



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

**DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ SİMENTAL BOĞA
SPERMASININ AKROZOM BÜTÜNLÜĞÜNÜN FARKLI
BOYAMA METOTDLARI KULLANILARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Emre KARA

Danışman
Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

SAMSUN
2023

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



**DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ SİMENTAL BOĞA
SPERMASININ AKROZOM BÜTÜNLÜĞÜNÜN FARKLI
BOYAMA METODLARI KULLANILARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Emre KARA

Danışman

Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.21.010 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

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 ☒

29 /12 / 2022

Emre KARA

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ SİMENTAL BOĞA SPERMASININ AKROZOM BÜTÜNLÜĞÜNÜN FARKLI BOYAMA METODLARI KULLANILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 05.12.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 20

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

29 /12 / 2022

Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

ÖZET

DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŞ SİMENTAL BOĞA SPERMASININ AKROZOM BÜTÜNLÜĞÜNÜN FARKLI BOYAMA METOTLARI KULLANILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Emre KARA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Dölerme ve Suni Tohumlama (Veteriner) Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Aralık/2022

Danışman: Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

Suni tohumlama uygulamalarında veya doğal aşımında sperması kullanılan erkek hayvana bağlı olarak değişen fertilite oranları büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle fertilite ve sterilitte hakkında bilgi verilmesi için erkek hayvanların potansiyel fertilitelerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Spermanın motilite ve kinematik değerlendirmeleri spermatozoanın fertilite kabiliyetini tahmin etmeye yardımcı olan güçlü parametrelerdir. Ancak bu muayeneler tam olarak fertilite kabiliyeti hakkında bilgi vermemektedir. Spermatozoonun motilitesi ve doğrusal yönde aktif olarak hareket etmesi dişi üreme kanalından geçebileceği hakkında bilgi verir. Fertilizasyon için ise başarılı bir akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi önemlidir. Akrozomun doğru zamanda aktivite edilmesi, enzimlerin salınması ve spermatozoonun zona pelucidaya nüfuz etmesini kolaylaştırmak başarılı bir fertilizasyon için akrozom bütünlüğünün önemini göstermektedir. Akrozom bütünlüğü fertilite başarısında çok önemli bir rol oynamaktadır. Akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesinde çok çeşitli boyama prosedürleri kullanılmaktadır. Bu prosedürler çoğunlukla anomalili spermatozoon ve akrozom yüzdesi belirlemede kullanılmaktadır. Bu doğrultuda tezde dondurulmuş çözündürülmüş Simental boğa spermasında akrozom bütünlüğünün farklı boyama metodları kullanarak karşılaştırılması ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışma ile Trypan Blue-Giemsa (TBG), Spermac ve Coomassie Blue boyamalarının Simental boğa spermalarında akrozom bütünlüğünün değerlendirmesinde basit, ucuz, güvenilir bir boyama yöntemi olduğunu gösterdi. Bu yöntemler ile tek frotide hem morfolojik muayene hem de ölü-canlı muayenesi yapılarak hızlı bir şekilde spermatozoonun değerlendirilmesi sağlanabilmektedir. Bu boyama yöntemlerinin çok kolay olması ve saha şartlarında kolay uygulanarak çok hızlı bir şekilde spermatozoonun morfolojik özellikleri açısından da bilgi sahibi olunabilme özellikleri göz önüne alındığında bu yöntemlerin çok avantajlı olduğu söylenebilmektedir. Bu üç boyama metodu karşılaştırıldığında spermatolojik parametreler ile en yüksek pozitif korelasyon gösteren Coomassie Blue boyaması olmuştur. Sonuç olarak, başta Coomassie blue olmak üzere hem trypan blue-Giemsa ve hem de Spermac metodları Simental boğalarda dondurulmuş-çözündürülmüş spermalarda hızlı çalışan, ölü canlı ve akrozomal/morfolojik bozuklukların hesaplanmasında kompleks laboratuvar şartları gerektirmeyen basit, ucuz ve etkili metotlar olup, rutin analizlerde hızla yerini almalıdır.

Anahtar Sözcükler: Akrozom bütünlüğü, Coomassie blue, Simental boğa sperması, Spermac, Trypan blue-Giemsa

ABSTRACT

EVALUATION OF ACROSOMAL INTEGRITY OF FROZEN-THAWED SIMMENTAL BULL SPERM USING DIFFERENT STAINING METHODS

Emre KARA

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Reproduction and Artificial Insemination

Master, December/2022

Supervisor: Prof. Dr. Mesut ÇEVİK

Fertility rates that vary depending on the male animal whose semen is used in artificial insemination or natural breeding are of great importance. For this reason, it is of great importance to know the potential fertility of male animals in order to provide information about fertility and sterility. Sperm motility and kinematic evaluations are powerful parameters that help predict the fertility ability of spermatozoa. However, these examinations do not give full information about the fertility ability. The motility of the spermatozoon and its active movement in the linear direction provide information about the ability to pass through the female reproductive tract. A successful acrosome reaction is important for fertilization. Activation of the acrosome at the right time, release of enzymes, and facilitating penetration of spermatozoa into the zona pellucida demonstrate the importance of acrosome integrity for successful fertilization. Acrosome integrity plays a crucial role in fertility success. A wide variety of staining procedures are used in the evaluation of acrosome integrity. These procedures are mostly used to determine the percentage of defective spermatozoa and acrosomes. In this direction, in our thesis project, it is aimed to compare and evaluate the acrosome integrity in frozen thawed Simmental bull semen using different staining methods.

This study showed that Trypan Blue Giemsa (TBG), Spermac and Coomassie Blue staining is a simple, inexpensive and reliable staining method for the evaluation of acrosome integrity in Simmental bull semen. With these methods, spermatozoa can be evaluated quickly by performing both morphological examination and dead-alive examination in a single smear. Considering that these staining methods are very easy and can be easily applied in field conditions, it can be said that this method is a very advantageous method, considering the morphological characteristics of spermatozoa very quickly. When these three staining methods were compared, Coomassie Blue staining showed the highest positive correlation with spermatological parameters. As a result, both Trypan blue-Giemsa and Spermac methods, especially Coomassie blue, are simple, inexpensive and effective methods that work fast in frozen-thawed semen of Simmental bulls, do not require complex laboratory conditions in the calculation of dead viviparous and acrosomal/morphological disorders, and are quickly used in routine analyses and should take its place.

Keywords: Acrosome integrity, Coomassie Blue, Simmental bull semen, Spermac, Trypane Blue-Giemsa

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

“Dondurulup-Çözdürülmüş Simental Boğa Spermasının Akrozomal Bütünlüğünün Farklı Boyama Metotları Kullanılarak Değerlendirilmesi” adlı yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve birikimleri ile destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Mesut ÇEVİK olmak üzere, desteklerini esirgemeyen Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalındaki değerli hocalarım Doç. Dr. Murat SELÇUK, Doç. Dr. Alper KOÇYİĞİT’e ve Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL’a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Tezimin istatistik çalışmalarımı yürüten Veterinerlik Biyometrisi Anabilim Dalındaki değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Serhat ARSLAN’a teşekkür ederim. Özellikle tez proje çalışmalarım sürecinde laboratuvardaki tüm çalışmalarında yardıma ihtiyaç duyduğumda yanımda olan değerli insan Araş. Gör. Burcu ESİN başta olmak üzere, Araş. Gör. Cumali KAYA ve Vet. Hek. Melih AKAR’a çok teşekkür ederim.

Hayatımda tüm varlığı ile beni motive edip güçlendiren sevgili eşim BİLGE KARA’ya ayrıca çok teşekkür ederim. Bu akademik çalışmam ailem ile birlikte anlam kazanmıştır.

Emre KARA

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	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. BOĞA SPERMATOZOONUNUN YAPISI	5
2.1. Baş	5
2.1.1. Nükleus	6
2.1.2. Perforatoryum	6
2.1.3. Akrozomal Yapı	6
2.1.4. Post-Nükleer Kap	7
2.1.5. İmplantasyon Çukurluğu	8
2.2. Boyun	8
2.3. Kuyruk	8
2.3.1. Orta Kısım	8
2.3.2. Esas Kısım	9
2.3.3. Son Kısım	9
3. BOĞALARDA SPERMATOLOJİK PARAMETRELER	10
3.1.1. Spermatozoa Motilitesi	10
3.1.2. Spermatozoa Yoğunluğu	11
3.1.3. Spermatozoa Morfolojisi	11
3.1.4. Plazma Membranı ve Akrozomal Bütünlüğü	13
4. SPERMANIN SAKLANMASI VE ÇÖZDÜRÜLMESİ	16
4.1. Spermanın Saklanması	16
4.1.1. Spermanın Kısa Süreli Saklanması	16
4.1.2. Spermanın Uzun Süreli Saklanması (Kriyoprezervasyon)	17
4.2. Spermanın Çözdürülmesi	19
5. SPERMANIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	21
5.1. Mikroskopik (Sübjektif) Değerlendirme	21
5.2. CASA (Bilgisayar Destekli Sperma Analizi) Değerlendirmesi	22
5.3. Flow Sitometrik (Akış Sitometrisi) Analizleri	23
6. MATERYAL VE METOT	24
6.1. Simental Boğa Spermalarının Seçimi	24
6.2. Deney Gruplarının Seçimi ve Planlanması	24
6.3. Spermanın Çözdürülmesi	24
6.4. Spermanın Muayenesi	24
6.4.1. Spermatozoa Motilitesinin Değerlendirilmesi	24
6.4.2. Plazma Membran Bütünlüğünün Değerlendirilmesi (Host Yöntemi)	26
6.5. Spermatozoa Akrozomal Bütünlüğünün Tespiti	26
6.5.1. Coomassie Blue Boyama ile Akrozomal Bütünlük Tespiti	28
6.5.2. Trypan Blue-Giemsa Boyama ile Akrozomal Bütünlük Tespiti	29
6.5.3. Spermac Boyama ile Akrozomal Bütünlüğün Tespiti	29
6.6. İstatistiksel Değerlendirme	31
7. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
7.1. Çözüm Sonrası Spermatojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	33
7.2. CASA Kinematik Parametrelerinin Değerlendirilmesi	37
7.3. Plazma Membran Bütünlüğünün HOST ile Değerlendirilmesi	38

7.4. Farklı Boyama Prosedürlerine Göre Akrozomal Bütünlüğün Değerlendirilmesi	41
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR	48
ÖZ GEÇMİŞ.....	59



SİMGELER VE KISALTMALAR

ALH	: Lateral Head Displacement (Yanal Kafa Deplasmanı)
ATP	: Adenosine Triphosphate (Adenozin Trifosfat)
BCF	: Beat Cross Frequency (Çapraz geçiş frekans ritmi)
CASA	: Computer Aided Sperm Analyzer
CB	: Coomassie Blue
C/P	: Kolesterol/fosfolipid oranı
CTC	: Chlortetracycline
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
FITC-PSA	: Fluorescein Isothiocyanate - <i>Pisum sativum</i> aglutinin
FITC-PNA	: Fluorescein Isothiocyanate Peanut Agglutinin
HOST	: Hypoosmotic Swelling Test
ICSI	: Intrastoplazmik Sperm Injection
IVF	: In Vitro Fertilization
LIN	: Linearity - Doğrusallık
μL	: Mikrolitre
PI	: Propidium Iodide
PM	: Progresif motilite
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
STR	: Doğrusallık
TM	: Total motilite
TBG	: Trypan Blue-Giemsa
VAP	: Velocity of Average Path - Ortalama yol hızı
VCL	: Velocity of Curvilinear - Eğrisel hız
VSL	: Velocity Straight Line (Doğrusal hız)

WOB : Wobble-Balancing – Dengeleme/Yalpalama
YMMP : Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli
ZP : Zona pellucida



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal spermatozoon şekli.....	5
Şekil 4.1. Boğa spermasının dondurulup çözündürülmesi sonrası spermatozoonda oluşan değişimlerin özeti.	18
Şekil 5.1. CASA cihazı.....	22
Şekil 6.1. Spermatozoanın Kinetik Hareketi.....	25
Şekil 6.2. CASA sisteminde sperma muayenesi.....	26
Şekil 6.3. Akrozomal boyama için preperat hazırlama.....	27
Şekil 6.4. Akrozom bütünlüğünün mikroskop ile değerlendirilmesi.....	27
Şekil 6.5. Coomassie Blue boyama ile akrozomal bütünlük değerlendirilmesi.....	28
Şekil 6.6. Trypane Blue-Giemsa Boyama ile Akrozomal Bütünlüğün değerlendirilmesi	29
Şekil 6.7. Spermac Boyama ile Akrozomal Bütünlüğün değerlendirilmesi.....	30
Şekil 7.1. Plazma membran bütünlüğü ile boyama protokollerinin ilişkisi.	40
Şekil 7.2. Akrozomal bütünlüğün belirlenmesinde kullanılan boyama metotlarının başarı durumu.....	44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 7.1. Dondurulup-çözdürülmüş Simental boğalardan elde edilen CASA spermatolojik parametre bulguları.....	35
Tablo 7.2. Önemli bazı sperm parameterleri ile plazma membran bütünlüğü ve akrozom bütünlüğü arasındaki korelasyonlar.....	36
Tablo 7.3. Dondurulup-çözülmüş Simental boğa spermalarında plazma membran bütünlüğü ile farklı boyama prosedürleri tespit edilmiş akrozom bütünlüğü ilişkisi	41



1. GİRİŞ

Suni tohumlama ya da doğal aşımında kullanılan erkek damızlık hayvanlara bağlı olarak şekillenen infertilite veya sterilite büyük ölçüde ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Yıldız vd., 2000). Bu nedenle fertilitiyi yakından ilgilendiren çalışmalarda erkek hayvanların potansiyel fertilitelerinin de bilinmesi önem taşımaktadır (Yıldız vd., 2000). Spermatozoonun fertilizasyon yeteneği ise birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu faktörlerden biri de spermanın kalitesidir. Sperma kalitesinin değerlendirilmesinde spermatolojik parametreler oldukça büyük önem taşımaktadır (Shukla, 2011).

