

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA (VETERİNER) ANA BİLİM DALI



**DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ HOLŞTAYN IRKI BOĞA
SPERMASININ MORFOLOJİ TESPİTİNDE FARKLI
METODLARIN KARŞILAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

İsmail YAMAK

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.21.016 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

İsmail YAMAK tarafından, Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL danışmanlığında hazırlanan “DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ HOLŞTAYN IRKI BOĞA SPERMASININ MORFOLOJİ TESPİTİNDE FARKLI METODLARIN KARŞILAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 10.5.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Mesut ÇEVİK Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa BODU Selçuk Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

06 /01 / 2023
İsmail YAMAK

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ HOLŞTAYN IRKI BOĞA SPERMASININ MORFOLOJİ TESPİTİNDE FARKLI METODLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 06.01.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 10

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

06 /01 / 2023
Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL

ÖZET

DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ HOLŞTAYN IRKI BOĞA SPERMASININ MORFOLOJİ TESPİTİNDE FARKLI METODLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

İsmail YAMAK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Dölerme ve Suni Tohumlama (Veteriner) Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Ocak/2023

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL

Hayvanlarda görülen düşük fertilitenin en önemli nedeni ejakülat içerisindeki spermatozoa ve akrozomda meydana gelen bozukluklardan kaynaklanır. Sperma morfolojisi erkek üreme kapasitesinin belirlemede çok önemli bir göstergedir. Spermada morfolojik bozuklukların saptanması amacıyla birçok metot mevcuttur. Bu tez çalışmasında dondurulmuş çözündürülmüş boğa spermasında spermatozoon morfolojisinin değerlendirilmesinde, sıvı fizyasyon metodu (Hancock), SpermBlue® ile boyama, Spermac® ile boyama, Diff-Quick® ile boyama ve Papanicolaou® ile boyama yöntemleri kullanılarak, dondurulmuş-çözündürülmüş spermalarda anormal spermatozoa oranı tespitinde kullanılan farklı yöntemlerin uygulanabilirliği, geçerliliği ve doğrulukları hakkında değerlendirmeler yapılması ve anormal spermatozoa oranı tespitinin saptanmasında farklı yöntemlerle elde edilen bulgular arasındaki farklılıklar ve benzerliklerin ortaya konması amaçlanmıştır. Holstein ırkı boğalardan aynı tarihte ve ortak koşullarda toplanan (n:50) spermalardan elde edilen 0,25 ml'lik dondurulmuş payetler kullanıldı. Anormal spermatozoa oranını belirlemek amacıyla yukarıda belirtilen beş farklı metot kullanıldı. Baş-akrozom kısmına ait, gövde kısmına ait, kuyruk kısmına ait anomaliler ayrı ayrı değerlendirildi. Elde edilen baş-akrozom kısmına ait anomali sonuçları değerlendirildiğinde Spermac®, Diff-Quick® ve Papanicolaou® ile ulaşılan sonuçlar istatistiki anlama benzerlik göstermiştir ($p>0,05$). Gövde kısmına ait anomali sonuçları değerlendirildiğinde Hancock ve SpermBlue® ile ulaşılan sonuçlar istatistiki anlamda benzerlik göstermiştir ($p>0,05$). Kuyruk kısmına ve total anomaliye ait anomali sonuçları değerlendirildiğinde bütün metotlar ile ulaşılan sonuçlar istatistiki anlama benzerlik göstermiştir ($p>0,05$). Tez çalışmamız sonucunda anormal spermatozoanın değerlendirilmesinde bu beş yöntemden birbirini doğrulaması açısından daha çok Diff-Quick®, Papanicolaou® ve Spermac® yöntemleri birbiri arasında tutarlıdır ve tercih edilmesi önerilir.

Anahtar Sözcükler: Boğa, sperm morfolojisi, Diff-Quick, Hancock, Papanicolaou, Spermac, SpermBlue

ABSTRACT

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS IN DETERMINING THE MORPHOLOGY OF FROZEN-FROSTED HOLSTEIN BULL SPERM

İsmail YAMAK

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Reproduction and Artificial Insemination

Master, January/2023

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Eser AKAL

The most important cause of infertility in animals is due to defects in the spermatozoa and acrosome in the ejaculate. Sperm morphology is a very important indicator of male reproductive capacity. There are many methods for detecting morphological disorders in sperm. In this thesis study, the evaluation of sperm morphology in frozen-thawed bull semen, determination of abnormal spermatozoa ratio in frozen-thawed semen using liquid fixation method (Hancock), staining with SpermBlue®, Spermac®, Diff-Quick® and Papanicolaou®. It is aimed to evaluate the applicability, validity and accuracy of the different methods used and to reveal the differences and similarities between the findings obtained by different methods in determining the abnormal spermatozoa ratio. 0.25 ml frozen straws obtained from semen (n:50) collected on the same date and under common conditions from Holstein bulls were used. Five different methods mentioned above were used to determine the abnormal spermatozoa rate. Abnormality of the head-acrosome part, the body part, and the tail part were evaluated separately. When the abnormality results of the head-acrosome part were evaluated, the results obtained with Spermac®, Diff-Quick® and Papanicolaou® showed statistically similarity ($p>0.05$). When the abnormality results of the trunk part were evaluated, the results obtained with Hancock and SpermBlue® showed statistical significance ($p>0.05$). When the abnormality results of the body part an total anomaly were evaluated, the results obtained with all methods showed statistically similarity ($p>0.05$). As a result of our thesis study, Diff-Quick®, Papanicolaou® and Spermac® methods are more consistent among each other and it is recommended to be preferred in terms of confirming each other among these five methods in the evaluation of abnormal spermatozoa.

Keywords: Bull, sperm morphology, Diff-Quick, Hancock, Papanicolaou, Spermac, SpermBlue

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca tecrübe ve birikimlerinden ders aldığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer yüksek lisans danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL başta olmak üzere, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mesut ÇEVİK'e, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Murat SELÇUK ve Doç. Dr. Alper KOÇYİĞİT'e çalışmalarında yardıma ihtiyaç duyduğumda her an yanımda olan Araş. Gör. Burcu ESİN, Araş. Gör. Cumali KAYA, Vet. Hek. Melih AKAR, Vet. Hek. Deniz ERDURDU'ya ve araştırmamıza (PYO.VET.1904.21.016) sağladığı maddi destekten dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi'ne teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca destekleriyle yanımda olan “değerli aileme” sonsuz teşekkür ederim.

İsmail YAMAK

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Sperma Kriyoprezervasyonu ve Spermatolojik Parametrelere Etkisi	2
1.2. Sperma Muayenesi.....	4
1.2.1. Spermanın Makroskopik Muayenesi	4
1.2.2. Spermanın Mikroskopik Muayenesi	5
1.2.3. Spermanın Fiziksel ve Kimyasal Muayenesi	12
2. MATERYAL VE METOT	14
2.1. Sıvı İle Fikzasyon Metodu (Hancock)	15
2.2. SpermBlue® İle Boyama	15
2.3. Spermac® İle Boyama	16
2.4. Diff-Quick® İle Boyama	16
2.5. Papanicolaou® İle Boyama	17
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	20
4. SONUÇ	20
KAYNAKLAR	26
ÖZGEÇMİŞ.....	28

SİMGELER VE KISALTMALAR

⁰ C	: Sıcaklık
CASA	: Bilgisayarlı sperm analiz cihazı
CPE	: corona penetrasyon enzimi
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
HOST	: Hipoozmotik şişme testi
Ml	: mililitre
pH	: Potansiyel hidrojen
sn	: Saniye
WHO-DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
µl	: mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Laboratuvarıda örneklerin hazırlanması	15
Şekil 2.2. Laboratuvarıda Spermac® ile SpermBlue® örneklerinin hazırlanması	16
Şekil 2.3. Laboratuvarıda Diff-Quick® örneklerinin hazırlanması	17
Şekil 2.4. Anormal spermatozoa görüntüleri	18
Şekil 2.5. Laboratuvarıda örneklerin hazırlanması ve mikroskop ortamında değerlendirmelerin yapılması.....	19



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Spermanın kitle hareketinin değerlendirilmesi	6
Tablo 3.1. Spermatozon morfolojisi değerleri	207
Tablo 3.2. Spermatozon morfolojisinin sonuçları ve istatistiki bilgileri	20



1. GİRİŞ

Günümüzde birçok memeli türünden elde edilen spermalar, dondurma işlemi sayesinde başarılı bir şekilde muhafaza edilebilmektedir. Spermada, dondurularak saklanma işleminin ilk kez 1945 yılında yapıldığı bildirilmiştir. Boğa spermalarının dondurularak saklanması ve çözündürülerek suni tohumlama uygulamalarında kullanılması ile genetik kapasitesi üstün ırkların yaygınlaştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda dondurma ve çözdürme süreçlerinde canlı spermatozoa sayısının yüksek tutulmasını sağlamak amacıyla suni tohumlama merkezleri kurulmuştur. Aynı şekilde, bu merkezlerde spermaların sağlıklı boğalardan doğru bir şekilde alınması ve saklanması işlemleri de yapılmaktadır (Hansen, 2009).

Hayvansal üretim ve biyoteknolojisi açısından yüksek verim elde edilen hayvan türlerinin genetik olarak iyileştirilmesi, hastalıkların kontrolü, üremenin artırılması, sürdürülebilir bir gıda-tarım endüstrisinin başarısı için önemli bir etkiye sahiptir. Modern hayvancılığın gelişmesi açısından da oldukça önemlidir (Bailey et al., 2000).

Çağlar boyunca hem hayvanlarda hem de insanlarda görülen kısırlık önemli problem teşkil etmiştir. Çiftlik hayvanlarında artan kısırlık sorunu doğurganlık seviyesinde azalmada artışa neden olmuş, hayvanların kesime sevk miktarı artmış ve bu da hayvan refahında ve çiftlik ekonomisinde bozulmalara sebep olmuştur (Kumaresan et al., 2020). Spermatozoon motilitesi ve morfolojisinin değerlendirilmesi sperma ile doğurganlık ilişkilerinin belirlenmesinde önemli bir parametredir (Verstegen et al., 2002).

Evcil hayvanlarda verimin en önemli parametresi sayılan döl verimi, süt ve et gibi önemli ekonomik verimlerin sürekliliğinin garantisidir (İşler vd., 1987). Suni tohumlama amacı ile kullanılacak erkek hayvanların bakım ve beslenmesi son derece önemlidir. Suni tohumlama ya da doğal aşım da kullanılan damızlık erkek hayvanlara bağlı olarak şekillenen infertilite veya sterilite büyük oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Ata vd., 2014). Suni tohumlama yöntemiyle erkek damızlıklardan daha fazla ölçüde yararlanılır. Doğal aşım ile bir boğa yılda ortalama 60-100 inek ile çiftleşebilirken, boğa spermasının sulandırılması ve dondurularak saklanması ile 6-10 bin ineğe suni tohumlama uygulaması yapılabilir (Keskin, 1995).

