 Mayıs 2006

**c) Katıldığı Projeler**

Modern Biyoteknolojik Yöntemler Kullanılarak Dondurulmuş Koç Spermisi ve Cinsiyeti Belirli İnek Embriyosu Üretim TUBITAK KAMAG- 107G094, Bursiyer