Reprodüktif biyoteknolojiler günümüzde önemli ilerlemeler kaydetmekte ve geliştirilen birçok yöntem ile hayvan ıslahı ve hayvansal üretim konuları ele alınmaktadır. Reprodüktif biyoteknoloji ile üstün verim özelliklerine sahip hayvanların korunması ve sayılarının artırılması, genetik materyalin yaygınlaştırılması ve saklanabilmesi sağlanmaktadır. Bu biyoteknolojilerden bazıları suni tohumlama, in vitro fertilizasyon, embriyo transferi ve klonlamadır. Spermanın dondurulması ve çözüm sonrası fertilizasyon yeteneğini korunması bu biyoteknolojilerin başarısı için oldukça büyük önem taşımaktadır (Alomar et al., 2006).

Spermatozoonlar plazma, mitokondriyal ve akrozomal membran olmak üzere üç tip membrana sahiptir. Membranlar çoklu doymamış yağ asitleri içerir ve bu nedenle özellikle spermanın dondurma prosedürleri sırasında oluşan oksidatif strese karşı çok hassastır (Chelucci et al., 2015). Spermanın dondurma işlemi, spermanın sıvı nitrojen içinde düşük sıcaklığa (-196°C) maruz kalmasına neden olur. Donma işlemi spermatozoada soğuk şokuna, oksidatif strese ve buz kristallerinin oluşumuna neden olur (Prihantoko et al., 2020). Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) nedeniyle hücre hasarını artıran faktörlerden biridir. Spermatozoada aşırı ROS üretimi, fonksiyonel spermatozoon sayısı üzerindeki olumsuz etkilere sahiptir (Rath et al., 2009). Spermatozoa membranı, doymamış yağ asitleri açısından zengin olduğu için ROS varlığı nedeniyle oksidasyona karşı oldukça hassastır. Lipid peroksidasyon, membran fonksiyonlarını değiştirebilir ve dolayısıyla spermatozoa metabolizmasını, morfolojisini, hareketliliğini fertilizasyon yeteneğini azaltabilir (Insani et al., 2014). Başarılı bir sperma dondurma işleminde temel hedef spermanın fertilizasyon kabiliyetinin ve minimum hasar oluşumu sağlanarak sperma kalitesinin korunması

olmalıdır (Chelucci et al., 2015).

Laboratuvar testlerinin spermanın fertilitasını tahmin etme yeteneği, özellikle spermatozoon ve fertilizasyon sürecinin karmaşıklığı nedeniyle hala sınırlıdır (Prihantoko et al., 2020). Bir erkekte fertilitenin değerlendirilmesi sürecinde veya sperma muhafaza yöntemlerinin başarısının değerlendirilmesinde en önemli parametreler spermatozoa canlılığı, motilitesi ve akrozomal bütünlüğün analizidir. Spermatozoa canlılığı başarılı bir fertilizasyon için şart olduğundan sperma analizinde önemli bir parametredir (Morado et al., 2015; Sutovsky, 2015; Vasan, 2011). Motilite ve bireysel hareket skorları, spermatozoanın fertilizasyon kabiliyetini tahmin etmede gösterge görevi görmektedir, ancak tek başına değerlendirilmeleri spermatozoa dölleme kabiliyetini tam olarak ifade edemezler (Prihantoko et al., 2020). Spermatozoa motilitesi ve bireysel hareketi, yalnızca canlı spermatozoanın hareket edebildiği ve dışı üreme sisteminden geçebileceği hakkında bilgi verir (Prihantoko et al., 2020). Bununla birlikte, başarılı dölleme ve zigot oluşumu, büyük ölçüde, boğa dahil memeli spermatozoalarında kapasitasyon ve ardından akrozomal reaksiyonunun gerçekleşmesine bağlıdır. Bu nedenle, suni tohumlama için kullanılan sperma en başta sağlam akrozomal membrana sahip spermatozoa içermelidir (Jankovičová et al., 2008). Başarılı fertilizasyon için çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi ve spermatozoanın akrozomal bütünlüğü korunmalıdır (Singh et al., 2017; Thomas et al., 1997). Spermatozoanın dölleme kabiliyetini belirlemek için spermatozoanın akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi oldukça önemlidir (Prihantoko et al., 2020). Sadece akrozomal yapısı bozulmamış spermatozoa zona pellucidaya nüfuz edebilmekte ve oosit plazma membranını geçebilmektedir. Bu nedenle akrozom bütünlüğü fertilizasyon başarısının belirleyici faktörlerinden birisidir (Celeghini et al., 2010).

Akrozom, zona pellucida (ZP) yoluyla spermatozoon penetrasyonunda önemli rol oynayan enzimler içeren spermatozoa baş kısmı üzerinde bulunan zarla bağlı yapıdır (Yanagimachi, 1994). Ayrıca, spermatozoanın ZP'ye bağlanması, akrozom reaksiyonunu tetikleyerek (ZP3 ile temas sonrası gerçekleşir), sonraki vezikülasyon için dış akrozom zarının plazma zarı ile füzyonuna yol açar. Bu nedenle, fertilizasyonda spermatozoa akrozom bütünlüğü çok önemlidir (Rodriguez-Martinez et al., 1997). Spermatozoa akrozomal bütünlüğü, çeşitli boyalar kullanarak ışık mikroskobu veya faz-kontrast mikroskop kullanılarak in vitro olarak değerlendirilebilmektedir (Rodríguez-Martínez, 2006). Bununla birlikte, son

zamanlarda klortetrasiklin boyama (CTC) (Fraser et al., 1995; Hossain et al., 2010), para manyetik boncuklar (OHASHI et al., 1994), Kinakrin (Amin et al., 1996), FITC-PSA (Samardzija et al., 2006) ve FITC-Concanavalin A (FITCConA) (Fukushima et al., 2005; Holden and Trounson, 1991) gibi boyamalar ile floresan mikroskop altında in vitro değerlendirme teknikleri geliştirilmiştir. İmmüno floresan tekniği, akrozomal proteinlerin belirlenmesinde monoklonal antikor geliştirilmiştir (Rajamahendran et al., 1994). Alternatif olarak histokimyasal boyalar kullanılırken (Bryan and Akruk, 1977; Lenz et al., 1983), bazı türlerde lectine dayalı floresan boyamalar yapılmıştır (Bryan and Akruk, 1977). Ancak bu prosedürlerin birçoğunun dezavantajları bulunmaktadır (Larson and Miller, 1999). Örneğin bu tekniklerin antikorları yüksek maliyet gerektirmekte ve bulunabilirliğinin zor olması nedeniyle tekniği dezavantajlı konuma getirmektedir. Ayrıca floresan mikroskop ve elektron mikroskop ekipmanları sadece birkaç türün akrozom durumlarını belirlemek için kullanılmaktadır (Larson and Miller, 1999). Buna ilave olarak, histokimyasal boyama prosedürlerinde uzun bir zamana ihtiyaç vardır (Larson and Miller, 1999). Bu dezavantajları en aza indirmek amacıyla boğaların akrozomal/morfolojik durumlarını belirlemek için güvenilir ve daha düşük maliyetli olan boyama metotları kullanılmaktadır. Spermatozoanın akrozom bütünlüğü, basit ve etkili olarak bilinen Trypan Blue-Giemsa (TBG) ve Coomassie Blue (CB) gibi çeşitli boyama yöntemleri kullanılarak rahatlıkla gözlemlenebilmektedir. TBG boyaması, boğa ve domuz (Kovacs and Foote, 1992) gibi çeşitli türlerin spermatozoonlarının akrozom bütünlüğünün incelenmesinde kullanılırken, tavşan (Larson and Miller, 1999) ve insan (de Oliveira et al., 2011) spermatozoasında CB boyamasının yaygın olarak kullanıldığı rapor edilmiştir. Her iki boyama yönteminin de protein yapıları için yüksek affinitesi vardır ve spermatozoa akrozomunu boyamaları beklenmektedir. TBG, hücre proteinine bağlanabilen boya kombinasyonudur. Giemsa'nın düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu ve spermatozoa akrozomunu koruyan hücre zarından rahatlıkla geçebildiği bilinmektedir. Daha önceden yapılan bir çalışmaya göre (Nofa et al., 2017), TBG boyamasının, CB boyamasından uygulanabilirlik açısından daha basit ve kolay kabul edildiğini bildirilmiştir. Yukarıda belirtilen iki boyama yöntemine ek olarak, metanol fikzasyonu ve Giemsa boyamasını birleştirerek daha basit ve kolay bir yöntem olan tek başına Giemsa boyaması kullanılarak spermatozoa akrozomal bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılmıştır (Almadaly et al., 2014). Son yıllarda ise Spermac boya akrozomal hasarları değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Spermac prosedürüne

göre boyama sonrası preparatta arka plan leke tutmadığı için sulandırılmış ve/veya çözündürülmüş sperma için kullanılabilen hızlı, güvenilir ve kolay bir prosedür olarak tanımlanmaktadır (Oettlé, 1986; Oettle and Soley, 1986; Schäfer and Holzmann, 2000).

Bu tez çalışmasında, dondurulup-çözündürülmüş Simental boğa spermasında CASA sistemi ile spermatozoa motilitesi, kinematik sperm parametreleri, HOST tekniği ile spermatozoon plazma membran bütünlüğünün tespiti ve üç farklı basit boyama tekniği (Trypan Blue-Giemsa (TBG), Coomassie Blue (CB) ve Spermac boyama) kullanılarak spermatozoanın akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi ve boyama prosedürlerinin etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.



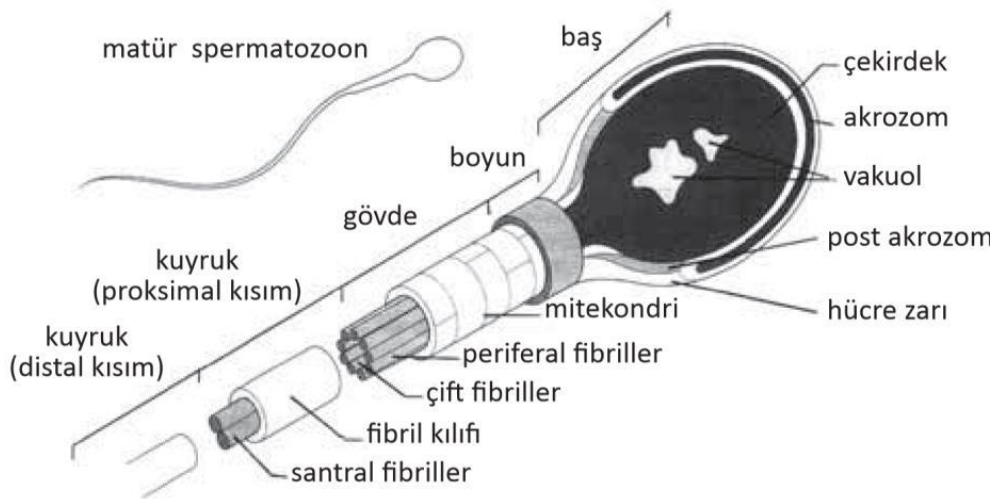
2. BOĞA SPERMATOZOONUNUN YAPISI

Spermatozoon; spermatogenezis sonucu oluşan ve erkeğe ait genetik materyali taşıyan üreme hücresidir. Spermatozoonlar özellikle üremenin gerçekleşmesinde rol oynarlar. Hareket ve penetrasyon yeteneğine sahiptirler. Bu fonksiyonlarından birinin aksaması halinde ovumu fertilize edebilmesi mümkün olmamaktadır (Hafez, 1993).

Spermatozoonun yaklaşık uzunluğu boğalarda 68-70 mikrondur. Spermatozoonun şekli canlılar arasında birtakım farklılıklar göstermekle birlikte yapısal kısmı, akrozom ve nükleusu taşıyan baş kısmı, sentriol halkaları ve mitokondriumları taşıyan orta kısım (8-10 p) ve hareketi sağlayan kuyruk (50 p) kısmı olmak üzere başlıca üç ana bölümden oluşur (Shahani et al., 2010) (Şekil 2.1).