Suni tohumlama gelişmekte olan dünyada hızla büyüyen sektörlerden biridir.

Süt hayvancılığını geliştirmek için umut verici bir araç olarak görülmektedir (Delgado et al., 2001; Foote, 2010). Suni tohumlama ile üstün bir babadan çok sayıda yavru üretilebilir. Böylece erkek hayvanların aşırı kullanımı engellenmiş olur ve ticari dağılım kolaylaşır. Önemli hususlardan biri de ekonomik sistemde yavru üretiminin, düşük gebelik oranları, östrusa dönüş oranları ve artan gebelik kayıpları yoluyla üreme verimliliğinde azaltmaya neden olan örneğin; Trichomonosis ve Campylobacteriosis gibi hastalıkların bulaşmasını önler ve çiftleşme sırasında meydana gelen yaralanmaların önüne geçilir (Mohammed, 2018).

Spermatozoanın fertil kapasitesi birçok etkene bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu etkenlerden biri de spermanın kalitesidir. Hayvanlarda görülen fertilité azlığının en önemli nedeni ejakülat içerisindeki spermatozoa ve akrozomda meydana gelen bozukluklardan kaynaklanır. Ejakülat içerisinde sperma miktarının incelenmesinde mikroskopik muayene yöntemi ile yapılır (Ata vd., 2014). Suni tohumlamanın başarısı değerlendirilirken dişi hayvan ile ilişkili parametrelerin değerlendirilmesi haricinde erkek damızlığa ait spermanın muayenesi de oldukça önemlidir. Spermanın alınması ve muayenesi üstün genetik özelliklere sahip spermaların sonraki yıllara aktarılması şu gibi durumlarda önemlidir: Akademik çalışmalar, yaşlı ve sakat aşım yapamayan veya tecrübesiz hayvanların değerlendirilmesinde, erken yaşta yavru elde edilmesi. Spermanın mikroskopik muayenesine bakılırken spermatozoonun görüntüsü, metabolizması ve fonksiyonlarında herhangi bir bozukluk olup olmaması açısından değerlendirilir (Ax et al., 2000).

1.1. Sperma Kriyoprezervasyonu ve Spermatolojik Parametrelere Etkisi

Spermaların uzun süre bozulmadan saklanabilmesi kriyoprezervasyon yöntemiyle mümkündür. Kriyoprezervasyon, dokuların ve hücrelerin sıfırın altında ısıya soğutularak yapılarında biyolojik aktivitelerini durdurarak gelecek kuşaklarda kullanılmasını ifade eder (Tunalı, 2014). Spermanın dondurma işlemi sırasında hücre içerisinde su kaybı fazla olması durumunda çözelti konsantrasyonu artar ve zarar vermeye başlar. Su kaybı az olması durumunda ise buz kristalleri hücre zarına fiziksel olarak zarar vermeye başlar. Her iki durumda da hücre zarında meydana gelen değişiklikler soğutma oranıyla alakalı olarak meydana gelir. Dondurma sırasında spermanın zarar görmemesi için sıcaklık yavaş yavaş azaltılmalıdır (Yavaş ve Daşkın, 2012). Dondurma sırasında meydana gelen stres faktörleri, düşük

sıcaklığı doğrudan etkileri ya da buzlanmaya bağlı olarak fiziksel değişiklikler meydana gelir (Tunalı, 2014). Dondurma işleminde buz oluşumunu engellemek amacıyla düşük soğutma ısısı tercih edilir. Bu da uzun süre yüksek osmolarite oluşturduğundan membran lipoproteinlerin yapısında denatürasyona yol açar ve sitoliz şekillendirir. Soğutma hızlı olması halinde enerji kaybı fazladır. Azalan enerji sonucu hücre içerisinde su atılamaz ve su miktarında artış meydana gelir. Bu durum hücre içerisinde buz oluşmasına ve hücrenin ölmesine neden olur. Bu yüzden soğutma hızı uygun olmalıdır. Spermada hücre zarının yapısında bulunan iki sıralı doymamış yağ asitlerinin sağladığı membran akışından dolayı başlangıçta hızlı soğutmada etkilenmez. Düşük su miktarı kriyoprezervasyon hasarına maruz kalmaya karşı daha dayanıklı olmasını sağlar. Sıcaklığın aniden düşmesi hücrelerin yapısının bozulması, membran geçirgenliğinde ve hücre iskeletinde bozulmalardan kaynaklıdır. Dondurma sırasında meydana gelen hasarlar, yoğun dehidrasyon, pH değişiklikleri, hücre içerisinde buzul kristallerinin şekillenmesi ve protein denatürasyonundan kaynaklanmaktadır (Tunalı, 2014). Sıcaklık düşüklüğünden kaynaklanan fonksiyon kaybı ve hücre hasarı, hücre iskelet yapısında ve membran geçirgenliğinden kaynaklanmaktadır (Özgöl, 2019). Fertilite yeteneğinin bozabilen ya da engelleyebilen işlemlerden önce semen alınıp saklandığı takdirde ilerde oluşabilecek infertilite önlenmiş olur (Tunalı, 2014).

Kriyoprezervasyon görülen hasarların bir başka formu da membran hasarı, DNA yapısında bozulma ve organel hasarı olarak da görülebilir. Çözdürme-dondurma işlemleri uygun bir şekilde de uygulansa %30-50 oranında motilite kaybı şekillenebilir (Özgöl, 2019).

Kriyoprezervasyon işleminde beş önemli nokta vardır. Bunlar; suyun donmasından kaynaklanabilecek hücre hasarını azaltmak amacıyla kriyoprotektanlarla meydana gelen ilk etkileşim, dondurmanın sıfır derecenin altındaki sıcaklık değerlerinde dondurma, saklanması, çözdürme, kriyoprotektanların ve dilüsyonların ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Tüm bunlar yapılırken hücre yapısal bütünlüğü, hücre hasarı ve fonksiyonel özelliklerine dokunulmamalıdır (Tunalı, 2014).

Spermanın kalitesi biyoteknolojik çalışmaların başarısı için oldukça önemli bir faktördür (Daşkın vd., 2006). Spermanın çözdürülme ve dondurulma işlemleri spermatozoon membranı üzerinde spermatozoonun hem fertilizasyon hem de canlılık

yeteneğinin azalmasına neden olan kimyasal ve fiziksel stres meydana getirmektedir. Suni tohumlama esnasında spermanın çözündürme aşamaları ve tohumlama işlemi sonrasında spermatozoonlar ozmotik basınca ve farklı sıcaklık değerlerine maruz kalabilmektedir. Spermatozoonun sıcaklık değişimlerine maruz kalması, spermatozoonun morfoloji ve motilitesini etkileyen soğuk şokuna neden olmaktadır. Spermanın çözündürülmesi dondurulması kadar spermatozoon canlılığında da önemlidir (Selçuk vd., 2014). Spermada ölü ya da anormal spermatozoa oranının fazla olması, organik veya inorganik hücre atıkları sperma kalitesini düşürmekle birlikte fertilité gücünde de azalışa neden olmaktadır (Daşkın vd., 2006).

19. yüzyıldan beri hücrelerin mikroskopik yapısı incelenmektedir ve yapılan ani soğutmalar spermatozoa parametrelerine zarar verebilmektedir. Spermatozoa ani sıcaklık değişimine maruz kalırsa geri dönüşümsüz yapısı bozulur (Hancock, 1952).

Sperma muayenesi yapılırken makroskopik, mikroskopik, fiziksel ve kimyasal muayene yöntemlerinden yararlanılır.

1.2. Sperma Muayenesi

1.2.1. Spermanın Makroskopik Muayenesi

Sperma Miktarı: Sperma hacmi düşük olması tohumlama uygulamalarını olumsuz etkiler. Spermanın hacmini eklenti bezlerinden salgılanan sıvılar oluşturur. Spermanın miktarı normal sınırlarında olması istenilen bir durumdur. Spermanın normal değerlerinin altında olması hipospermi olarak adlandırılır (Sönmez, 2012).

Spermanın Rengi: Hayvan türlerine göre farklılık göstermekle beraber açık krema renginden, koyu krema rengine kadar değişiklik gösterir. Spermanın rengindeki değişimler sperma içerisinde meydana gelen kirli sarı renkte olması irin, pembe renkte kanamanın olması taze kanamanın şekillenmesi, kahve renkte olması ise eski bir kanamanın meydana geldiğini gösterir. Normal renkte olmayan spermalar suni tohumlama işlevlerinde kullanımı uygun değildir (Ax et al., 2000).

Spermanın Viskozitesi: Akmaya karşı gösterdiği direnç olarak ifade edilir. Akışkanlık spermayı oluşturan sıvı içerisindeki spermatozoon sayısına bağlıdır (Sönmez, 2012).

Spermanın Kokusu: Fertil ve sağlıklı hayvanlarda yumurta sarısını andıran çok az aromatik kendine has bir kokusu vardır (Ax et al., 2000).

Spermanın Kaynama Hareketi: Spermanın kitle ya da girdap hareketi olarak tanımlanır. Özellikle koç ve boğalarda sperma alındıktan sonra yapılmalıdır. Yapılacak işlemde kullanılacak malzemelerin steril ve temiz olmalı, kullanılan kapların ve spermaların sıcaklığının 35-37°C olmalıdır. Sperma bir pipet yardımıyla alınıp bir lam üzerine 2-3 damla damlatılır, üzerine lamel kapatılarak inceleme yapılır. Spermada değişik ölçülerde içten kaynama hareketi görülür (Hossain et al., 2012). Hareket kabiliyeti spermanın çok sayıda spermatozoon sayısının olduğunu gösterir. Alınan kaliteli boğa, koç, teke spermalarının makroskopik muayenesinde kitle hareketi: yelde kabarmış ırmağın girdap akıntısı, gökyüzünde bulutların seyri ya da buğday tarlasında rüzgârın etkisiyle salınan başakların dalgalanma hareketini andırır. Görülen bu dalgalanmanın nedeni toplu haldeki motil spermatozoonlardan kaynaklanmaktadır. Mikroskopik incelenmelerde ise bakılan bazı sahaların siyah renkli olduğu göze çarpar. Bu durum sperma yoğunluğuyla alakalıdır. Sperma içerisinde motil spermatozoa oranı arttıkça bu dalgalanmalar ve siyah renkli alanların artışı görülmüştür. Sperma yoğunluğunun az olduğu durumda ise hareketlerdeki dalgalanmalar yavaşlamıştır ve siyah renkli alanların azaldığı görülmüştür (Sönmez, 2012). Boğa spermasının koç ve tekelere göre sperma miktarı daha düşüktür. Sperma kitle hareketi 0-5 arasında kriterle belirlenir. Spermanın kullanımı için en az 3 puana sahip olması gerekmektedir (Hossain et al., 2012).