2.1. Baş

Spermatozoonun başı türe göre değişik biçim ve büyüklükte olup 8–10 μm uzunluğunda, 4-5 μm genişliğinde ve 0,3 μm kalınlığındadır. Şekli daha çok bir fırın küreği gibi yassı ve oval bir yapı gösterir. Spermatozoonun baş kısmı iki tabakalı bir membranla sarılıdır. Spermatozoonların dış membranı ihtiva ettiği değişik lipoproteinler, fosfolipitler ve antijenik yapıları ile diğer hücre membranlarından farklılık göstermektedir. Mevcut olan bu proteinler spermatozoonların epididimal geçişi ya da olgunlaşması sırasında yerleşmektedir. Baş kısmını saran dış membran aynı zamanda kuyruğu da çevreleyerek bütün hücreyi kaplamaktadır (Hafez, 1993).



Şekil 2.1. Normal spermatozoon şekli (Erdemir vd., 2011).

2.1.1. Nükleus

Başın büyük bir bölümünü kromozom ve genleri içeren nükleus (çekirdek) kaplar. Genetik materyali taşıyan nükleusun %45'i DNA'dan oluşmuştur. DNA, kromozom ve genleri içerdiğinden kalıtsal özellikleri aktaran en önemli kısımdır. Kalan kısmı ise aminoasitlerden kurulu özel proteinler teşkil eder. Mayoz bölünme sonrasında spermatozoonlar haploid (n) kromozom sayısına sahiptirler. Bunlardan Y kromozomu taşıyanlar; *Androspermatozoonlar*, X kromozomu taşıyanlar ise *Ginospermatozoonlar* olarak adlandırılırlar. (Shahani et al., 2010).

2.1.2. Perforatoryum

Nükleus membranı ile akrozomal kap arasında yer alan ve belirgin bir çıkıntı şeklindeki oluşumdur. Bu yapının spermatozoonun ovumun zona pellucidasını delip geçmesinde belli görevler üstlendiği bilinmektedir (Sönmez, 2016).

2.1.3. Akrozomal Yapı

Başın ön bölümünde, nükleus membranı ile dış membran arasında bulunur. Nükleusun ön bölümünün yaklaşık %60'ını kaplar. Akrozom, fertilizasyon sırasında spermatozoonun ovum üzerinde bulunan Corona radiata ve zona pellucidayı geçebilmesi için gerekli olan enzimleri taşır (Hafez, 1993).

Akrozomal yapı spermatogenezis sırasında golgi kompleksinden gelişmektedir. Ayrıca lizozomal hidrolitik enzimleri içerdiğinden primer lizozom olarak kabul edilmektedir. Akrozom sahip olduğu lizozomal hidrolitik özellikteki enzimler, fertilizasyon sırasında cumulus ooforus ve corona radiata hücrelerinin parçalanıp dağılmasını ve zona pellucidadaki hiyaluronik asidin yıkılmasına sebep olmakta ve spermatozoonun ovuma penetrasyonunu kolaylaştırdığından dolayı fertilizasyonun başarısında büyük öneme sahiptirler. Golgi organeli, spermatidlerin metamorfozu ve olgunlaşması başlangıcında paranükleer konumda lokalize olur. Endoplazmik retikulumda yapılan hidrolitik enzimler Golgi aygıtına taşınır. Burada değişikliğe uğradıktan sonra veziküller halinde Golgi organelinin şekillendirmesi dolayısıyla ayrılırlar. Küçük veziküller birbirleriyle birleşerek spermatozoonun ön yüzünde kaynaşır ve ünit membranla sarılan iri akrozomal vezikülü oluştururlar. Oluşan vezikül irileşip, orta kısmı çökerek genetik maddeyi kuşatan içi çukur yapıya dönüşerek akrozomu şekillendirir. Bu çökme nedeniyle akrozomun anterior tarafında içte ve dışta olmak üzere iki zarı bulunur. Akrozomun posterior tarafında ise akrozomda daralma ve

içeriğın yoğunlaşmasıyla karakterizedir. Burada dış ve iç akrozom zarları kaynaşarak akrozomun ekvatoryal segmentini oluşturur. Nükleusun tabanı kükürtçe zengin ipliksel proteinlerin oluşturduğu postakrozomal kılıfla sınırlanmaktadır (Canbolat, 2019; Demirci, 2002; Shahani et al., 2010).

Akrozomal yapıda birçok hidrolitik enzim bulunmaktadır. Spermatozoonun zona pellucidaya penetrasyonunda akrozomal enzimler gereklidir. Önemli olan hidrolitik enzimler; *asit fosfataz*, *akrozin*, *nöraminidaz* ve *tripsin benzeri proteazlar*'dır. Spermatozoonlar kapasitasyon geçirdikten sonra, akrozom reaksiyonu sırasında bu enzimler serbest kalırlar. Ovumun plazma membranıyla spermatozoon dış akrozomal membranının birleşmesini takip eden ekzositoz sonucu hidrolitik enzim vezikülleri dış ortama salınır. Spermatozoonun ovum dışındaki corona radiata tabakasını geçmesinde Hyalüronidaz rol alırken; akrozom reaksiyonu olarak bilinen olay sonucunda akrozin ve tripsin benzeri proteazlar zona pellucidayı eriterek, fertilizasyonun ilk basamağının gerçekleşmesini sağlarlar. Fertilizasyon öncesi spermatozoonun, dişi genital kanalında ortam koşullarına uyumu, seminal plazma proteinlerini kaybetmesi ve ovuma penetrasyon yeteneği kazanmasını sağlayan kapasitasyon potansiyelinin kazanmalıdır. Kapasitasyon sırasında gerçekleşen olaylar morfolojik özelliklerden ziyade biyokimyasal olaylardır. Bu yeteneğe sahip olan spermatozoon, zona pellucidaya penetre olabilmek için öncelikle akrozom reaksiyonunu geçirmelidir. Spermatozoonun zona pellucidaya bağlanması esnasında spermatozoonun baş bölgesinde bulunan spesifik reseptörler aktive olmakta ve bunların eksozitozu gerçekleşir. Plazma membranı akrozom membranıyla kaynaşarak akrozomal içerik serbest kalır. Bu sayede spermatozoon kimyasal sindirime uğrayan zona pellucidaya penetre olur. Akrozomal anomaliye sahip spermatozoonlar ovuma penetre olamamaktadır (Akyol, 2005). Akrozomun yapısal özellikleri klinik muayenede ve suni tohumlamada ejakülatın fertilitésinin değerlendirilmesinde dikkate alınan önemli faktörlerdendir. Spermanın dondurma tekniklerinin gelişmesiyle, dondurma işleminin olumsuz etkilerine karşı daha duyarlı olan akrozomun yapısal özelliklerin belirlenmesi büyük önem kazanmıştır (Canbolat, 2019).

2.1.4. Post-Nükleer Kap

Post nükleer kap spermatozoon başının posterior bölümünde bulunan akrozomun uzanmadığı kısımdır. Nükleusun posterior %40'ını sarar. Akrozomal kap ile post-nükleer kap arasında ekvatorial segment bulunur. Bu bölüm fertilizasyon

sırasında oositin vitellin membranı ile spermatozoonun kaynaştığı bölge olup herhangi bir enzim içermez (Demirci, 2002; Shahani et al., 2010).

2.1.5. İmplantasyon Çukurluğu

Spermatozoon başının tabanında ve ortasında sıkışmış vaziyettedir. Başın içine doğru bir çukurluk yapar. Baş bölgesinin kuyruğun orta kısmı ile birleşme yerinde bulunur. Bu çukurcuğun toplam genişliği 1 μ m kadardır (Hafez, 1993).

2.2. Boyun

Başın implantasyon çukurluğu ile kuyruğun orta kısmının birleştiği bölgeye verilen addır. Bu bölgede kuyruğa ait *kapitulum* adı verilen çıkıntılı alan, implantasyon çukurluğunun içine sıkıca girer. Bu birleşme yerinin her iki tarafında yarım ay şeklinde bazal plaklar bulunur. Bu plaklar baş ile orta kısım arasında özel bir bağlantı sağlayarak eklem vazifesi görürler (Hafez, 1993).

2.3. Kuyruk

Spermatozoon hareket yeteneğini sağlayan kuyruk kısmı başlıca üç ana bölümden oluşmuştur. Bunlar sırasıyla, orta kısım, esas kısım ve son kısım olarak adlandırılır (Chenoweth, 2005).

2.3.1. Orta Kısım

Orta kısmı, spermatozoonun baş kısmı ile kuyruk üzerindeki annulus (daralma) bölgesi arasında kalan bölge oluşturur. Spermatozoonun orta kısmı yaklaşık 8–10 μ m uzunluğunda olup üst ucu başa ait implantasyon çukurcuğu içerisine oturmuş vaziyette olup baş kısmına iki merkezi fibril vasıtasıyla sıkıca bağlanmıştır. Orta kısımda enerji üretimi ve dağıtımı için gerekli olan metabolik organeller, *mitokondriumlar*, *proximal* ve *distal sentriol halkaları* ve *fibriller* bulunur (Hafez, 1993; Chenoweth, 2005).

Kuyruğun hareket sistemini oluşturan axial fibril yığını, ortada iki merkezi fibril ile bunların çevresinde içte 9 çift küçük ve dışta 9 adet büyük ve yoğun fibrilden oluşan bir yapıya sahiptir. Dış taraftaki 9 fibrilden 3'ü diğerlerine göre daha kalındır. Bu yapı içerisinde iki merkezi fibril ile bunların çevresindeki 9 çift küçük fibrile “aksiyal filament” adı verilirken, dış taraftaki diğer 9 adette büyük fibril ise “periferik halkayı” oluşturur. Orta kısımdaki axial fibrin yığınının etrafı mitokondriyal bir heliks (halka) ile çevrilidir. Bunlar spermatozoonun hareketi için gerekli olan enerjinin üretim merkezleridir. Mitokondriyal halka, 10-150 derecelik bir açı ile üst kısımdan

başlayarak orta kısmın etrafını 70–80 kez çevirerek annulusta sonlanır. Sentriollar, motilitenin kontrol merkezi olup hareketin başlangıcında rol oynadıkları sanılmaktadır (Hafez, 1993).

2.3.2. Esas Kısım

Kuyruk üzerinde orta kısmın bittiği yer olarak kabul edilen daralma (annulus) alanından itibaren esas kısım başlar. Bu iki bölge arasındaki en önemli farklılık mitokondriyal kılıfın yerini fibröz bir kılıfın almasıdır (Hafez, 1993).

Spermatozoonların hareket edebilmeleri öncelikle kuyruğun yapacağı kamçı hareketine bağlıdır. Orta kısmın üst ucundan başlayan aksiyal fibril yığını, kuyruğun son kısmına kadar uzanır. Bu fibrillerin çapları esas kısımda orta kısma göre daha küçülmüştür. Mevcut bu fibrillerin düzenli kontraksiyonu kuyruğun kamçı hareketine sebep olur. Bu da spermatozoonu ileri doğru iter. Kontraksiyonlar proximal sentrioldan başlayıp dört bir yandaki fibrillere yayılarak uyum içerisinde kuyruğun ucuna kadar ilerletilir. Sonuçta kuyruk "S" şeklinde bir görünüm kazanır (Hafez, 1993).

Esas kısım üzerinde bulunan fibröz kılıfın asıl görevi iletilen bu hareketin kuyruk boyunca dengeli bir şekilde sürdürülmesinin sağlanmasıdır. Spermatozoon devamlı olarak ileriye doğru hareket ederken aynı zamanda uzun eksen etrafında da döner. Bu şekilde boğa spermatozoonları ileriye doğru 6 mm/dakika hızla hareket etmektedir (Gil et al., 2009).

2.3.3. Son Kısım

Kuyruğun fibröz kılıftan yoksun olan ve yaklaşık 3 µm uzunluğundaki en uç bölümüne “son kısım” adı verilir. Bu kısımda dıştaki 9 adet kalın fibril (periferik halka) bulunmaz. Ayrıca, bu bölgede içteki merkezi fibrillerin saçak şeklinde uzandıkları da görülebilir (Hafez, 1993).

3. BOĞALARDA SPERMATOLOJİK PARAMETRELER

Suni tohumlamada tercih edilen damızlık boğaların döl verimlerinin belirlenmesi için sperma numunelerinin ilk olarak spermatolojik özellikleri değerlendirilmelidir. Bu şekilde yapılan ön muayenelerde spermanın fertilite kabiliyeti hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Dondurulmuş boğa sperma özelliklerinin değerlendirmesinde tüm dünyada en yaygın olarak kullanılan temel spermatolojik parametreler; motilite, yoğunluk ve spermatozoonların morfolojik yapılarının incelenmesini içermektedir (Shukla, 2011). Spermatozoa motilitesi, konsantrasyonu ve morfolojisi sperma kalitesini değerlendirirken en önemli üç parametre olarak kabul edilir. Spermatozoanın morfolojik özellikleri, spermatozoonun dölleme kapasitesini tahmin etmede güvenilir bir gösterge işlevi görür ve ayrıca spermatogenezisin belirli bozukluklarını yansıtır (Beletti et al., 2017; Boersma et al., 2001). Ayrıca motilite ve morfolojik parametrelere ek olarak hipo-ozmotik şişme testi (plazma membranı bütünlüğü testi), mukus veya jel penetrasyonu ve DNA bütünlüğü testleri de spermatozoanın fertilizasyon yeteneğinin değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerdir (Bacinoğlu and Kemal, 2007; Foote, 1989; Ghonimi et al., 2014; Graham, 1978; Saacke, 1982).

Boğalardan çeşitli yöntemlerle alınan spermallerdeki bazı spermatolojik özelliklere ait ortalama değerler aşağıda verilmiştir: ortalama sperma hacimi 4 – 8 ml, spermatozoa motilitesi % 50 – 80 aralığında, spermatozoa yoğunluğu 1000 – 1500 x 10⁶ spp/ml, kabul edilebilir anormal spermatozoon oranı % 5-20 aralığında ve sperma pH değeri 6,5-7,0 aralığında kabul edilmektedir (Hafez, 1993).

3.1.1. Spermatozoa Motilitesi

İleri yönlü hareket eden spermatozoonların ortamdaki ölü ve diğer hareket biçimi gösteren spermatozoonlara oranının yüzde olarak ifadesidir. Bu parametre nin değerlendirmesinde, ısıtma tablalı (37°C) faz-kontrast mikroskoplar kullanılır. Çözüm sonrası payet içeriği eppendorf bir tüp içerisine aktarılır ve otomatik pipet aracılığıyla içerisinden 5 µl sperma çekilerek lam üzerine bırakılır. Daha sonra lamel kapatılarak faz-kontrast mikroskopta 10x veya 20x büyütmede spermatozoonların bireysel hareketleri incelenir. Mikroskop sahasında bulunan spermatozoonun ileri yönlü harekete edenleri dikkate alınarak yüzde oranı (%) olarak değerlendirilir. Çözdürme sonrası başarılı bir boğa sperması için motilite değeri >%45'den fazla olmalıdır (İleri

vd., 2000; Salisbury et al., 1978).

3.1.2. Spermatozoa Yoğunluğu

Birim hacimde (ml ya da cm³) bulunan spermatozoon sayısıdır. Spermanın yoğunluğu özellikle sulandırma oranının tespitinde ya da bir payet içerisindeki spermatozoon sayısının bilinmesinde oldukça büyük önem taşımaktadır. Boğa spermasında bir payette bulunması gereken motil spermatozoon sayısı ile fertilité arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır (İleri vd., 2000). Hemositometre adı verilen ve kan hücrelerinin sayımında kullanılan yöntem yoğunluğun tespitinde pratik olarak kullanılmaktadır. Günümüzde ise her hayvan türü için ayrı olarak kalibre edilebilen sperma analiz cihazları CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) bu amaçla kullanılmaktadır (Amann and Waberski, 2014). Normal bir boğanın taze spermasındaki spermatozoon yoğunluğu ortalama $0,8-1,0 \times 10^9$ spermatozoon/ml'dir (İleri vd., 2000).

3.1.3. Spermatozoa Morfolojisi

Spermatozoonlar sağlam bir plazma membranı sayesinde bulundukları ortamdaki madde alışverişinin sağlanması, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon sırasında oosit membranına tutunabilmeyi gerçekleştirebilmektedir (Töpfer-Petersen et al., 1990). Birincil derecedeki morfolojik bozukluklar spermatogenezisteki farklı bozukluktan kaynaklanabilirken, ikincil derecedeki morfolojik bozukluklar spermatozoonun epididimisten geçişi sırasında oluşabilmektedir. Üçüncül derecede oluşan morfolojik bozukluklar ise ejakülasyondan suni tohumlama uygulamasına kadar geçen aşamalarda oluşan hasarlardır (Garner and Hafez, 2000).

Rutin olarak gerçekleştirilen sperma muayenesinde morfolojik bozukluklar spermatoozoonda bulundukları bölümüne göre sınıflandırılmaktadır. Bunlar; akrozom, baş, orta ve kuyruk anomalileridir. Bu bozuklukların toplam oranı en fazla %15-20 arasında olmalıdır (İleri vd., 2000). Sperma morfolojisinin değerlendirmesi, insanlar ve hayvanlar için sperma örneğinin kalitesini belirlemede en önemli kriterlerden biridir (Gravance et al., 1998; Henkel et al., 2008; WHO, 1999; Van der Horst et al., 2009). Normal morfolojiye sahip spermatozoa yüzdesini belirlemek için birçok tekli ve kombine boyama protokolleri kullanılmıştır. Spermatozoa morfolojisi değerlendirmesinin doğruluğu, sperma örneğinin dikkatli bir şekilde hazırlanmasına,

sabitlenmesine ve boyanmasına bağlıdır (García-Herreros et al., 2006), çünkü bu prosedürler spermatozoon boyutlarını önemli ölçüde etkileyebilir (Gago et al., 1998; Hidalgo et al., 2006; Łukaszewicz et al., 2008; Meschede et al., 1993).

Spermatozoonlardaki anormal yapıları başlıca üç grup altında sınıflandırmak mümkündür. Bunlar;

Primer bozukluklar; Spermatogenezis sırasında oluşan anormal yapılardır. Daha çok başa bağlı anormallikler ve yapısal bozukluklar bu sınıfa girer (Diemer and Desjardins, 1999).

Sekunder bozukluklar;

Spermatozoonların epididimisten geçişi ile olgunlaşması sırasında ve üretraya kadarki transportları boyunca ortaya çıkan anomalilerdir (Hafez, 1993).

Tersiyer Bozukluklar; Spermanın alınması, sulandırılması ve diğer işlemler sırasında ortaya çıkan uygunsuz şartlara bağlı olarak görülen anormalliklerdir. Daha çok kuyrukla ilgili olarak şekillenirler (Hafez, 1993).

Spermatozoitlerde görülen başlıca morfolojik bozuklukları ise şu şekilde sıralayabiliriz,

Baş Ait Bozukluklar

Akrozom Bozuklukları: Çözülmüş akrozom, dejenere akrozom, eğik akrozom, küçük akrozom, granüllü akrozom, akrozomsuz (Hafez, 1993).

Şekil Bozuklukları; Dar başlı, yuvarlak başlı, armut başlı, kopuk baş, dev başlı, gelişmemiş baş, küçükbaşlı, kürek şekilli baş, mızrak şekilli baş (Sönmez, 2016).

Orta Bölüme Ait Bozukluklar

Protoplazmik damlacık, boyun kırılması, boyun kopması, kısa boyun, ince boyun, uzun boyun, katlanmış boyun, deforme boyun olarak değerlendirilir.

Bağlantı bozuklukları ise Abaxial, para axial, retroaxial bağlanmalar olarak değerlendirilir (Chenoweth, 2005; Shahani et al., 2010).

Esas kuyruğa ait bozukluklar

Kıvrılmış kuyruk, kırılmış kuyruk, fibrinli kuyruk, kendi etrafına sarılmış kuyruk, başsız kuyruk, başa sarılmış kuyruk (Hafez, 1993).

Yapısal Anomaliler

Tek baş - çift kuyruk, çift baş - tek kuyruk, çift baş, üç kuyruk, tek baş-üç kuyruk, çift baş - çift kuyruk olarak değerlendirilir. Anormal yapılı spermatozoonların meydana geliş nedenleri saptanmaya çalışılmalı ve bu durumun kalıtsal nedenlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı ortaya konmalıdır. Özellikle mevsimsel poliöstrik olan hayvanlarda aşım sezonunun dışında anormal spermatozoon oranında bir artış görülebilir.

Bazı bozukluklar, kalıtsal olarak ortaya çıkabilmekte olup belirli tür ve ırklarda daha fazla görülebilir. Örneğin, Holstein-Friesian boğalarda akrozomal bölgede bir yumrunun bulunması, Guernsey ırkı boğalarda kopuk başa fazla rastlanması, Jersey ırklı boğalarda kıvrık kuyruğun fazla olması buna örnek olarak verilebilir (Shahani et al., 2010).

3.1.4. Plazma Membranı ve Akrozomal Bütünlüğü

Plazma membranı, spermatozoada hücre içi bileşenleri bir arada tutar ve yarı geçirgen özelliği ile iyon ve diğer çözünür bileşenlerin kimyasal gradyanını korur. Spesifik plazma membran proteinleri, glukoz ve fruktozun hücre dışı ortamdan spermatozoon içine taşınmasını kolaylaştırır (Burant and Davidson, 1994; Schürmann et al., 2002). Bu taşıyıcılar vazgeçilmez enerji kaynağı substratlarıdır. Spermatozoonda ATP'nin yaklaşık % 90'ı glikoliz (anaerobik) tarafından üretilir, bu da ATP üretimi için substrat olarak monosakkaritlerin önemini gösterir (Marin et al., 2003; Mukai and Okuno, 2004). Spermatozoon plazma membranı işlevsel olarak sağlam değilse, spermatozoon bozulmuş/ölü spermatozoon olarak kabul edilir ve fertilizasyon yeteneğine sahip değildir. Plazma membranı bütünlüğünün korunması, dondurularak kurutulmuş ve rehidre edilmiş spermin (liyofilize sperm, dolayısıyla fonksiyonel bir plazma zarı olmadan) yavru üretmek için kullanıldığı oositlerdeki ICSI uygulaması için geçerli değildir (Kusakabe and Kamiguchi, 2004; Kwon et al., 2004). Ancak geleneksel IVF ve suni tohumlama gibi diğer yardımcı üreme teknolojileri için, spermatozoon plazma membran bütünlüğünü değerlendirmek oldukça önemlidir. Plazma membran bütünlüğü genellikle hücrelerin membranlarından geçirmeyen boyalarla boyanması ile değerlendirilir. Bu boyaları içerisine almayan hücreler canlı olarak kabul edilebilirken boyaları içerisine alan hücreler ölü olarak kabul edilir. Güncel yapılan uygulamalarda, bu parametrenin değerlendirilmesi için DNA'ya afinitesi olan bir dizi membran geçirmeyen floresan prob da kullanılmaktadır. Bu

prensipte çalışan farklı problemler, her biri farklı uyarma (excitation) ve emisyon (em) özelliklerine sahip spermatozoon hücreleri için test edilmiştir. Bu özelliklere sahip problemler: *Hoechst 33258* (358/488 nm dalga boyunda ex/em (Hong et al., 1988; McLaughlin et al., 1992); *YoPro-1* (ex/em 488/515 nm dalga boyu (Harrison et al., 1996); *propidiumiodide* (Garner et al., 1986; Pintado et al., 2000) veya *etidiumhomodimer-1* (Cheng et al., 1996) (her ikisi de ex/em of 488 ve 568/>620 nm dalga boyuna sahiptir); *ToPro-3* ve *TOTO* (647/670 nm dalga boyunda ex/em sayılabilir (Haugland, 1996). Sözcük anlamı ‘yaşayabilirlik’ olarak tanımlanan viyabilite içinde de değerlendirilen plazma membranı veya akrozom bütünlüğü fertilite açısından da önemli belirteçlerden bir tanesidir. Spermatozoonun plazma membran ve akrozom bütünlüğünü birlikte değerlendiren bu analiz de androloji laboratuvarlarının birçoğunun kullanmakta olduğu floresan boyaların akış sitometrisi yöntemine adapte edilmesi sonucu hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu amaçla yaygın olarak, SYBR-14, Propidium iodide (PI), FITC-PNA, FITC-PSA, Yo-Pro-1, 7-AAD, rhodamine 123, carboxyfluorescein diacetate gibi floresan boyalar ya da PI ile kombinasyonları kullanılmaktadır (Petrunkina and Harrison, 2011). Teknik, genellikle PI ile kombinasyonların membrandan geçebilen (örn. PI) ya da geçemeyen DNA’ya bağlanabilen (örn. SYBR14) florokromların saptanması üzerine kuruludur. Bu amaçla örnekler SYBR-14 ve PI ile laboratuvarların kendine ait protokolleri kapsamında boyanarak (de Lourdes Pereira et al., 2016) 488 nm lik argon lazer ve 515 nm-545 nm (SYBR), 561 nm-583 nm emisyon filtreleri ile ölçümleri yapılır. Boğa spermasında plazma membranı bütünlüğü ve akrozom bütünlüğü (PMAI)’nin belirlenmesinde, çok yaygın olarak kullanılan SYBR-14/PI kombinasyonunun (Nagy et al., 2003) yapmış oldukları çalışma ile tekrarlandığında verdiği doğruluk ve dondurma aşamasında eklenen yumurta sarısından dolayı verdiği hata sebebiyle yerini fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated PNA ve PI kombinasyonuna bırakmasını önermişlerdir. Böylece, FITC-PNA ile akrozom bütünlüğü değerlendirilirken, PI ile plazma membran bütünlüğü ile ilgili veri debrisden olabildiğince arındırılarak elde edilebilir. Bu amaçla, 5 µl FITC-PNA (100 µg/ml) ve 3 µl PI (2.99 mM), 492 µl dilüe sperma solüsyonuna aktararak boyama yapılmaktadır (Gürler et al., 2016).