1.2.2. Spermanın Mikroskopik Muayenesi

Spermanın mikroskopik muayenesinde çeşitli parametreler değerlendirilir. Özellikle sperma motilitesi, spermanın yoğunluğu, kitle hareketi, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı sperma kalitesinin belirlenmesi için son derece önemlidir (Tekin vd., 2011). Spermanın mikroskopik değerlendirilmesi; taze, çözdürülmüş, sulandırılmış, dondurulmuş spermalara bakılarak yapılabilmektedir.

Spermatozoada Kitle Hareketi Tespiti: Kitle hareketi bakılırken kullanılan tüm malzemeler temiz, steril olmalı ve sperma ile kullanılacak bu malzemelerin sıcaklığı 35-37°C olmalıdır. Spermatozoanın normal hareketi ancak bu sıcaklıklarda mümkündür. Bu değerin üzerindeki sıcaklıklarda spermatozoa ölebilir. Kitle hareketi muayene edilirken bir pipet yardımıyla 1-2 damla sperma alınarak lam üzerine damlatılır. Mikroskopta x100 büyütmede 2-3 mikroskop sahasında kitle hareketi değerlendirilir. İyi kalitedeki spermalarda koç, boğa ve tekelere selde kaparmış bir ırmağın girdaplı akıntısı, bulutların gökyüzündeki hareketi ya da rüzgârın buğdaylı

bir başak tarlasında doğurduğu dalgalanmayı andıran hareket şeklinde görülür. Ayrıca mikroskop sahası incelendiğinde bazı alanlar yoğun siyah renkte görülür. Bu durum spermatozoonların yoğunluğuyla alakalıdır. Spermadaki spermatozoon oranı artıkça söz konusu yoğunluk ve siyah alanlar da daha güçlü ve geniş olur. Ters durumda da dalgalanma hareketleri oldukça yavaştır veya siyah gölgeler hiç oluşmaz. Kitle hareketi türe özgü değişiklik gösterir. Aygır, domuz ve köpek spermasının yoğunluğu boğa ve koç spermasına göre çok düşük olmasından dolayı muayene sırasında bu dalgalanma hareketi görülmez. Spermatozoa hareketi kıpırdayan noktalar veya hareket eden kum taneleri şeklinde görülür. Boğa, koç ve teke sperması kitle hareketi yönünden değerlendirildiğinde, hareket derecesine göre 0-5 arasında puanlama yapılır (Tablo 1.1). Spermanın kullanılabilmesi için en az "3" puan değerine sahip olması gerekir (Sönmez, 2012).

Tablo 1.1. Spermanın kitle hareketinin değerlendirilmesi (Hossain et al., 2012)

Puanlama	AÇIKLAMA
0	Hareket yeteneği yoktur.
1	Kitle hareketi azdır, dalgalanma hareketi görülmez.
2	Az miktarda dalgalanma ve kitle hareketi görülür.
3	Spermatozoalarda %50-70 hareket görülür. Fakat girdap ve dalgalanma hareketi çok yavaştır.
4	Spermatozoalarda %70-80 hareket vardır. Hareketlenme hızlıdır ancak girdap ve dalgalanma mükemmel değildir.
5	Spermatozoalarda %80 üzerinde hareketlenme görülür. Çok güçlü kitle hareketi ile siyah alanlar oluşmuştur.

Sperma Motilitesi: Herhangi bir yöne hızlı hareket, hareket eden spermatozonların, hareketsiz biçim gösteren spermatozoonlara oranı olarak ifade edilir. Motilite oranının tespit edilmesi hem ekonomik yönden hem de döl verimi yönünden oldukça önemlidir. Son yıllarda gelişmelerle beraber araştırma merkezlerinde motilite muayeneleri özel bilgisayar sistemleri tarafından yapılmaya başlanmıştır. Sperma motilitesini etkileyen faktörler ise, pH, spermatozoon yaşı, morfolojik yapısı, biyokimyasal özellikleri, sıcaklık, iyon konsantrasyonu ve bazı kimyasal maddelerin düzeyi etkiler. pH, ejakülat içerisinde bulunan sodyum, magnezyum, kalsiyum ve potasyum miktarları sperma kalitesini etkiler. Bunlarla beraber bikarbonat bazı sperma fonksiyonlarını da aktive edebilir. Ortamın pH değeri

sperma motilitesi ve canlı kalma süresi üzerinde etkilidir. Boğaların sperma pH'sı (6,9) nötre yakındır (Sönmez, 2012).

Spermatozoon Yoğunluğu: Hemositometrik, fotolometrik ve elektronik partikül sayaç yöntemi kullanılarak bulunur. Sperma yoğunluğu belirlenmesi sperma kalitesinin bulunması yönünden de önem arz eder. Tohumlama dozunun belirlenmesi motil spermatozoon yoğunluğunun da mutlaka bilinmesi gerekir (Sönmez, 2012). Spermanın yoğunluğu birim hacimde bulunan spermatozoan sayısını gösterir. Sperma yoğunluğu genç boğalarda 2×10^8 sperm/mL iken ergin boğalarda $1,8 \times 10^9$ değişkenlik gösterir (Nagata et al., 2019). Pratikte en çok hemositometrik yöntem kullanılmaktadır. Bu amaçla 5 ml hayem solüsyonu içerisine 10 μ l sperma eklenerek 1/500 oranında sulandırılarak Thomas lamına aktarılıp küçük kareler sayılır. Daha sonra formülasyonda yerine koyularak sperma yoğunluğu hesaplanır (Tekin vd., 2011).

Ölü-Canlı Spermatozoa Tespiti: Fertilizasyonun başarısı açısından önemli bir etkidir. Hücre zarı, diğer hücreler ve ortam arasında diyalogu sağlar. Spermatozoonda canlı-hücre miktarı hücre zarının fonksiyonel özelliklerinden kaynaklanır. Boğa spermasının yapısında her zaman belli oranda ölü ya da membran hasarlı hücreler bulunur. Spermada ölü-canlı hücre yapısını belirlemek amacıyla eosin-nigrosin boyası sıklıkla kullanılır. Ölü hücrenin zeminini nigrosin boyarken, ölü hücreleri ise Eosin boyası sitoplazmasını boyar. Canlı olan hücreler ise boya almaz, boyanmazlar (Bailey et al., 2000).

Hipoozmotik şişme testi (HOST): Erkek kısırlığının teşhisinde bir takım spermatozoon özellikleri değerlendirilir. Spermatozoon zarının işlevsel bütünlüğünü değerlendirmek için bir test, önemli bir ölçüttür. Spermatozoon zarının bütünlüğü metabolizması için önemli olduğu kadar, erkek ve dişi gametlerin başarılı bir şekilde birleşmesi, sperm kapasitasyon örnekleri, akrozom reaksiyonu ve spermatozoanın yumurta yüzeyine bağlanması için gereklidir. Bu nedenle, sperm zarının bütünlüğü ve fonksiyonel aktivitesi, dölleme sürecinde temel öneme sahiptir ve zar fonksiyonunun değerlendirilmesi, spermatozoanın dölleme potansiyelinin yararlı bir göstergesi olabilir.

Anormal Spermatozoon Tespiti: Spermada %5-10 oranında anormal spermatozoon bulunabilir. %20'ye kadar döl verimini olumsuz yönde etkilemez. Bu

oran %25 den fazla olması halinde suni tohumlama amacıyla kullanılamaz. Spermanın orta bölümünde meydana gelen kırılma, kopma, ince boyun, kalın boyun, deforme boyun görülebilir. Yapısal anormalliklerde ise çift baş- çift kuyruk, çift baş- üç kuyruk ve tek baş- çift kuyruk görülebilir. Anormal spermatozoa belirlenmesinde sıvı fizkasyon yönteminden yararlanılarak 1 damla sperma örneği 0,5 ml Hancock solüsyonuna damlatılarak bakılır. Karıştırılıp 5 dakika beklendikten sonra, karışımdan 1 damla lam üzerine damlatıldıktan sonra lamel üzerine kapatılır. Üzerine immersiyon (sedir) yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelenir. 400 spermatozoon sayılarak morfolojileri belirlenir. Ölü spermatozoa tespitinde ise %3'lük sodyum sitrat solüsyonu içerisinde %2'lik hazırlanmış Eosin boyası ve sperma bir damla damlatılarak froti çekilerek 400 spermatozoa sayılır. Kırmızı renk gösteren spermatozoa ölü kabul edilir ya da 37°C %2'lik hazırlanmış Eosin boyası ile bir damla sperma iki damla Eosin boyası damlatılarak froti çekilir. 15 dakika bekletildikten sonra 40'luk büyütmede 400 spermatozoa sayılarak boyanmış olarak yüzde (%) olarak hesaplanır (Tekin vd., 2011).

Organların şekillerinin ölçme durumuna yarayan sperm morfometrisi, erkekte üreme kapasitesinin gösterilmesinde önemli bir kriterdir. Yapılan araştırmalar, infertil spermatozoidlerin sperm başının uzun ve kısa eksen açısından fertil spermatozoaya göre daha büyük olduğu ve başın uzunluğu daha fazla olduğu görülmüştür. Spermatozoon başı küçük olan hayvanların daha doğurgan olduğu görülmüştür. Araştırmalar sadece spermatozoon boyutunun dölleme kapasitesine bağlı olmadığını, orta kısım ve kuyruk kısmını da etkilediğini göstermiştir. Kuyruk uzunlukları fazla olan spermatozoa, daha fazla hareket yeteneklerine sahip olduklarından dölleme kapasiteleri de daha yüksektir. Morfometrik veriler, spermatozoidin gerçek in vitro ve in vivo kapasitesi hakkında bilgileri artırır ve fertilizasyondan önce dondurulmaya uygunluğunun belirlenmesini mümkün kılar (Hirano et al., 2001). Spermatozoa dondurma işlemi çoğu memeli hayvan türlerinde sıvı nitrojen (-196 °C) içerisinde yapılarak başarılı sonuçlar vermiştir. Spermatozoidin yaşamsal fonksiyonlarını saklama sıcaklığı, soğutma/çözdürme hızı, kullanılan kriyoprotektanlar maddeler ve sulandırıcının kimyasal yapısı etkiler (Ax et al., 2000). Spermanın uygun bir yöntemle alınması, dondurma-çözdürme, saklama gibi birçok yöntem spermatozoon fertilizasyonunu etkiler (Morrell, 2011). Dondurma ve çözdürme spermatozoidin morfolojisini, fonksiyonunu ve

biyokimyasını olumsuz yönde etkiler. Dondurma/çözdürme hücre organellerindeki çözeltilerin yoğunluğunun artmasına, hücresel su kayıplarının şekillenmesine ve hücre organellerinde çeşitli hasarlara yol açabilir (Gilmore et al., 2000). Boğalarda alınan spermatozoa sulandırma, dondurma, depolama, çözdürme ve çözdürme sonrası uygulanan işlemler ve ani sıcaklık değişimleri spermatozoon yapısını etkiler ve hasara uğratabilir (Senger, 1980).