Spermatozoa membran işlevselliğini test etmenin alternatif bir yolu da, onları hipoozmotik bir ortama maruz bırakmaktır (Check et al., 1989; Jeyendran et al., 1992). Spermatozoon plazma membranının hipoozmotik ortama maruz bırakılması halinde

ozmotik basınçlar eşitleninceye kadar hücre içine su girmektedir. Bu su girişinden dolayı hücrenin hacmi ve hücre zarı hacmen büyür ve bunun sonucunda plazma membranında şişlikler oluşur (Nur ve Soylu, 2003). 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 membrana sahip olmayan spermatozoonda bu reaksiyonlar görülmez (Nur ve Soylu, 2003).



4. SPERMANIN SAKLANMASI VE ÇÖZDÜRÜLMESİ

4.1. Spermanın Saklanması

Sperma alındıktan sonra herhangi bir işleme tabi tutulmadan en kısa süre içerisinde kullanılması gerekir. Bu şekilde 30 dakikadan fazla bekletilmesi fertilizasyon yeteneğinin hızla azalmasına yol açacaktır. Ancak alınan spermanın kısa bir süre içinde kullanılabilme imkânının olmaması yani belli bir zamanda tohumlamaya hazır halde yeterli sayıda kızgın dişinin bulunamaması, spermanın belirli bir süre saklamasını zorunlu hale getirmiştir. Spermanın saklanması, ancak uygun sulandırıcı içinde sıcaklığının düşürülmesi ve spermatozoonların hareketlerinin sınırlandırılmasını sağlamak suretiyle mümkündür. Bu amaçla günümüzde sperma kısa ve uzun süreli olarak saklanabilmektedir (Morrier and Cormier, 2003).

4.1.1. Spermanın Kısa Süreli Saklanması

Bu yöntem, alınan spermanın en fazla birkaç gün (24-48 saat) içerisinde kullanılması durumunda tercih edilir (Shukla, 2011). Spermatolojik muayeneleri gerçekleştirilmiş olan spermanın uygun şekilde sulandırılması yapıldıktan sonra 35°C'deki su dolu bir kap içerisine yerleştirilip, genellikle 2-3 saatlik bir sürede sıcaklığının 5°C'ye düşürülmesiyle kısa süreli saklanabilmesi sağlanabilmektedir. Bu yöntemle saklanan spermaların türlere göre değişmekle birlikte 24 saat (koç, teke, kedi) ile 48 saat (boğa, aygır, köpek) içerisinde kullanılması gereklidir. Boğalarda 48 saatten fazla saklanmış spermalarla yapılan tohumlamalarda döl veriminin geçen her gün için %6 oranında düştüğü tespit edilmiştir. Kısa süreli saklamada bir diğer yöntem ise sulandırılmış spermanın 35°C'deki su dolu bir kap içerisine yerleştirilip 30 dakika içerisinde sıcaklığının 20°C'ye düşürülmesidir. Ancak, bu şekilde saklanan spermaların koçlarda 6 saat, aygırlarda ise 12 saat içerisinde kullanılması gerekir (Sönmez, 2016). Ülkemizde dondurulmuş sperma uygulamasına geçilmeden önce bu şekilde saklanan boğa spermaları ile yoğun bir biçimde ineklerde suni tohumlama uygulamaları yapılmıştır. Yine bu yöntem günümüzde kısırak, koç, teke, köpek, kedi ve kanatlıların suni tohumlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Spermanın kısa süreli saklaması amacıyla Sodyum sitrat-yumurta sarısı sulandırıcısı; boğa, koç, köpek, kedi ve kanatlılarda; Tris-yumurta sarısı sulandırıcısı; koç, teke, domuz ve köpeklerde; Yağsız süt sulandırıcısı ise aygır, koç, keçi ve köpeklerde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sulandırıcıların içeriği türler arasında bazı küçük

farklılıklar gösterebilir (Foote, 1999).

4.1.2. Spermanın Uzun Süreli Saklanması (Kriyoprezervasyon)

Spermanın uzun süreli olarak saklanabilmesi ve bu sayede transferi ile suni tohumlama uygulamalarının yaygınlaşması ve saha koşullarında uygulanabilmesini sağlayan en önemli biyoteknolojik unsur olmuştur. Spermanın uzun süre saklanabilmesi belli tekniklere göre dondurulmasıyla sağlanır. Bu tekniğin dayandığı temel ilke, spermanın çeşitli teknikler uygulanarak sıcaklığının -79°C 'ye ya da -196°C 'ye kadar düşürülmesi ve bu sıcaklığı sağlayacak bir ortamda muhafaza edilmesidir (Bailey et al., 2003). Bu sayede spermanın yıllarca saklanması mümkün olmaktadır. Spermanın dondurularak saklanması amacıyla; kuru buz üzerinde spermanın dondurulması, etil alkol ve kuru buz yardımıyla spermanın dondurulması ve sıvı azot buharında spermanın dondurulması tekniklerinden faydalanılmaktadır (Demirci, 2002; Shukla, 2011).

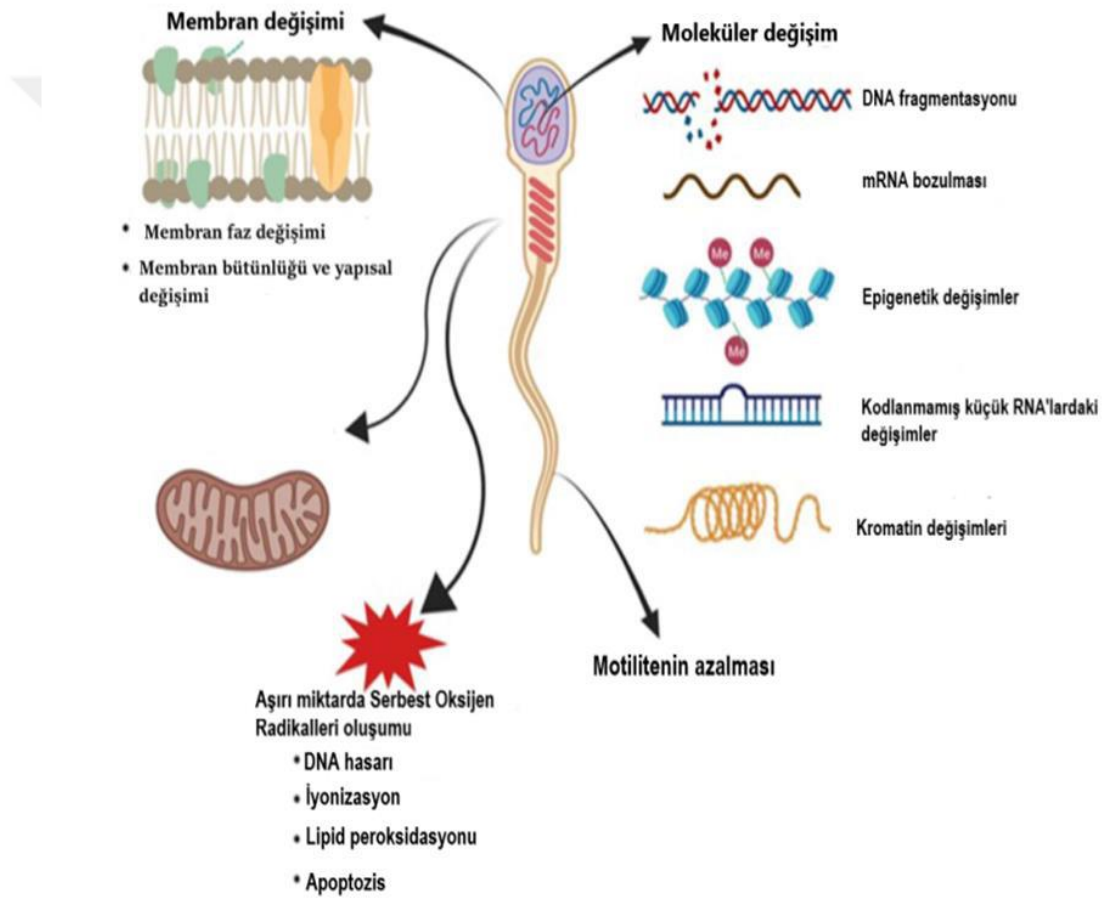
4.1.2.1. Kriyoprezervasyonun Spermatozoon Üzerindeki Etkileri

Memeli sperminin kriyoprezervasyon işlemi, taze sperma ile karşılaştırıldığında daha düşük hareketlilik ve morfolojik bütünlük ile daha yüksek geri dönüşüzlük oranı ile sonuçlandığı bilinmektedir (Abdelhakeam et al., 1991; Gunay et al., 2006; Nur et al., 2010; Wulster-Radcliffe et al., 2004). *Soğutma ve donma hızları* (Fiser and Fairfull, 1984; Maxwell et al., 1995; Pontbriand et al., 1989; Stanic et al., 2000; Woelders et al., 1997), *kriyoprotektif ajanların türü* (De Leeuw et al., 1993; Nur et al., 2010; Woelders et al., 1997) ve *konsantrasyonu* (Fiser and Fairfull, 1984; Woelders et al., 1997; Yıldız vd., 2000), *seyreltme oranları* (Maxwell et al., 1995; Pontbriand et al., 1989; Sanchez-Partida et al., 1992), *spermaya gliserolün eklendiği sıcaklık, dengeleme periyodu ve çözülme hızı*, spermatozoonun çözülme sonrası başarısı (Abdelhakeam et al., 1991; Fiser and Fairfull, 1984; Salamon and Maxwell, 1995) ve fertilizasyon kabiliyeti ile doğrudan etkilidir (Salamon and Maxwell, 1995; Wulster-Radcliffe et al., 2004).

Dondurma-çözdürme sırasında oluşan termal şok, buz kristallerinin oluşumu, dehidrasyon, artan tuz konsantrasyonu, ozmotik şok ve ozmotik stres spermatozoa üzerinde zararlı etkilere sahiptir (Stanic et al., 2000). Hücrelerin dondurularak saklanması başarısı, donma hızından (Hammadeh et al., 1999; Hammadeh et al., 2001) ve hücrelerin dondurulduğu çözeltinin bileşiminden doğrudan etkilenmektedir

(Hammadeh et al., 2001; Nur vd., 2010). Hücreler hızla soğutulduğunda, su dengeyi sağlayacak kadar hızlı kaybolmaz; hücreler giderek aşırı soğur ve hücre içinde donar bu süreç kromatin bütünlüğünü ve spermatozoa morfolojisini etkileyebilir (Hammadeh et al., 2001).

Spermatozoa DNA hasarı, esas olarak reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklanan oksidatif stres faktörleri tarafından spermiyogenezis, spermatogenezis ve dişi genital sisteminde taşınma sırasında veya dondurma için bazı manipülasyonlara maruz kalma (seyreltme, soğutma, dondurma ve çözme) sırasında meydana gelebilir (Duran et al., 2002) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Boğa spermasının dondurulup çözülmesi sonrası spermatozoonda oluşan değişimlerin özeti (Ugur vd., 2019).

Memeli spermatozoonları vücut dışına çıktıktan sonra plazma membranlarının hassasiyetinden dolayı düşük ısılara oldukça duyarlıdır. Donma işlemi, membran değişikliklerini başlatmakta, çözme olayı ise membran protein aktivitesi ve permeabilite değişikliklerine bağlı olarak, su ve iyonların hücre içi ile hücre dışındaki farklılıkları, canlı spermatozoonlarda kayıplara sebep olmaktadır (Bailey et al., 2003).

Membranın kolesterol/fosfolipid oranı (C/P), lipid içeriği, hidrokarbon zincir doygunluğunun derecesi ve protein/fosfolipid oranı spermatozoon hassasiyetini belirleyici özelliklerdendir (Medeiros et al., 2002). Her hayvan türünün farklı bir membran kompozisyonuna sahip olmaları, sıcaklık değişimlerine karşı farklı tepkiler vermelerine sebep olmaktadır. Membranlar doğal olarak akışkandır ve bu durum etkili fonksiyonlarının bir ön koşuludur. Membran yapısındaki fosfolipid ve kolesterolün yoğunlukları, akışkanlığı etkileyen iki ana faktör olup, bunların oranı membran esnekliğini belirlemektedir. Fosfolipidleri fazla olan türlerde esnek membran yapısı daha sık gözlenir. Membranlar soğutulduğunda, lipidler normal akışkan durumlarından sıvı kristal durumuna geçişe maruz kalırlar ve yağ asidi zincirleri bozulur (Medeiros et al., 2002). Dondurma esnasında bu sıvı kristal durumu jel durumuna dönüşür, bu sırada yağ asidi zincirleri katı bir yapı oluşturarak yeniden düzenlenirler (Bucak ve Tekin, 2007). Bu değişiklikler membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol açarak çözüm sonu spermatozoon canlılığını azaltmaktadır. Faz geçiş sıcaklık dereceleri lipid yapısına göre değişkenlik göstermektedir. Genel olarak; daha uzun yağ asit zincirlerinin faz geçiş sıcaklığı daha yüksektir (Parks and Graham, 1992). Spermatozoonun plazma membranındaki ana fosfolipidler; *fosfatidil kolin*, *sflingomiyelin* ve *fosfatidil etanolamin* olarak isimlendirilmekte olup, bu fosfolipidlerin çift katmanlı membran içerisindeki pozisyonları farklıdır. Fosfatidil kolin ve sflingomiyelin dış katman ile ilişkili durumdayken, fosfatidil etanolaminin iç katmana affinitesi vardır. Membranın stres altında olmadığı durumlarda, bu affiniteler belirgin değildir. Soğuk şoku fosfolipidlerin çift katman boyunca dağılımlarını değiştirmelerine sonuçta da membran fonksiyon değişikliğine sebep olmaktadır (Hammerstedt et al., 1990).

4.2. Spermanın Çözdürülmesi

Payetlerin çözdürülme yöntemi, içerisinde bulunan spermatozoonların çözdürülme sonrası motilitelerini direk olarak etkilemektedir. Hatalı olarak yapılacak bir çözdürme işlemi, en iyi laboratuvar imkânları ile hazırlanmış kaliteli payetlerin dahi telef olmasına neden olabilir. Bu nedenle çözdürülme yöntemi özel bir önem arz etmektedir (Bacınoğlu ve Kemal, 2007).

Spermatozoonların gerek dondurulması (-10°C ile -60°C arası) gerekse çözdürülmesi sırasında (20°C ile -20°C arası) bazı kritik sıcaklık dereceleri vardır. Bu aralıkların hem dondurma hem de çözdürme işlemi sırasında mümkün olduğunca hızlı

geçilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, dondurulmuş sperma payetlerinin avuç içinde, gömlek cebinde ve havada çözdürülmesi, işlemin yavaş gerçekleşmesi nedeniyle uygun bulunmamıştır. Diğer taraftan, payetin ineğin vajinasında çözdürülerek dışı genital kanalına verilmesi (soğuk tohumlama), her ne kadar bu çözdürme hızını sağlansa da aşırı soğğun hayvanı irkiltmesi sonucu oluşturduğu stres faktörleri elde edilen gebelik sonuçlarını olumsuz yönde etkilemektedir (Bailey and Cormier, 2003).

Yapılan bilimsel çalışmalar, sıcak su banyosunun en iyi çözdürme yöntemi olduğunu göstermiştir. Su banyosunda değişik sıcaklık derecelerinde ve farklı sürelerde yapılan çözdürme işlemlerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise en iyi çözdürme işleminin yüksek sıcaklıkta ve kısa süreli olması gerektiğini belirlenmiştir. Bu konuda yapılan birçok çalışmada, en iyi çözdürme yönteminin mini (0,25 ml hacimli) payetlerin 75°C'deki su banyosunda 7 saniye tutulması ile sağlanabileceği belirtilmektedir. Ancak saha şartlarında 75°C'lik suyun hazır tutulması, sürekli taşınması ve tam olarak 7 saniyelik süreye tam olarak uyulması zor olup bu durum önemli riskler taşımaktadır. Bu şartların sağlanması için en uygun olan yöntem, 0,25 ml hacmindeki mini payetlerin 38°C'deki sıcak su içerisinde 25 saniye süreyle tutularak, 0,50 ml hacmindeki payetlerin ise 38°C'deki sıcak su içerisinde 30 saniye tutularak çözdürülmesidir (Shukla, 2011; Sönmez, 2016).

5. SPERMANIN

DEĞERLENDİRİLMESİNDE

KULLANILAN YÖNTEMLER

Bütünleşmiş farklı metotların kullanımı aracılığıyla spermatozoanın gelişmiş analizi sayesinde, hücre fonksiyonları ile bağlantılı olan hücre morfolojisini hücresel ve moleküler düzeyde değerlendirilebilmektedir. Geliştirilen ve standardize edilen teknikler, spermatozoanın genetik, fonksiyonel ve epigenetik içerikleri bakımından incelenebilmesine olanak sağlamaktadır. Kriyoprezervasyonun sperma açısından etkilerinin belirlenmesi için spermatozoa motilitesi, canlılığı, membran fonksiyonelliği, mitokondriyal aktivite ve apoptozis parametrelerinin güncel tekniklerle ortaya konulması gerekmektedir (Ugur vd., 2019). Günümüzde bu incelemelerin sağlıklı yapılabilmesi için bazı teknolojik bilgisayarlı sperma analiz cihazları (Computer Assisted Sperm Analyzer, CASA), Hamilton Thorne ve Sperm Fertility Analyzer (SFA) gibi cihazlar geliştirilmiştir. Bu şekilde insan gözü ile yapılan sübjektif değerlendirme sırasında yapacağı hata payını minimuma indirmek ve mümkün olduğunca objektif bir değerlendirme yapmak amaçlanmıştır (Yanagimachi, 1994).

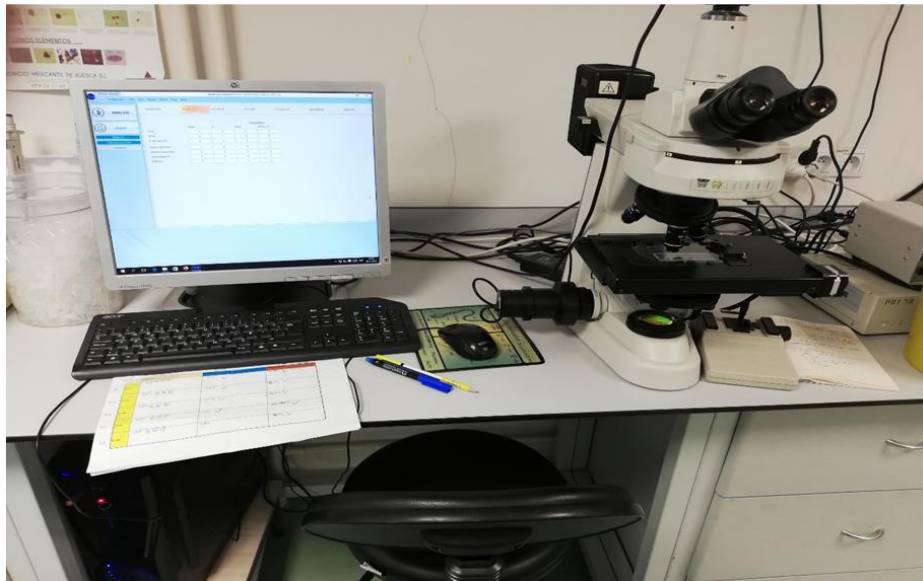
5.1. Mikroskopik (Sübjektif) Değerlendirme

Işık mikroskobu temel kalite parametrelerinden olan motilite, morfoloji, membran bütünlüğü ve konsantrasyon gibi parametrelerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir mikroskoptur. Floresan mikroskobu ise; mikroskopta görülemeyecek kadar küçük olan hücresel komponentlerin görüntülenmesinde kullanılan mikroskoptur. Floresan mikroskop daha çok spermatozoa canlılığını, membran, akrozom ve kromatin yapısını görüntülemek için kullanılmaktadır (Garner et al., 1986). Bu mikroskop metodunda, spermatozoonun hücresel komponentlerinin görüntülenebilmesi için floresan boyalarla boyama yapılarak DNA, membran ya da lektinlerin görüntülenmesi yapılabilmektedir (Rodriguez-Martinez et al., 1997). Spermatozoa viyabilitesi, canlı/ölü ticari kitler, DNA'ya bağlanan floresan boyalar (SYBR-14) ve membran kalıcı boya (PI) kullanılarak floresan mikroskopunda görüntüleme yapılabilmektedir. Akrozom, moleküler markeri olan *Pisum sativum* aglütinin floresan izotiyosiyanat'a (FITC-PSA) bağlanmasıyla spermatozoonun akrozom bütünlüğü hakkında floresan mikroskop ile görüntüleme sonucu fikir sahibi olunabilmektedir. Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak uygulanan

TUNEL yöntemi ile flow sitometri ve floresan mikroskobu kullanılarak apoptozis değerlendirmesi yapılabilmektedir.

5.2. CASA (Bilgisayar Destekli Sperma Analizi) Değerlendirmesi

Hareketliliğin sübjektif olarak değerlendirmesi, insan hatasına ve önyargıya eğilimlidir. Bu nedenle olabildiğince objektif yöntemler geliştirilmiştir. Mikroskopik görüntülere dayalı yöntemler arasında hızlandırılmış *fotomikrografi* (Van Huffel et al., 1985), *çoklu pozlama fotomikrografisi*, *kare kare oynatma videomikrografisi* ve *sinematografi* (Tischner, 1979) bulunurken, *Türbidimetri*, *Spektrofotometri* ve *Lazer Doppler Teknolojisi* fiziksel ilkelere dayanmaktadır (Comhaire et al., 1992). Fotoğrafları analiz etmek sıkıcı olduğundan, bilgisayar destekli teknolojiler otomatik hareketlilik analizinin geliştirilmesinde bir sonraki adımdır. Gerekli ekipmanların yüksek maliyeti nedeniyle, bilgisayarlı sperma görüntü analiz sistemleri öncelikle araştırma uygulamaları için kullanılmaktadır (Şekil 5.1). Mevcut ilk sistemler, CellSoft Otomatik Semen Analizörü ve Hamilton Thorne Motilite Analizörü (HTM) olarak piyasaya sunuldu. Bilgisayarlı sperma hareket analizi için video görüntüleri, bir mikroskop kullanılarak hareketli sperma alanlarının görüntülenmesinden elde edilir. Bir dizi (genellikle 20 ila 30) ardışık video karesi sabit bir hızda, tipik olarak saniyede 30-60 kare analiz edilir. Belirli bir alan için tüm çerçeveler analiz edildiğinde, spermatozoonu başka nesnelerden ayırmak ve spermatozoon izlerini yeniden oluşturmak için bilgisayar algoritmaları kullanılmaktadır (Jasko, 1992).



Şekil 5.1. CASA cihazı

5.3. Flow Sitometrik (Akış Sitometrisi) Analizleri

1970’li yılların sonunda ise ilk kez akış sitometrisi (flow sitometri) ve spermatozoon tanımlarının birlikte anıldığı çalışma (Van Dilla et al., 1977) tarafından yayınlanmıştır. Sperma kalite analizlerine yönelik, floresan temelli, birkaç saniye içinde binlerce hücrenin monitörizasyonunu sağlayan bu yöntem 2000’li yıllarla birlikte ivme kazanarak, spermatozoa canlılık, mitokondriyal membran potansiyeli, lipid peroksidasyon, oksidatif stres, DNA analizi gibi birçok kalite parametre analizinin yanı sıra, cinsiyet seçimini de olanaklı hale getiren bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Akış sitometrisi, akış halindeki bir süspansiyon içindeki çeşitli boyut ve yapıdaki hücre, nükleus, kromozomal yapılar ve çeşitli partikülleri de kapsayan taneciklerin, lazer ve dedektörler yardımıyla nitelik ve nicelik özelliklerinin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Üç bileşenden oluşan akış sitometrisinde; ölçülecek partikülleri lazer önüne taşıyan **akışkanlar sistemi**, ölçüm yapan lazerleri içeren ve partiküllerden dönen sinyalleri toplayan dedektörleri barındıran **optik sistem**, bu optik sinyalleri elektronik sinyallere çeviren ve değerlendirilebilir hale getiren **elektronik sistemler** bulunur (Korkmaz ve Beste, 2020). Çalışma prensibi basitçe; florokrom moleküllerle boyanmış örneklerle ait partiküllerin, hidrodinamik ya da akustik odaklanma ile tek sıralı hale getirilişi, optik sistemden lazer ışın saçılması, partiküllerin ışına maruz bırakılması, dönen ışının toplanması ve toplanan verilerin elektronik sinyallere dönüştürülerek değerlendirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Tüm bu süreç bir saniye içerisinde binlerce partiküle uygulanabilir ve bu partiküllerin sayısı “events-kayıt” olarak tanımlanmaktadır. Tekli ya da çoğul sonuçlar genellikle bir histogram ya da Dot Blot aracılığıyla yapılacak seçim işlemi ile ölçüm yapılan popülasyona göre yüzdesel ya da rakamsal olarak elde edilmekte ve değerlendirilmektedir (Korkmaz ve Beste, 2020).