Sperma morfolojisi hem insan hem de hayvanlarda doğurganlık belirleme yönünden kullanılan parametreler önem arz eder. Anormal spermatozoanın morfolojik açıdan üreme yetenekleri yoktur. Sperma morfolojisi erkek üreme kapasitesinin belirlemede çok önemli bir göstergedir (Banaszewska et al., 2015). Morfolojik muayene yöntemi ile fertilitesi düşük spermatozoonların eliminasyonu sağlanabilir. Akrozom reaksiyonu, kapasitasyon, sperm-oosit füzyonu gibi sperma fonksiyonları serbest oksijen radikallerine ihtiyaç duyar. Serbest oksijen parçacıklarının yüksek olması spermanın infertilitesine neden olur (Gil-Guzman et al., 2001). Morfolojik olarak anormal ve olgunlaşmamış spermatozoa, stoplazmik lökositler serbest oksijen miktarında artışa neden olur ve bu da fertilitayı olumsuz etkiler (Banaszewska et al., 2015).

Spermanın baş, boyun ve kuyrukta meydana gelen değişimler morfolojik değişim olarak adlandırılmıştır. Bu değişimler mikroskopik olarak adlandırılıp primer, sekonder ve tersiyer olarak gruplandırma yapılır. Primer bozukluklar genellikle akrozom ve sperm başında, sekonder bozukluklar spermanın kuyruğunun orta kısmında ve tersiyer bozukluklar ise kuyruğun diğer kısımlarında bildirilmiştir. Bu sınıflandırmada baş ve akrozomda meydana gelen bozukluklar %20 veya total bozukluklar %30 geçmesi durumunda infertiliteye neden olduğu saptanmıştır (Ax et al., 2000). Çiftlik hayvanlarında spermatozoanın apikal kısmında bulunan akrozom, korona penetrasyon enzimi, hiyaluronidaz, nöroaminidaz, proakrozin, akrozin, proteinaz, 18 esteraz, fosfataz, fosfolipaz A2, asit fosfataz, aril sülfataz, beta-N-asetil glukozaminidaz, aryl aminidaz ve kollagenaz gibi enzim yapısında moleküller içerir. Bu enzimler sperma fertilitesinde önemli bir yere sahiptir. Akrozom yapısı morfolojik değerlendirmede önemli bir yere sahiptir (Ax et al., 2000).

Boğa spermasında meydana gelen değişimler akrozom enzimlerinin yapısında meydana gelen bozulmalardan kaynaklanır. Akrozom muayenesi yapılırken değişimler geniş, granüllü, küçük eğrilmiş, dejenere akrozom ve akrozomsuz

spermatozoit olarak gruplandırılır. Gebelik oranlarının belirlenen seviyede olması sadece motilite değeriyle yeterli değildir. Bunun yanı sıra hiyaluronidaz, corona penetrasyon enzimi (CPE), nöroaminidaz ve tripsin gibi enzimlerin de bulunması ve akrozomun yapısının bozulmamış olması gerekir. Morfolojik değerlendirme sırasında akrozomun uc kısmında başa en yakın bozukluk sayılarak başlanır. Bu aşamada en az 100 hücre sayımı yapılır. Hücre sayısı ne kadar fazla sayılırsa doğruluk değeri o kadar atar (Aalseth et al., 1986).

Spermatozoanın metabolizması, fonksiyonları, morfolojik değişiklikleri görülmesi amacıyla bilgisayar destekli ekipmanlar ve flow sitometri gibi geliştirilmiş sistemler kullanılır. Spermatozoanın başa bağlı olarak şekillenen bozukluklar dar, mızrak ucu formu, kürek, ampul, kuyruksuz, iri, küçük, büzülmüş, armut ve iki başlı olarak gruplandırılır. Bu bozukluklar çoğunlukla spermatogenezis aşamasında şekillenir. Kuyruğun görünümüyle ilgili meydana gelen bozukluklar düz, çok girintili, dar ve geniş olarak ifade edilir. Başın orta kısmında ise meydana gelen bozukluklar abaksiyal bağlanma, paraksiyal bağlanma, retroaksiyal bağlanma, kırılmış ve kopmuş olarak gruplandırılır (Menon et al., 2011). Spermatozoaya enerji sağlayan orta bölümünde meydana gelen bozulmalar ise kalın, kısa, ince, deforme, kıvrık, katlanmış, axillar tip, fibrilli ve protoplazmik damlacık bulundurma şekline göre gruplandırma yapılır. Spermaya hareket sağlayan kuyruk kısmı da ki bozukluklar ise yumak şeklinde, kırık kuyruk, başa sarılmış, rudimenter, başsız kuyruk, geriye dönme, çift kuyruk ve fibrilleşme durumuna göre gruplandırma yapılır (Menon et al., 2011).

Spermada morfolojik bozuklukların saptanması amacıyla Fast Green Eosin-Nigrosin, Opal Blue, Giemsa boyama yöntemlerinin yanı sıra Hancock, hayem eriği gibi sıvı solüsyonlar da kullanılabilir. Hücre değerlendirilmesinde bu solüsyonların pH'sı, sıcaklığı, ozmotik basıncı ve boyama süresi gibi etkenler belirler. Fertilitede doğruluk parametresini artırmak amacıyla flow sitometri ve görüntü analiz sistemleri gibi otomatize yöntemleri belirlenmiştir. Kısa bir zamanda çok sayıda hücre tespit edilerek gerçeğe yakın yüksek sayılarda doğruluğu tekrarlanan değer bulunabilir (Ax et al., 2000). Elde edilen morfolojik değişiklikleri belirlemek amacıyla çeşitli yöntemler kullanılır. İnfertiliteye sebep olan (mayor), infertiliteye sebep olmayan (minör) olarak iki şekilde sınıflandırılır. Araştırmacıların bazıları birinci, ikinci ve üçüncül bozukluklar olarak sınıflandırmaya tabi tutmuşlardır (Menon et al., 2011).

Dondurulmuş çözdürülmüş boğa spermalarının morfolojik muayenelerinde çeşitli boyama yöntemleri kullanılmaktadır: Gümüş nitrat, Coomassie Blue G-250 yöntemi, Naphthol yellow-S+Eritrosin-B yöntemi, Ponceau-S+Naphthol Yellow-S+Eritrosin-B boyama yöntemi ve Trypan Blue+Giemsa ile boyama yöntemi kullanılır (Ata vd., 2014).

Papanicolaou® boyası (Papanicolaou®, 1942), hem Dünya Sağlık Örgütü kriterleri (DSÖ) hem de Tygerberg Strict kriterleri için 1999'dan itibaren için insan sperm morfolojisi değerlendirmesi için standart haline geldi. Diff-Quick® tipi boyama prosedürü, sperm morfolojisi ve sperm kromatin durumunu değerlendirmek için hızlı bir yöntemdir (Sousa et al., 2009). Diff-Quick®'in spermatozoonun şişmesine (Kruger et al., 1988) ve arka plan lekelenmesine (WHO, 1999) neden olduğu bulgularına rağmen, insan sperm morfolojisi değerlendirmesi için DSÖ (1999) tarafından önerilmektedir. Spermac®, insan akrozomunun boyanmasında özellikle etkili olan, morfolojinin belirlenmesine yönelik başka bir hızlı sperm boyama prosedürüdür (Oettle, 1986; Chan et al., 1999). Spermac® prosedürü daha önce boğa, koç, keçi, köpek, at, yaban domuzu, çita ve insandan alınan taze ve sulandırılmış spermanın boyanmasında kullanılmıştır (Oettle, 1986; Oettle and Soley, 1985; Oetjen-Terdenge, 1988; Chan et al., 1996; Viggiano et al., 1996; Watkins et al., 1996). Bu metakromatik boyama, esas olarak çeşitli derecelerde akrozomal hasarları görünür kılmak için kullanılır ve ayrıca akrozomal reaksiyon sırasında meydana gelen bazı değişiklikler görülebilir. Seyreltilmiş ve dondurulmuş spermada da uygulanabilen, hızlı, güvenilir ve kolay bir işlem olarak tanımlanmaktadır. SpermBlue®, basit bir sabitleme ve boyama prosedürünü içeren hızlı bir boyama yöntemidir (25 dakika). Fikzasyon ve boyama ortamı spermaya göre büyük ölçüde izo-ozmotik olduğundan belirgin bir şişme belirtisi gözlemlenmemektedir. Spermatozoa, hipo-ozmotik solüsyonlara yerleştirildiğinde kolayca şişer ve hiper-ozmotik solüsyonlarda büzülür. SpermBlue® ayrıca spermatozoanın ana bileşenlerini net bir şekilde tanımlamak için uygundur. Spermatozoa morfolojisi değerlendirmesi, her parçayı değerlendirmek için akrozom, baş, orta kısım ve kuyruğun sınırlarını açıkça gösterecek şekilde spermatozoanın diferansiyel olarak boyanmasını gerektirir. Çeşitli araştırmalar, insanlarda (Kruger et al., 1988) ve hayvanlarda (Chandler et al., 1988; Jasko et al., 1990) morfolojik olarak

anormal spermatozoa artışı ile doğurganlığın azalması arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir.

Spermatolojik muayeneler arasında morfolojik muayene dikkatlice değerlendirilmesi gereken bir parametredir. Bu tez çalışmasında dondurulmuş çözündürülmüş boğa spermasında spermatozoon morfolojisinin değerlendirilmesinde, sıvı fizyasyon metodu (Hancock), SpermBlue® ile boyama, Spermac® ile boyama, Diff-Quick® ile boyama ve Papanicolaou® ile boyama yöntemleri kullanılarak, dondurulmuş-çözündürülmüş spermalarda anormal spermatozoa oranı tespitinde kullanılan farklı yöntemlerin uygulanabilirliği ve geçerliliği hakkında değerlendirmeler yapılması ve anormal spermatozoa oranı tespitinin saptanmasında farklı yöntemlerle elde edilen bulgular arasındaki farklılıklar ve benzerliklerin ortaya konması amaçlanmıştır.

1.2.3. Spermanın Fiziksel ve Kimyasal Muayenesi

Spermanın pH değeri, bazı sulandırılmış gösterge kağıtları ya da pH ölçüm aletleri ile ölçülebilir. Sperma pH değişimi dışardan alınan maddelere ya da ek salgı bezlerindeki yangıdan kaynaklanarak değişme gösterebilir. Ayrıca pH değeri türlere özgü olarak değişir. Boğalarda 6,5-7,0, koçlarda 6,2-7,0, domuzda 6,8-7,5, tekelerde 6,2-7,0, aygırda 7,3-7,7, köpekte 6,3-6,7 ve kedide ise 6,6-7,0'dır. Boğaların sperması hafif asidik, aygırların ise genellikle hafif alkaliktir (Sönmez, 2012).