6. MATERYAL VE METOT

Sunulan yüksek lisans tezi çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Bu tez çalışmasında kullanılan ana materyal dondurulmuş boğa sperması payetleri olduğundan ve herhangi bir canlı hayvan uygulaması bulunmadığından çalışma için Etik Kurul Kararına gerek bulunmamaktadır.

6.1. Simental Boğa Spermalarının Seçimi

Bu çalışmada, farklı Simental boğalardan aynı koşullarda toplanan ve aynı kriyoprezervasyon prosedürüne tabi tutulan 0.25 ml'lik payetlerde dondurulmuş toplam 55 payet Simental boğası sperma numuneleri kullanılmıştır.

6.2. Deney Gruplarının Seçimi ve Planlanması

Bu tez çalışmasında toplam 55 payet Simental boğasına ait dondurulmuş sperma örneği kullanılmıştır. Her bir sperma payeti, çözündürüldükten sonra eppendorf tüpe aktarılmıştır. Eppendorf tüpe aktarılmış olan spermadan 10 µL alınarak motilite ve kinematik parametrelerin değerlendirmesi yapılmıştır. Daha sonra aynı çözündürülmüş spermadan yine 10 µL alınarak plazma membran bütünlüğü testi (HOST) yapılmış ve son olarak da çalışmanın temelini oluşturan spermatozoa akrozomal bütünlüğün tespiti amacıyla 3 farklı boyama yöntemi için aynı çözündürülmüş spermadan ayrı ayrı 10 µL sperma örneği alınarak boyama prosedürleri gerçekleştirilmiştir.

6.3. Spermanın Çözdürülmesi

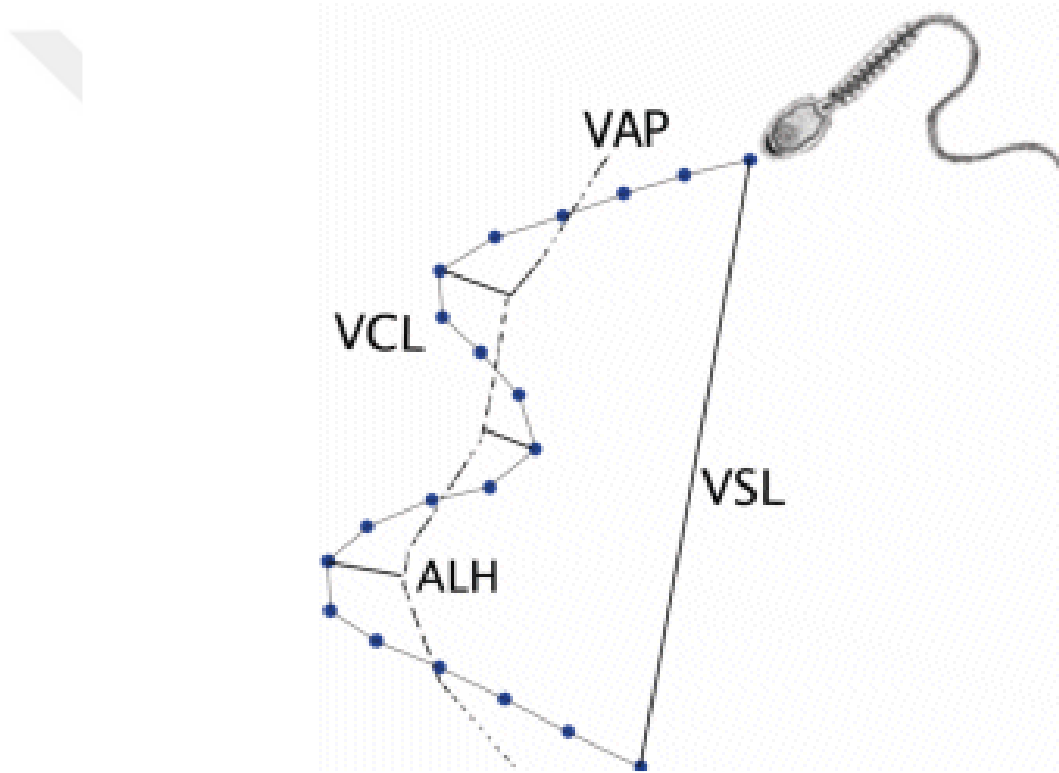
Sıvı azot içerisinde (-196°C'de) saklanan ve dondurulmuş Simental boğa spermaları içeren payetler, aynı laboratuvar koşullarında 37°C'de hazırlanmış su banyosu içinde 30 saniye süre bekletilerek çözündürüldü ve eppendorf tüpüne sperma aktarıldı.

6.4. Spermanın Muayenesi

6.4.1. Spermatozoa Motilitesinin Değerlendirilmesi

Total spermatozoa motilitesi ve progresif motilite değerleri bilgisayar destekli sperma analiz sistemi (CASA) (Sperm Class Analyzer®, Version 6.3.0.59, Microptic, Barcelona, Spain) (Şekil 6.2) kullanılarak belirlenmiştir. Dondurulmuş çözölmüş sperma, 1:2 oranında (7 µL sperma: 14 µL PBS) fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi (PBS) ile seyreltildi. Seyreltilmiş sperma (7 µL) ısıtılmış bir lam üzerine (37°C)

damlatıldı ve bir lamel ile kapatıldı görüntüler, 10x büyütmede yeşil filtreli bir faz-kontrast mikroskobu altında en az beş farklı alanda okutmalar yapılarak değerlendirme yapılmıştır. Bu işlem sonrasında yaklaşık 500 spermatozoon analiz edilmiş olmaktadır. Spermatozoonların kinematik parametrelerinin değerlendirildiği sistemde düz çizgi hızı (**VSL**, $\mu\text{m/sn}$), eğrisel hız (**VCL**, $\mu\text{m/sn}$), ortalama yol hızı (**VAP**, $\mu\text{m/sn}$), doğrusallık (**LIN**, %), düzlük (**STR**, %) dâhil olmak üzere spermatozoonun hareket özellikleri yalpalama katsayısı (**WOB**, %), ortalama yanal kafa yer değiştirmesi (**ALH**, μm) ve vuruş çapraz frekansı (**BCF**, Hz), olarak bilinen spermatozoa kinematik parametreleri CASA yazılımı kullanılarak kaydedildi (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Spermatozoonun Kinetik Hareketi (Tekin, 2012)
($\text{LIN} = \text{VSL} / \text{VCL} \times 100$ (Doğrusallık), $\text{STR} = \text{VSL} / \text{VAP} \times 100$ (Ortalama yolun doğrusallığı), ALH (Başın laterale sapma uzaklığı), VCL (Eğrisel yoldaki hızı), VSL (Doğrusal hız), VAP (Tüm hareketin ortalaması))



Şekil 6.2. CASA sisteminde sperma muayenesi

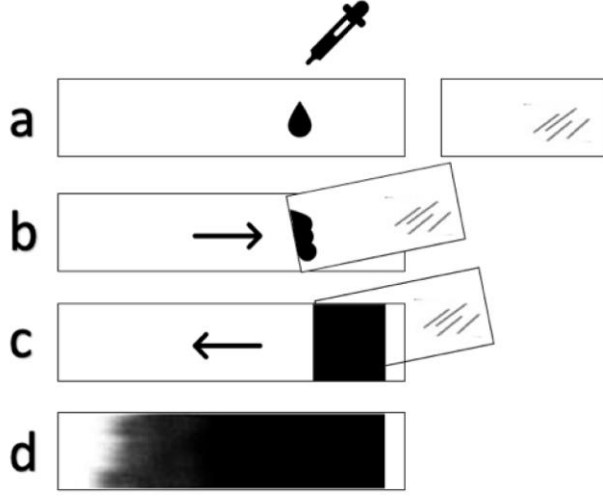
6.4.2. Plazma Membran Bütünlüğünün Değerlendirilmesi (Host Yöntemi)

Spermatozoa plazma membran bütünlüğü, hipo-ozmotik şişme (HOS) testi kullanılarak değerlendirildi. Her sperma örneğinden 10 μ L alınıp, 100 μ L HOS solüsyonu (100 ml'lik bir hacim elde etmek için distile suda çözülmüş 0,9 g fruktoz ve 0,49 g Sodyum sitrattan oluşan bir bileşim çözeltisi, 190 mL Osmol/kg) ile karıştırıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından lam üzerine elde edilen karışımdan 10 μ L damlatılarak froti çekilmiştir. Lam 45 derecelik bir açıda tutulmak suretiyle kurumaya bırakılmış ve ardından 37°C derecedeki ısıtma tablalı mikroskopta, 40x objektifte 100 spermatozoon sayılmak suretiyle spermanın plazma membran bütünlüğünün değerlendirilmesi yapılmıştır. Plazma membranı sağlam spermatozoa kuyruktaki kıvrılma (coiling) veya spermatozoon baş kısmında şişme durumunun varlığına (swelling), membranı hasarlı olan spermatozoonlar ise düz kuyruk ile karakterize görüntü veren spermatozoonlara göre değerlendirilmiş ve oran yüzde (%) olarak ifade edilerek kaydedildi.

6.5. Spermatozoa Akrozomal Bütünlüğünün Tespiti

Spermatozoanın akrozomal bütünlüğünün değerlendirilmesinde aşağıda belirtilmiş olan üç farklı boyama metodu kullanılmıştır. Bunlar: Coomassie Blue boyama (CB), Trypan Blue-Giemsa (TBG) boyama ve Spermac boyama metotları

olarak belirlenmiştir. Tüm boyama metotlarında sperma numunesinden 10 µL lama damlatılarak Şekil 6.3’de gösterildiği gibi preparat hazırlanmaktadır. Daha sonra faz-kontrast mikroskobu altında 40x büyütme ile değerlendirilir. (Şekil 6.4)



Şekil 6.3. Akrozomal boyama için preperat hazırlama



Şekil 6.4. Akrozom bütünlüğünün mikroskop ile değerlendirilmesi

6.5.1. Coomassie Blue Boyama ile Akrozomal Bütünlük Tespiti

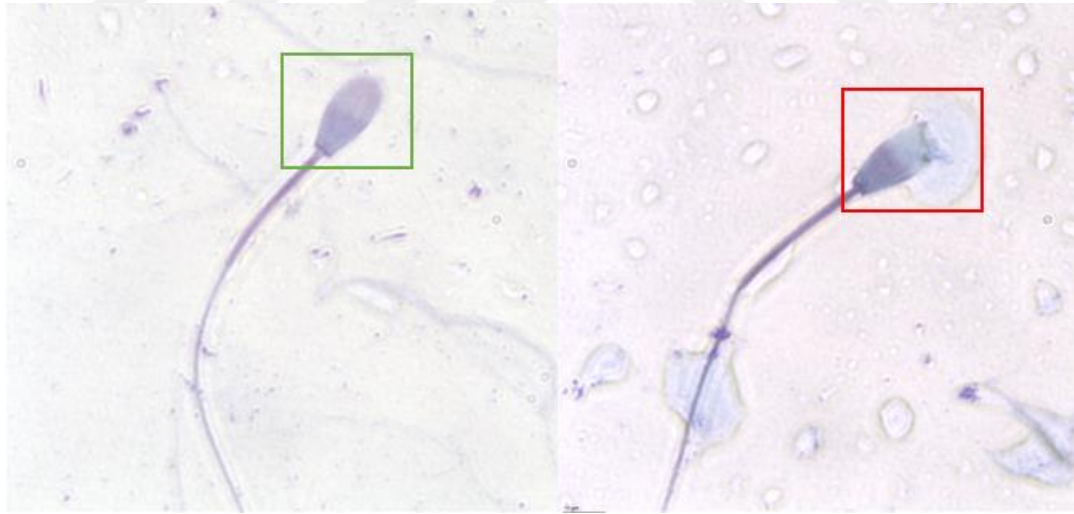
Çözdürülen Simental boğa sperması eppendorf tüpünden 10 µL alınıp lama damlatıldı ve froti çekildi sonra oda sıcaklığında kurutulmuş preparatlar %0,22 Coomassie Blue G-250 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), %50 Metanol (Merck-1.06008.2500) %10 asetik asit ve %40 distile su kompozisyonunda olacak şekilde hazırlanan boya ile 2 dakika süre boyunca boyandı. Sürenin tamamlanmasından sonra preparatlar distile su kullanılarak istenmeyen ve değerlendirmeler için sorun teşkil edebilecek boyanmalardan arındırılmıştır. Preparatlar tekrar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra preparatların değerlendirilmesi faz kontrast mikroskobu altında 40x büyütme ile görüntülemeye farklı mikroskobik alanda 100 adet spermatozoa değerlendirildi (Şekil 6.5). Akrozomu bozulmamış spermatozoa mor-mavi boyandı ve akrozomun arka kısmı ya boyanmadı ya da açık mor boyandı (Şekil 6.5.). Sağlam akrozomların oranı yüzde (%) olarak sunuldu.