Metabolik aktivite testlerinde metilen mavisi redüksiyon, fruktoz ve fruktolizis testi ve katalaz testi yöntemleriyle yapılır. Metilen mavisi redüksiyon spermanın solunum miktarını belirlemek amacıyla yapılır (Mercier and Salisbury, 1947). Metilen mavisi prensibinde oksijensiz ortamda bulunan spermatozoonların aktivitesine bağlı olarak hidrojen miktarının belirlenmesi değerlendirilir. Oksijensiz ortamda spermatozoonların aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkan hidrojen ortamda metilen mavisiyle birleşerek leukometilen mavisini oluşturur. Bu durumda ortamda metilen mavisi kaybolur, bu süre zarfında geçen süre spermatozoonların değerlendirilmesi için bir ölçüt kabul edilir. Ortamda bulunan hidrojen tek başına renkte değişmeye sebep olmaz. Hidrojenin tepkimeye girmesi ve ortaya çıkması için bazı enzimlere (laktat dehidrogenaz) ihtiyaç duyulur. Bunların yanı sıra ortamda bulunan bakteriler ve ışığın şiddetinde hidrojen miktarını etkiler (Sönmez, 2012).

Fruktolizis sperma incelenmesinin doğru bir şekilde yapılmasını sağlar. Bu yöntemin kullanılması semen kalitesinin belirlenmesinde kolay uygulanabilir, sade, doğru ve pratiklik sağlar. Semen fruktoz içeriği erkek cinsiyet hormonun aktivitesinden etkilenen eklenti bezlerinin salgılama işlevine bağlıdır. Semen içerisinde düşük fruktoz seviyesi hormonal bozukluk semptomları ve düşük kalite spermatozoa semptomlarıyla çakışabilir. Suni tohumlama pratiğinde fruktoliz testi semenin saklanması dar tüplerde inkübe edilen spermanın hayatta kalması tamamen anaerobiktir. Spermanın hayatta kalması solunuma değil fruktolize bağlıdır (Mann, 1948). Fruktolizis spermada bulunan fruktozun oksijensiz ortamda spermatozoa tarafından kullanılmasını belirlemek amacıyla yapılır. Aktif spermatozoa fruktoza temas ettikleri anda fruktoz hücre içerisine girer, enzimler tarafından parçalanır ve böylece fruktolizis gerçekleşmiş olur. Bu reaksiyon sonucu oksijensiz ortamda bir miktar enerjiyle beraber laktik asitte ortaya çıkar. Fruktolizis değeri 1 milyar spermatozoonun 37°C 1 saatte tükettiği fruktoz değeridir. Seminal plazmada türlere göre fruktoz miktarları: Aygır 1, köpek 1, boğa 120-540 ve koçta ise bu değer 150-600 mg/100 ml dir (Sönmez, 2012).

Katalaz testi deneylerde spermanın temizliğini belirlemek amacıyla kullanılır. Uygun koşullarda elde edilmiş spermadan az miktarda H₂O₂'yi parçalayan katalaz enzimi vardır. Katalaz miktarının artmasında sperma içerisinde bakteri, kan ve irin gibi maddelerin olması aynı zamanda da spermanın kirlendiğini gösterir (Sönmez, 2012).

2. MATERYAL VE METOT

Yüksek Lisans Tez araştırmamızda Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Suni tohumlama laboratuvarında bulunan, Holstein ırkı boğalardan aynı tarihte ve ortak koşullarda toplanan (n:50) spermallerden elde edilen 0,25 ml'lik dondurulmuş payetler kullanıldı. 37°C'deki su içerisinde 25-30 sn bekletilerek çözdürülen spermaların motilite ve progresif motilite oranları bilgisayarlı sperm analiz sistemi (CASA) ile değerlendirildi (Selçuk vd., 2020).

Ölü/canlı spermatozoa oranları %3'lük sodyum sitrat içinde %2'lik olarak hazırlanan Eosin solüsyonu ile saptanarak yüzde olarak tespit edildi. Bu işlem 37°C'de ısıtılan lam, lamel ve %2'lik Eosin boya ile yapılmıştır. Bir damla sperma alınarak, iki damla eosin ile karıştırılıp bir lam üzerine koyularak froti çekildi. 15 sn. boyunca kurumaya bırakılan slaytlar mikroskopta x20 büyütme ile 400 spermatozoon sayılarak, boya alan (ölü hücrelerin) spermatozoonların sayısı yüzde olarak değerlendirildi (Tekin, 1994).

Çözüm sonrası plazma membran bütünlüğünün değerlendirilmesi için hipotonik solüsyon hazırlandı ve sperma hazırlanan çözeltide 37°C'de 60 dk. inkübe edildi. Ardından 37°C'de faz kontrast mikroskobu kullanılarak değerlendirildi (Mousavi et al., 2019).

Yaptığımız bu çalışmada anormal spermatozoa oranını belirlemek amacıyla aşağıda belirtilen beş farklı metot kullanıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Laboratuvarda örneklerin hazırlanması

2.1. Sıvı İle Fikzasyon Metodu (Hancock)

62,5 ml formalin (%37), 150 ml saline solüsyonu, 150 ml Buffer çözeltisi ve 500 ml bidistile su ile hazırlanan Hancock solüsyonundan 1ml alınıp içerisine 10 µl taze sperma ekledik ve mikropipet yardımıyla karıştırıldı. Ardından bu karışımdan mikropipet ile 5 µl çekerek lam üzerine damlatıldı ve üzerini lamel kapatıldıktan sonra faz-kontrast mikroskobu altında normal-anormal en az 200 spermatozoon sayımını gerçekleştirildi (Schafer et al., 2000) (Şekil 2.4).

2.2. SpermBlue® İle Boyama

Bilgisayar destekli sperma analiz cihazı (CASA, SCA®/Microptic, Barcelona, Spain) kullanarak değerlendirildi. CASA sisteminde 40x objektifte, mavi filtrede

bulundurulan mikroskop (Nikon, Eclipse, Tokyo, Japan) ve SpermBlue® kiti (Microptic, Spain) ile morfolojik değerlendirme yapıldı. Sperma numunesinden 10 µl alınarak özel lam üzerine froti çektik ve 45 derecelik bir açıda kurutmaya bırakıldı. Kuruma meydana geldikten sonra lam içerisinde SpermBlue® boyası bulunan jara daldırıldı. Lamı 2 dakika süresince boya içerisinde tutuldu. Daha sonra lam 60-80 derece diklikte kurutmaya bırakıldı. Kurutma işlemi sonrasında içerisinde distile su bulunan jarda yavaşça 2 kez batırılıp çıkarıldı ve lam kurumaya bırakıldı. Boyama işlemi sonrası CASA sisteminin yazılımında morfoloji modülü seçilerek en az 100 spermatozoon üzerinde değerlendirmeler yapıldı. Sistemde akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk anomalileri % olarak değerlendirip, kaydedildi (Van der Horst et al., 2010) (Şekil 2.4).

2.3. Spermac® İle Boyama

Çözdürülen spermalardan alınan numuneler 100 µl'i % 0,9 NaCl ile seyreltilti. Bir lam üzerine bir damla numune damlatıldı ve ince bir smear hazırlandı. Daha sonra kurutmaya bırakıldı. Smearlar Spermac® ile prosedürüne uygun olarak boyandı ve 200 spermatozoa, Axner vd (1999), tarafından açıklanan yöntemle göre ışık mikroskobu altında değerlendirildi (Şekil 2.4).



Şekil 2.2. Laboratuvarında Spermac® ile SpermBlue® örneklerinin hazırlanması

2.4. Diff-Quick® İle Boyama

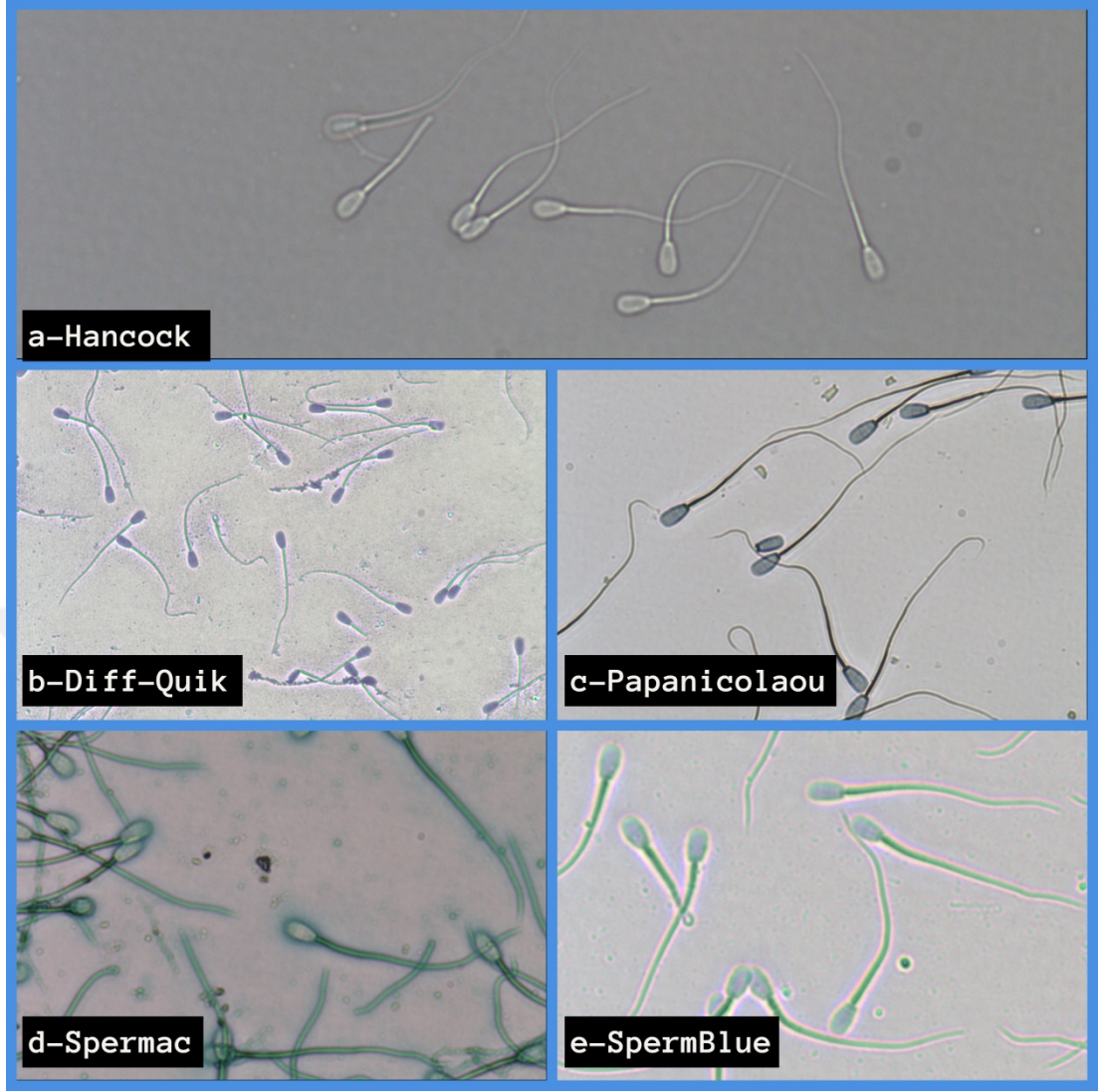
Diff-Quick® boya kiti kullanıldı. Çekilen frotiler önce 10 sn Diff-Quick® fiksatifinde fiks edildi. Daha sonra sırayla solüsyon 1 ve 2'de 20'er saniye bekletilerek boyandı. Üçüncü adım sonrası lamlar deiyonize su ile yıkandı ve böylelikle fazla boya uzaklaştırıldı. En son lamlar kapatıcı ile kapatıldı. 200 spermatozoa, Boersma vd. (2001), tarafından açıklanan yöntemle göre ışık mikroskobu altında değerlendirildi (Şekil 2.4).



Şekil 2.3. Laboratuvarda Diff-Quick® örneklerinin hazırlanması

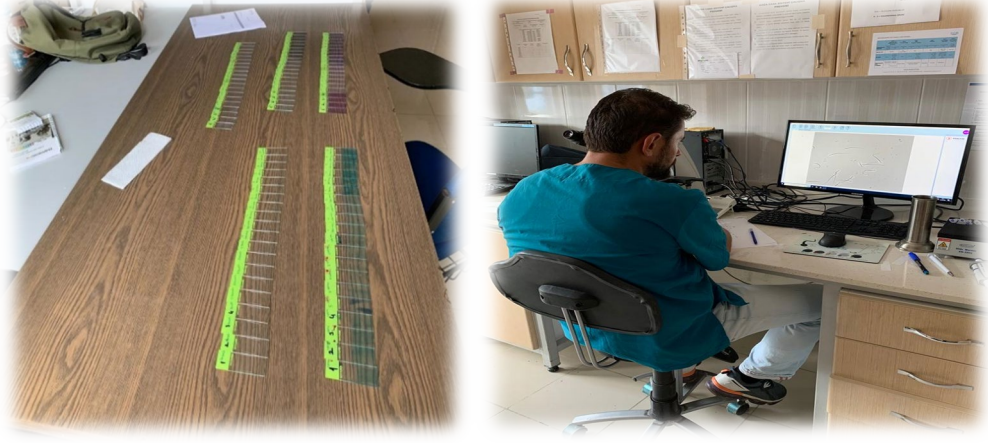
2.5. Papanicolaou® İle Boyama

Papanicolaou® boyama yöntemi için, havada kurumaya bırakılan lamalar, 15 dakika boyunca sabitleme için % 96 etanol içine yerleştirildi ve daha sonra rutin protokol kullanarak boyama işlemi yapıldı. Prosedürün sonunda, slaytlar eşit miktarda mutlak etanol ve ksilen ile dehidre edildi, daha sonra 1 dakika boyunca tek başına ksilen ile temizlenme işlemi uygulandı. 200 spermatozoa, Menkveld ve Kruger (1996) tarafından açıklanan yöntemle göre ışık mikroskobu altında değerlendirildi (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Anormal spermatozoa görüntüleri

İstatistiksel analizler IBM SPSS v21 programında yapıldı. Verilerin normallik dağılımları Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testlerine göre değerlendirildi. Ölçümler arasında fark olup olmadığı bağımlı örneklem T testi (Kuyruk, Toplam) veya Wilcoxon (Baş, Gövde) testi ile değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler Tablo 3.2’de Ortalama±Standart Hata olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Laboratuvarda örneklerin hazırlanması ve mikroskop ortamında değerlendirmelerin yapılması

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırmamızda kullanılan dondurulmuş spermalara ait ortalama çözüm sonu spermatolojik parametreler (Motilite, Progresif Motilite, Canlı spermatozoa oranı, HOST pozitif oranı) Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Spermatozoon analiz değerleri (aritmetik ortalama)

Parametreler	Yüzde oranları (n:50)
Motilite	73,71
Progresif motilite	50,55
Canlı spermatozoa oranı	75
HOST pozitif oranı	76,45

Yüksek lisans tez araştırmamızda 5 farklı boyama metodu ile değerlendirilen morfolojik bozukluk bulguları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Spermatozoon morfolojisinin sonuçları

	Baş-Akrozom Mean±SE	Gövde Mean±SE	Kuyruk Mean±SE	Toplam
Hancock	0,9±0,21 ^a	1,55±0,27 ^a	2,75±0,30	5,2±0,53
SpermBlue®	2,55±0,31 ^b	1,05±0,25 ^a	2,65±0,29	6,25±0,48
Diff-Quick®	1,7±0,31 ^{ac}	0,85±0,16 ^b	3,3±0,39	5,80±0,48
Papanicolaou®	2,15±0,22 ^{bc}	0,75±0,12 ^c	2,65±0,35	5,55±0,38
Spermac®	1,8±0,22 ^{dc}	0,8±0,20 ^d	2,45±0,29	6,05±0,31
Aynı sütunda farklı harf içeren ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır.				

Yapmış olduğumuz yüksek lisans tez çalışmamızda 5 farklı boyama metodu ile değerlendirilen baş-akrozom bölgesine ait morfolojik bozukluk bulgularında Diff-Quick® ile SpermBlue® ve Spermac® ile SpermBlue® değerlendirildiğinde benzer istatistiki farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hancock ile Papanicolaou® ve Hancock ile Spermac® değerlendirildiğinde benzer istatistiki farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,005$). Hancock ile SpermBlue® değerlendirildiğinde bulunan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür

($p<0,001$). Bulgularımız çeşitli literatür taramaları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Sperm morfolojisi ile döl verimi tahmini, incelenen spermanın kalitesine ve kullanılan metodoloji standartlarına bağlıdır. Her durumda, ejakülattaki morfolojik olarak normal spermatozoa oranı çoğunlukla suni tohumlama sonrası doğurganlık ile ilişkilidir (Kuster et al., 2004).

Spermatozoonun baş kısmına ait anomali değerlendirmelerin yapıldığı literatürün kapsamında aşağıdaki bilgilere ulaşılmıştır. Bozkurt vd. (2002) boğalarda yapmış olduğu çalışmada anormal spermatozoa tespitini Hancock solüsyonuyla değerlendirmiş ve baş-akrozom anomalisini %4,5-5,74 arasında bulmuşlardır. Selçuk vd. (2014) boğalarda yapmış olduğu çalışmada Hancock solüsyonuyla anormal spermatozoa baş-akrozom tespitinde ortalama değer %1-4 arasında tespit etmişlerdir. Yurdaydın ve Sevinç (1985) boğalarda yapmış olduğu çalışmada anormal baş-akrozom oranlarının tespitinde Hancock solüsyonu kullanılarak araştırma yapılmıştır. Anormal baş-akrozom oranı ortalama %25,78 olarak tespit etmişlerdir. Araştırma bulgularımızda Hancock solüsyonu ile elde ettiğimiz değerler Selçuk vd. (2014) değerleri ile uyumlu bulunmuş, Bozkurt vd. (2002) ile Yurdaydın ve Sevinç (1985) değerlerine göre düşük bulunmuştur.

Raseona vd. (2017) boğa spermasında Spermac® metodu kullanılarak anormal spermatozoa oranını değerlendirdikleri çalışmada anormal spermatozoa baş-akrozom oranını ortalama %17,3 olarak tespit etmişlerdir. Baran vd. (2004) kedi spermasında Spermac® boyama metoduyla baş-akrozom anomalisini $9,20 \pm 2,55$ tespit etmişlerdir. Runcan vd. (2014) aygır spermasında Spermac® boyamayla yapmış oldukları anormal spermatozoa incelemesinde anormal baş-akrozom oranını %0,8 olarak tespit etmişlerdir. Araştırma bulgularımızda Spermac® ile elde edilen değerler Raseona vd. (2017) ve Baran vd. (2004)'te tespit edilen değerlerin altında bulunmuştur. Runcan vd. (2014) sonuçları araştırmamızdaki değerle paralellik göstermiştir.

Murcia-Robayo vd. (2017) SpermBlue® metoduyla aygırlarda yapmış oldukları çalışmada anormal spermatozoa baş-akrozom oranını %9,63 tespit etmişlerdir. Ene vd. (2016) yapmış oldukları anormal sperm morfolojisinin koç çalışmasında SpermBlue® yöntemini kullanarak anormal baş-akrozom oranını

%9,021±0,863 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan bu araştırmalarda Murcia-Robayo vd. (2017) ile Ene vd. (2016) gözlemlediği değerlere kıyasla düşük bulunmuştur.

Murcia-Robayo vd. (2017) Diff-Quick® metoduyla aygırlarda yapmış oldukları çalışmada anormal spermatozoa baş-akrozom oranını %9,18 tespit etmişlerdir. Runcan vd. (2014) aygır spermasında yapmış oldukları anormal spermatozoa incelemesinde anormal baş-akrozom oranının tespitinde Diff-Quick® boyama yöntemini kullanarak %0,75 değerini gözlemlemişlerdir. Kruger vd. (1987) insan spermasının anormal sperm morfolojisini Diff-Quick® ile değerlendirmişlerdir. Baş-akrozom değerini %12,05 olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmalarda Murcia-Robayo vd. (2017) ile Kruger vd. (1987) tespit edilen değerler araştırmamızda bulunan değerlerin üzerinde iken, Runcan vd. (2014) bulunan değerler ile, araştırmamızda bulunan değerler paralellik göstermiştir.

Kruger vd. (1987) insan spermasının anormal sperm morfolojisini Papanicolaou® ile araştırmışlardır. Baş-akrozom değerini %12,03 olduğunu tespit etmişlerdir. Meschede vd. (1993) insan spermasında anormal baş-akrozom tespit edilmesinde Papanicolaou® metodunu ile %0,72 sonucunu tespit etmişlerdir. Araştırmamızda bulunan değerler Kruger vd. (1987) yaptığı çalışmada bulduğu değerlerin altında iken, Meschede vd. (1993) tespit edilen değerlerin üzerinde bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmalarla araştırmamız arasındaki değerlerin birbirinden farklı olması değişik ırk, tür ve genetik yapıda olmalarından, kimi çevre faktörlerinden (bakım, besleme, iklim v.s), sulandırma işleminde yapılan hatalardan kaynaklanabilir, hayvanlardaki ırklardan kaynaklı bireysel farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

Yapmış olduğumuz yüksek lisans tez çalışmasında anormal sperm morfolojisi gövde kısmının incelenmesi 5 farklı boya yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hancock ile Diff-Quick® ve Hancock ile Papanicolaou® değerlendirildiğinde benzer istatistiki farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bulduğumuz değerler çeşitli literatür taraması yapılarak karşılaştırma yapılmıştır.

Spermatozoonun gövde kısmına ait anormali değerlendirmelerin yapıldığı literatürün kapsamında aşağıdaki bilgilere ulaşılmıştır. Bozkurt vd. (2002) boğalarda yaptığı araştırmada anormal spermatozoa tespitinde hancock solüsyonuyla spermanın

gövde kısmındaki anomali değerlendirilmiştir. Anormal spermatozoa gövde kısmı %2,64-3,86 olarak tespit edilmiştir. Selçuk vd. (2014) boğalarda yapmış olduğu araştırmada anormal spermatozoa tespitinde gövde kısmı anomalisi hancock fikzasyon metoduyla tespit edilip bu değer %0,5-1,5 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan araştırmalarda Bozkurt vd. (2002) ve Selçuk vd. (2014) bulunan değerler ile araştırmamızda bulunan değerler paralellik göstermiştir.

Baran vd. (2004) yapmış olduğu araştırmada kedi anormal spermatozoon morfolojisini değerlendirilmesinde Spermac® yöntemiyle gövde ve kuyruk anomalisini beraber değerlendirmişlerdir. Anormal sperm toplam oranı %9,20±3,49 tespit etmişlerdir. Araştırmamızda bulunan değer Baran vd. (2004) gözlemlediği değere kıyasla düşük bulunmuştur.

Murcia-Robayo vd. (2018) SpermBlue® metoduyla aygırlarda yapmış oldukları araştırmada anormal spermatozoa gövde kısmını %15,6 olarak tespit etmişlerdir. Yaptığımız araştırmada bulduğumuz değer Murcia-Robayo vd. (2018) tespit edilen değer altında bulunmuştur.

Murcia-Robayo vd. (2018) Diff-Quick® metoduyla aygırlarda yapmış olduğu araştırmada anormal spermatozoa gövde kısmını %12,7 olarak tespit etmişlerdir. Yaptığımız araştırmada bulduğumuz değer Murcia-Robayo vd. (2018) yapılan araştırmada tespit edilen değer altında bulunmuştur.

Meschede vd. (1993) Papanicolaou® ile insanlarda yapmış olduğu araştırmada anormal sperm gövde kısmını %0,41 tespit etmişlerdir. Araştırmamızda bulunan değer Meschede et al. (1993) gözlemlediği değerle paralellik göstermiştir.

Yapılan bu çalışmalarla araştırmamız arasındaki değerlerin birbirinden farklı olması hayvanlardaki ırklardan kaynaklı bireysel farklılıklardan, kullanılan hayvanların ırklarının farklı olmasından, kullanılan boğa ve ejakülat sayıları, boğaların değişik ırktan olması, benzer ırktan olanların da farklı genetik yapıda olmalarından kaynaklanabileceği gibi değişik bakım ve besleme koşulları ve araştırmacıların muhtemelen farklı sperma alma ve değerlendirme teknik uygulamalarından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmasını yaptığımız yüksek lisans tez çalışmasında anormal sperm morfolojisinin kuyruk kısmını değerlendirmek amacıyla 5 farklı boyama metodu kullanılmıştır. Hancock fikzasyon ile %2,75±0,30, SpermBlue® ile %2,65±0,29,

Diff-Quick® ile $3,3 \pm 0,398$, Papanicolaou® ile $2,65 \pm 0,35$ ve Spermac® ile ise $2,45 \pm 0,29$ değeri tespit edilmiştir. Bulgularımız çeşitli literatür taramaları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Spermatozoonun kuyruk kısmına ait anomali değerlendirmelerin yapıldığı literatürün kapsamında aşağıdaki bilgilere ulaşılmıştır. Bozkurt vd. (2002) boğalarda yapmış olduğu çalışmada anormal spermatozoa kuyruk kısmı oranını Hancock solüsyonuyla $10,81-13,09$ tespit edilmiştir. Selçuk vd. (2014) boğalarda yapmış olduğu araştırmada Hancock solüsyonuyla anormal spermatozoa kuyruk kısmı oranının $0,5-7,5$ olduğu gözlemlenmiştir. Yaptığımız araştırmada bulunan değer Bozkurt vd. (2002) araştırmada bulunduğu değerin altında gözlemlenirken, Selçuk vd. (2014) tespit edilen değerin üzerinde bulunmuştur.

Raseona vd. (2017) boğalarda Spermac® yöntemi kullanarak anormal spermatozoa kuyruk kısmını incelemişlerdir. Yapılan araştırmada anormal kuyruk değerini $10,1$ tespit etmişlerdir. Araştırmamızdaki değer bu değerden düşük bulunmuştur.

Murcia-Robayo vd. (2018) aygırlarda yapmış olduğu araştırmada spermatozoadaki anormal kuyruk kısmına ait anomalinin tespitinde sperma-blue yöntemi kullanılarak $12,25$ oranı tespit etmişlerdir. Araştırmamızda bulduğumuz değer Murcia-Robayo vd. (2018) araştırmasında bulunduğu değerden düşük bulunmuştur.

Murcia-Robayo vd. (2018) Diff-Quick® metoduyla aygırlarda yapmış olduğu araştırmada anormal spermatozoa kuyruk değerini $16,5$ olarak gözlemişlerdir. Araştırmamızda bulduğumuz değer Murcia-Robayo vd. (2018) araştırmasında bulunduğu değerden düşük bulunmuştur.

Meschede vd. (1993) Papanicolaou® yöntemi kullanarak insanlarda anormal spermatozoon kuyruk anomalisini değerlendirmişler. Anormal kuyruk oranını $0,62$ olarak tespit etmişlerdir. Araştırmamızda bulunan değer Meschede et al. (1993) tespit edilen değerin üzerinde gözlemlenmiştir. Bu farklılığın oluşmasında türlerin farklı olmasından kaynaklanabileceği gibi kullanılan sulandırıcı ve dondurma metoduna verdiği tepkiden kaynaklı olabilir. Ayrıca araştırmayı yapan kişilerin spermatozoon morfolojisi değerlendirmesindeki hatalardan da kaynaklanmış olabilir.

4. SONUÇ

Sperma morfolojisi hem insan hem de hayvanlarda “fertilite potansiyeli” belirleme yönünden kullanılan parametreler önem arz eder. Anormal spermatozoanın morfolojik açıdan üreme yetenekleri yoktur. Spermatolojik muayeneler arasında morfolojik muayene dikkatlice değerlendirilmesi gereken bir parametredir. Bu parametrenin değerlendirilmesi işleminde total değerler olarak bakıldığında Hancock, SpermBlue®, Diff-Quick®, Papanicolaou® ve Spermac® ile elde edilen sonuçlar birbiri arasında uyumluluk göstermiştir. Fakat sadece baş-akrozoma bağlı bir değerlendirme söz konusu olur ise Hancock ile Diff-Quick®, Papanicolaou® ile SpermBlue® elde edilen sonuçlar daha uyumlu sonuçlar ortaya koymaktadır. Sadece spermatozoon gövde kısmına bağlı bir değerlendirme söz konusu olur ise; Hancock ile SpermBlue® elde edilen sonuçlar birbiri arasında daha uyumlu, sonuçlar ortaya koymaktadır. Anormal spermatozoanın değerlendirilmesinde eskiden beri anormal spermatozoon tespitinde kullanılan Hancock yöntemi temel diğer yöntemlerin birbirini doğrulaması açısından total hücre değerlendirilmesinde diğer yöntemler kullanılabilir düzeydedir. Kullanım kolaylığı ve uygulanabilirlik açısından Spermac® botama metodu daha önerilir düzeydedir.

KAYNAKLAR

- Aalseth, E. P., & Saacke, R. G. (1986). *Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm*. Gamete Research, 15(1), 73-81.
- Akal, E., Selçuk, M., & Demirci, E. (2017). *Epididimal boğa spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların etkisi*. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 88(2), 68-81.
- Ata, A., İnanc, M. E., Kankavi, O., Gülay, Ö. Y., & Gülay, M. Ş. (2014). *Epididimal ve dondurulmuş çözölmüş Holstain boğa spermasında farklı boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması*. Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute, 2(1), 1-12.
- Axner, E., Linde-Forsberg, C., Einarsson, S.: *Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat*. Theriogenology, 1999; 52: 767-778.
- Ax, R. L., Dally, M., Didion, B. A., Lenz, R. W., Love, C. C., Varner, D. D., ... & Bellin, M. E. (2000). *Semen evaluation*. Reproduction in Farm Animals, 363-375.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. a. t. h. a. l. y. (2000). *Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon*. Journal Of Andrology, 21(1), 1-7.
- Banaszewska, D., Andraszek, K., Czubaszek, M., & Biesiada-Drzazga, B. (2015). *The effect of selected staining techniques on bull sperm morphometry*. Animal Reproduction Science, 159, 17-24
- Baran, A., Şahin, B. E., Evecen, M., Demir, K., & Ileri, I. K. (2004). *Use of Spermac® staining technique in the determination of acrosomal defects in cat semen*. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 28(3), 519-525.
- Boersma, A., Rasshofer, R., & Stolla, R. (2001). *Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system*. Reproduction in Domestic Animals, 36(5), 222-229.
- Bohlooli, S., Cedden, F., Bozoglu, S., Razzaghzadeh, S. and Pishjang, J. 2012. *Correlation between conventional sperm assay parameters in cryopreserved Ram Semen*. Ann. Biol. Res. 3, 884-889.
- Bozkurt, E., & Tekin, N. (2002). *Boğa spermalarının farklı sulandırıcılar ile dondurulması ve in vitro değerlendirilmesi*. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 42(2), 1-17.
- Chan, P.J., Corselli, J.U., Jacobson, J.D., Patton, W.C., King, A., 1996. *Correlation between intact sperm acrosome assessed using the Spermac® stain and sperm-fertilizing capacity*. Arch. Androl. 36 1 , 25–27.
- Chan, P. J., Corselli, J. U., Jacobson, J. D., Patton, W. C., & King, A. (1999). *Spermac® stain analysis of human sperm acrosomes*. Fertility And Sterility, 72(1), 124-128.
- Chandler, J. E., Painter, C. L., Adkison, R. W., Memon, M. A., & Hoyt, P. G. (1988). *Semen quality characteristics of dairy goats*. Journal of Dairy Science, 71(6), 1638-1646.
- Daşkın, A., Demiral, O., & Yıldız, S. *Dondurulmuş boğa spermasında Glass Wool filtrasyon yöntemi üzerine çalışmalar*. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 3(2), 93-98.
- Delgado, C., Rosegrant, M., Steinfeld, H., Ehui, S., & Courbois, C. (2001). *Livestock to 2020: The next food revolution*. Outlook on Agriculture, 30(1), 27-29.

- Ene, D. *Akkaraman koçlarda spermanın kolesterol ve 7-dehidrokolesterol ile dondurulması ve değerlendirilmesi*. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme Ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara.
- Foot, R. H. (2010). *The history of artificial insemination: Selected notes and notables*. J. Anim. Sci, 80, 1-10.
- Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Alvarez, J. G., Thomas Jr, 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.
- Gilmore, J. A., Liu, J., Woods, E. J., Peter, A. T., & Critser, J. K. (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.
- Hancock, J. L. (1952). *The morphology of bull spermatozoa*. Journal of Experimental Biology, 29(3), 445-453.
- Hansen, D. (2009). Boğa spermasının sulandırılması ve dondurulması aşamaları. *Erişim Adresi: <http://www.sarkkemikal.com/hayvansagligi/pdf/spermahazirlama.pdf>*, Erişim Tarihi, 12, 2009.
- Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., ... & Sato, I. (2001). *Andrology: Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro*. Journal of assisted reproduction and genetics, 18, 215-220.
- Hossain, M. E., Khatun, M. M., Islam, M. M., & Miazi, O. F. (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.
- İşler, M., & Gökçen, H. (1987). *Bornova sun'i tohumlama laboratuvarı boğalarında morfolojik, spermatolojik ve bakteriyolojik araştırmalar*, Uludağ Üniversitesi, Bursa
- Januskauskas, A. and Rodriguez-Martinez, H. 1995. *Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen*. Acta Vet. Scand. 36, 571-574.
- Jasko, D. J., Lein, D. H., & Foot, R. H. (1990). *Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988)*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 197(3), 389-394.
- Keskin, O. *Erkek damızlıkların seçiminde dölverimi ve bulaşıcı hastalıklar yönünden muayeneler*. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 35(3-4), 56-70.
- Kirk, E.S., Squires, E.L. and Graham, J.K. 2005. *Comparison of in-vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa*. Theriogenology 64, 1422-1439.
- Kruger, T. F., Ackerman, S. B., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Brugo, S. S., & Acosta, A. A. (1987). *A quick, reliable staining technique for human sperm morphology*. Archives Of Andrology, 18(3), 275-277.
- Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., & Oehninger, S. (1988). *Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization*. Fertility And Sterility, 49(1), 112-117.
- Kumaresan, A., Das Gupta, M., Datta, T. K., & Morrell, J. M. (2020). *Sperm DNA integrity and male fertility in farm animals: a review*. Frontiers in Veterinary Science, 7, 321.

- Kumar, S. 2004. *Studies on the effect of certain additives on quality and fertility of cryopreserved semen of jersey bulls maintained under subtemperate climate*. M.V.Sc Thesis, CSKHPKV Palampur, India. p 47.
- Kuster, C. E., Singer, R. S., & Althouse, G. C. (2004). *Determining sample size for the morphological assessment of sperm*. Theriogenology, 61(4), 691-703.
- Lodhi, L.A., Zubair, M., Qureshi, Z.I., Ahmad, I. and Jamil, H. 2008. *Correlation between hypo-osmotic swelling test and various conventional semen evaluation parameters in fresh Nili-Ravi buffalo and Sahiwal cow bull semen*. Pakistan Vet. J. 28, 186-188.
- Mann, T. (1948). *Fructose content and fructolysis in semen. Practical application in the evaluation of semen quality*. The Journal of Agricultural Science, 38(3), 323-331.
- Menkveld R, Kruger TF (1996). *Evaluation of sperm morphology by light microscopy*. In: Acosta AA, Kruger TF, eds. *Human spermatozoa in assisted reproduction*, 2nd ed. London, Parthenon Publishing: 89-107.
- 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.
- Mercier, E., & Salisbury, G. W. (1947). *Effect of techniques of preparing semen smears for staining on the morphology of bull spermatozoa*. Journal of Animal Science, 6(1), 60-66.
- Meschede, D., Keck, C., Zander, M., Cooper, T. G., YEUNG, C. H., & Nieschlag, E. (1993). *Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis*. International Journal of Andrology, 16(6), 362-369.
- Mohammed, A. (2018). *Artificial Insemination and its Economical Significancy in Dairy Cattle*. Int J Res Stud Microbiol Biotechnol, 4(1).
- Morrell, J. M. (2011). *Artificial insemination: current and future trends*. Artificial insemination in farm animals, 1, 1-14.
- Mousavi, S. M., Towhidi, A., Zhandi, M., Amoabediny, G., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Sharafi, M., & Hussaini, S. M. H. (2019). *Comparison of two different antioxidants in a nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation*. Animal reproduction science, 209, 106171.
- Murcia-Robayo, R. Y., Jouanisson, E., Beauchamp, G., & Diaw, M. (2018). *Effects of staining method and clinician experience on the evaluation of stallion sperm morphology*. Animal Reproduction Science, 188, 165-169.
- 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, 1-14.
- Oetjen-Terdenge, M. (1988). *Überprüfung verschiedener Akrosomfärbungen zur Qualitätsbeurteilung von Nativ-und Tiefgefriersperma des Pferdes* (Doctoral dissertation, Uitgever niet vastgesteld).
- Oettlé, E. E. (1986). *Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen*. Animal Reproduction Science, 12(2), 145-150.
- Oettle, E. E. (1986). *Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology*. Veterinary Medicine (USA).
- Oettle, E.E. & Soley, J. T. (1985). *Infertility in a Maltese poodle as a result of a sperm midpiece defect*. Journal of the South African Veterinary Association, 56(2), 103-106.

- Özgöl, S. (2019). *Farklı kriyoprotektan solüsyonlarla Sperm Kriyoprezervasyonu ve sonuçlarının değerlendirilmesi* (Master's thesis, Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü), İstanbul.
- Papanicolaou®, G. N. (1942). *A new procedure for staining vaginal smears*. Science, 95(2469), 438-439.
- Ramu, S., & Jeyendran, R. S. (2013). *The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity*. Spermatogenesis: Methods and protocols, 21-25.
- Raseona, A. M., Ajao, O. A., Nethengwe, L. D., Madzhie, L. R., Nedambale, T. L., & Barry, D. M. (2017). *Viability of bull semen extended with commercial semen extender and two culture media stored at 24 C*. South African Journal of Animal Science, 47(1), 49-55.
- Rodriguez-Martinez, H. 2007. *State of art in farm animal sperm evaluation*. Reprod. Fertil. Dev. 19, 91-101.
- Runcan, E. E., Pozor, M. A., Zambrano, G. L., Benson, S., & Macpherson, M. L. (2014). *Use of two conventional staining methods to assess the acrosomal status of stallion spermatozoa*. Equine Veterinary Journal, 46(4), 503-506.
- Schafer S, Holzmann A. *The use of transmigration and Spermac®™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa*. Animal Reproduction Science 2000, 59(3-4), 201-211.
- Selcuk, M., Akal, E., Esin, B., Nizam, M. Y., & Genc, M. D. (2020). *Comparative evaluation of the effects of different thawing methods on bull sperm characteristics with computer-assisted semen analysis*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 44(6), 1316-1321.
- Selçuk, M., Akal, E., & Çelebi, M. *Farklı Sistemlerde Çözdürülen Dondurulmuş Boğa Spermasının İn Vitro Değerlendirilmesi*. Kocatepe Veterinary Journal, 7(1), 33-37.
- Senger, P. L. (1980). *Handling frozen bovine semen—Factors which influence viability and fertility*. Theriogenology, 13(1), 51-62.
- Sousa, A. P. M., Tavares, R. S., Velez de la Calle, J. F., Figueiredo, H., Almeida, V., Almeida-Santos, T., & Ramalho-Santos, J. (2009). *Dual use of Diff-Quick®-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status*. Human Reproduction, 24(1), 28-36.
- Sönmez, M. (2012). *Reproduksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları*. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ, Turkey.
- Tekin, N., Daşkın, A., Uysal, O., Akçay, E., Tırpan, M., & Çebi, Ç. (2011). *Dondurulmuş Boğa Spermalarında Spermatolojik Parametrelerin Konvansiyonel ve CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Yöntemiyle Değerlendirilmesi*. 6. Ulusal Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, 18-22.
- Tunalı, G. (2014). *Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü*. Androloji Bülteni Dergisi, 16(57), 123-128.
- Van der Horst, G., & Maree, L. (2010). *SpermBlue®®: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis*. Biotechnic & Histochemistry, 84(6), 299-308.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). *Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice*. Theriogenology, 57(1), 149-179.
- Viggiano, J. M., Herrero, M. B., Martínez, S. P., & de Gimeno, M. F. (1996). *Analysis of the effect of nitric oxide synthase inhibition on mouse sperm employing a modified staining method for assessment of the acrosome reaction*. Journal of Andrology, 17(6), 692-698.

- Yavaş, T. K., & Daşkın, A. (2012). *Alternatif dondurma ve saklama yöntemlerinin boğa sperması üzerine etkisi*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 59(3), 231-234.
- Yurdaydın, N., & Sevinç, A. (1985). *Boğa sperması ve spermatolojik özellikleri üzerinde çalışmalar*. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25(1-4), 30-41.
- Watkins, A. M., Chan, P. J., Patton, W. C., Jacobson, J. D., & King, A. (1996). *Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous Percoll gradient for sex preselection: computerized analyses*. Archives of Andrology, 37(1), 1-5.
- WHO (1999) *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Cambridge University Press, Cambridge.



ÖZ GEÇMİŞ

İsmail YAMAK, 2007 yılında Pazar Atatürk Lisesinde okumaya başladı. 2012 yılında Rize Pazar Atatürk Lisesi'ni bitirdikten sonra 2013 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi kazandı. 5 yıl süren Veteriner Fakültesi eğitim hayatını 2018 yılında mezun olarak bitirdi. Temmuz 2018-2021 yılları arasında sağmal 500 başlık süt işletmesinde sorumlu Veteriner Hekim olarak çalıştı. 2019 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmakta. 2022 yılında TARSİM hayvan hayat sigortasında eksper olarak çalışmakta. Temel ilgi alanları; spor, yeni yerleri keşfetmek, kitap okumak, satranç oynamak, aile ve sevdikleri ile beraber vakit geçirmektir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0001-7606-2898

Yayınlar:

1. Yamak, İ., & Akal, E.: Sexual Synchronization Methods In Cows. International Cappadocia Scientific Research Congress, pages 1244-1259. Online 11-12 December 2022, Oral Presentation (Tam metin bildirisi basıldı). Published: 25.12.2022. ISBN: 978-625-8254-08-2