Şekil 6.5. Coomassie Blue boyama ile akrozomal bütünlük değerlendirilmesi (Yeşil kare: akrozom sağlam spermatozoon, Kırmızı kare: akrozom hasarlı spermatozoon)

6.5.2. Trypan Blue-Giemsa Boyama ile Akrozomal Bütünlük Tespiti

Çözdürülen Simental boğa sperması 10 µL alınıp eppendorf tüpüne konuldu üzerine 10 µL Trypan blue boyası eklenerek karıştırılarak homojenleştirildi. Daha sonra bu karışımdan lama bir damla damlatıldı ve froti çekilerek preparat dikey pozisyonda oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan preparatlar fiksator solüsyonunun içerisine üç defa daldırılıp çıkartıldı tekrar oda sıcaklığında kurutuldu. Bir sonraki boyama adımında, preparatı %5 Giemsa solüsyonu içeren jar içerisine 3 dakika süreyle daldırılarak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra lam distile ile durulanmıştır ve kurutmaya bırakılmıştır. Değerlendirmeler faz-kontrast mikroskobu immersiyon objektifinde (100x'lik büyütmede) lama immersiyon yağı damlatıldı ve farklı mikroskobik alanlarda her bir preparatta 100'er adet spermatozoa değerlendirilmesi yapılmıştır (Şekil 6.6). Akrozomu bozulmamış spermatozoon “*mor renk*” ile karakterize olurken, akrozomu hasarlı olan spermatozoonlar “*soluk lavanta renk*” ile karakterize olmuştur. Değerlendirmeler bu kriterlere uygun olarak en az 200 spermatozoon sayımı yapılmak suretiyle gerçekleştirilmiş ve sonuçlar % olarak hesaplanmıştır.



Şekil 6.6. Trypane Blue-Giemsa Boyama ile Akrozomal Bütünlüğün değerlendirilmesi (Yeşil kare: akrozom sağlam spermatozoon, Kırmızı kare: akrozom hasarlı spermatozoon)

6.5.3. Spermac Boyama ile Akrozomal Bütünlüğün Tespiti

Çözdürülen Simental boğa sperması 10 µL alınıp lam üzerine damlatılarak froti çekildi ardından oda sıcaklığında kurutuldu. İçerisinde fiksator bulunan jar içerisinde 2 dakika bekletildi ardından kurutuldu. Bu işlemten sonra Spermac boyaları ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan preparatlar A solüsyonu ile 2 dakika

süreyle jar içerisinde bekletildi ve daha sonra kurutuldu ardından distile su içerisinde 5 kez daldırma yöntemi ile fazla boyanın uzaklaştırılması sağlandı ve ardından kurutuldu. B solüsyonu ile 1 dakika süreyle jar içerisinde bekletildi ardından kurutuldu. Kurutulan preparatlardaki fazla boya distile su içerisinde 5 kez daldırma yöntemi ile fazla boyanın uzaklaştırılması sağlandı kurutulmaya bırakıldı. Kurutulan preparatlar C solüsyonu ile 1 dakika süreyle jar içerisinde bekletildi ardından kurutuldu. Kurutulan preparatlardaki fazla boya distile su içerisinde 5 kez daldırma yöntemi ile fazla boyanın uzaklaştırılması sağlandı kurutulmaya bırakıldı. Boyanan smearler 40x büyütme altında incelenmiş ve her bir preparatta 100 spermatozoa sayılmak suretiyle değerlendirilmiştir (Şekil 6.7). Normal sperm, derin yeşil bir akrozoma, orta parçaya ve kuyruğa, belirgin uçuk yeşil ekvator bölgesine ve başın kırmızı post akrozomal bölgesine sahiptir. Akrozom bütünlüğü bozulmuş ya da hasara uğramış spermatozoonlarda ise yeşil boyaya olan affinitenin azalmış olduğu, şişmiş, net olmayan görüntüye sahip akrozom varlığı ile karakterize spermatozoonlar değerlendirilmiştir. Akrozomu olmayan spermatozoonlarda ise spermatozoon başı kırmızı renkle boyanmış görünümde tespit edilmiştir (Şekil 6.7).



Şekil 6.7. Spermac Boyama ile Akrozomal Bütünlüğün değerlendirilmesi
(Yeşil: akrozom sağlam spermatozoon, kırmızı: akrozom hasarlı spermatozoon)

6.6. İstatistiksel Değerlendirme

Tez çalışmasında uygulanacak analizlerin tamamında SAS analiz sisteminden yararlanılmıştır. Bu araştırmada analizleri yapılan tüm parametrelerin Ortalama ve Standart Hata ($\text{Mean} \pm \text{SE}$) gibi tanıtıcı istatistikleri hesaplandı. Akrozomal bütünlüğün tespitinde kullanılan boyama yöntemleri ile diğer parametreler arasındaki korelasyonlar “*Pearson Correlation Coefficients Analizi*” ile değerlendirildi. Yine spermatolojik parametreler ile akrozomal bütünlük arasındaki ilişki ve etkileşim derecelerinin belirlenmesinde ise *Kovaryans Analizi* kullanılmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda, istatistiksel analizde P değerinin $< 0,05$ düzeyde olması önemli kabul edildi.



7. BULGULAR VE TARTIŞMA

Suni tohumlama uygulaması ile elde edilen başarı ölçütlerinde erkek damızlığına ait spermatolojik parametreler büyük önem taşımaktadır. Spermatozoanın ovumu in vivo olarak başarılı bir şekilde dölleyebilmesi için öncelikle bir dizi biyokimyasal ve fizyolojik değişikliğe uğradığı kapasitasyon sürecinin gerçekleşmesi gerekmektedir (Borg et al., 1997; Buckett et al., 1997). Spermatozoon kapasitasyonu, akrozom reaksiyonundan önce spermatozoon membranlarında gerçekleşen birçok fizyolojik değişiklik içerir. Kapasitasyon, dış akrozomal membranın ve plazma membranının füzyonunu içeren ve akrozomal içeriklerin salınmasıyla sonuçlanan akrozom reaksiyonu için ön koşuldur. Fertilizasyonda özellikle kapasitasyon sürecinden sonra gerçekleşen ilk önemli reaksiyon olan akrozom reaksiyonunda, spermatozoon akrozomal yapısının bütünlüğü ve normal morfolojik yapısı çok önemli bir faktördür. Ayrıca spermatozoonun morfolojik anomalilerinin yüksek olması fertilitiyi olumsuz yönde etkilemekte ve günümüzde spermanın rutin muayenesinde bu parametre mutlaka değerlendirilmektedir.

Akrozom, spermatozoonun fertilizasyon işlevini yerine getirmesinde önemli rol oynayan temel bir yapıdır. Akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi sırasında akrozom bünyesindeki enzimleri serbest bıraktığı için kümülüs hücreleri arasındaki bağlanma matrisini eritir. Bu durum özellikle hiyalüronidaz enzimi sayesinde olmaktadır. Çünkü cumulus hücreleri birbirlerine bağlantıları hiyalüronik asit bağlarıyla olmaktadır. Akrozom yapısında meydana gelen malformasyonlar, fertilizasyon oranında azalmaya neden olabilir veya hiç fertilizasyon oluşmayabilir. Özellikle de spermanın dondurma ve çözme prosedürlerine tabi tutulması bazı spermatolojik parametreleri olumsuz etkilediğinden dolayı hasara uğrayan spermatozoa parametrelerinin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Bu konuda yapılmış olan çalışmalar, akrozom bütünlüğü oranı ile geri dönüşümsüz hasarlanma oranı arasında spermatozoon canlılık oranı ve geri dönüşümsüz hasarlanmaya kıyasla daha büyük bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Bu nedenle spermatozoon akrozomal bütünlüğünü kontrol etmek başarılı bir fertilizasyon sağlanması açısından son derece önemlidir.

Ejeküle sıgır spermatozoasının hem akrozomal bütünlüğünü hem de canlılığını değerlendirmek için birçok araştırmacı tarafından farklı zamanlarda çeşitli boyama teknikleri kullanılmıştır (Correa, Heersche, et al., 1997; Correa, Pace, et al., 1997; Hafez, 1993). Hem ejeküle spermalarda ve hem de kauda epididimal spermada

canlılığı ve akrozomal bütünlüğü değerlendirmek için birçok boyama tekniği kullanılmıştır. Spermatozoonların hem akrozomal durumunu hem de canlılığını değerlendirmek gerektiğinden, canlı ve sağlam akrozoma sahip spermatozoonları, ölü ve akrozom bütünlüğünü kaybetmiş olanlardan güvenilir bir şekilde ayırt edebilen boyama yöntemleri kullanmak oldukça önemlidir. Fertilizasyon için olmazsa olmaz spermatolojik parametre olan akrozom bütünlüğünün rutin analizlerde yapılmıyor olmasından dolayı, daha hızlı ve basit akrozomal değerlendirmelerin rutin analizler içerisine yerleştirilebilmesi oldukça önemlidir.

Bu değerlendirmeler ışığında sunulan tez çalışmamız, dondurulup-çözdürülmüş boğa spermalarında kullanılan Trypan blue-Giemsa kombinasyonu, Coomassie blue ve Spermac gibi kolay ve basit uygulanabilir boyama yöntemleriyle elde edilen akrozom bütünlüğü bulgularının karşılaştırılması, yöntemlerin kendi içlerinde ve diğer temel spermatolojik parametrelerle olan korelasyonlarının ortaya konulmasını kapsamaktadır.

7.1. Çözüm Sonrası Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Spermatozoa motilitesi, ileri yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösteren spermatozoonlara oranı olarak ifade edilir (Sönmez, 2016). Spermatozoonlar, epididimisten sonra izledikleri kanal boyunca motil olarak kabul edilirler (Walker et al., 1982). Spermatozoa motilitesi fertilizasyon esnasında çok kritik öneme sahiptir, çünkü oositin katmanları ve zona pellucidanın geçilmesi için spermatozoonların motil olması ve gerekli akrozomal enzimleri taşımak suretiyle bütünlüğü bozulmadan bu bölgeye ulaştırması gerekmektedir. ICSI gibi biyoteknolojik uygulamalar dışında motil olmayan ya da anormal olan spermatozoonlar oositi fertilize etme yeteneğine sahip değildirler. Bu yüzden sperma muayenesinde kullanılan en önemli kalite kriteri motilite tayini olarak kabul edilmektedir (Walker et al., 1982). Birçok türde spermatozoa motilite değerlendirilmesinde, spermatozoon immotil, progresif motil ve non-progresif motil olarak sınıflandırılmaktadır. Progresif motil olarak kabul edilen bir spermatozoon ileri yönde ve özellikle düzgün doğrusal hareket eder, non-progresif motil spermatozoon ise hareket yeteneğine sahiptir, ancak anormal bir yörüngede ve dairesel hareket etmektedir (Malo et al., 2006).

Çalışmamızda, spermatozoa motilitesi ve spermatozoa kinematik parametreleri spermatozoa total motilitesi %, progresif motilite %, VCL $\mu\text{m/s}$, VSL $\mu\text{m/s}$, VAP

$\mu\text{m/s}$, % LIN, % STR, ALH, BCF, % WOB olarak Tablo 7.1. 'de verilmiştir. Çalışma kapsamında çözümü yapılan toplam 55 payet dondurulmuş Simental boğa spermasında ortalama total ve progresif motilite değerleri sırasıyla, ortalama $\%72,93 \pm 1,56$ ve $\%53,07 \pm 1,51$ oranlarında ve dondurulup-çözülmüş spermalar için ideal değerlerde olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonrasında, spermatozoa çözüm sonu progresif motilitesi ve özellikle de total motilitesi ile akrozom bütünlüğü tespiti için kullanılan boyama prosedürlerinin başarısı arasında önemli ve dikkate değer bir ilişkinin bulunduğu tespit edilmiştir. Çünkü bilindiği üzere spermatozoa hareket parametrelerinin kalitesi ne kadar yüksek ise bunun diğer spermatozoonun fonksiyonel kısımlarıyla da bağlantılı olduğu ve hücrenin tüm yapısal kısımlarındaki uyumluluk sonrasında yüksek kalitenin ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu durum her yönüyle spermatozoonların fertilite potansiyeline yansımaktadır. Yapılan “Pearson Korelasyon Katsayısı Analizi” sonuçlarına göre spermatozoa motilitesi ile progresif motilite arasında $\%86$ 'lık çok güçlü bir pozitif ilişki var olup (Tablo 7.2), bu durumun önem derecesi $r=0,860$ (**) ile gösterilebilir. Zaten bu iki temel parametre arasındaki ilişki yapılan birçok değerlendirmede ortaya konulmuş, bilinen ve tüm bilimsel platformlarca kabul edilen bağımlılardır (Hirano et al., 2001; İnanç et al., 2018; King et al., 2000; Malo et al., 2006; Sönmez, 2016).

Spermatozoa yoğunluğu ile akrozomal bütünlük arasında ve bunların yanı sıra diğer spermatolojik parametreler arasında istatistiksel açıdan önemli bir etkileşim tespit edilememiştir ($P>0,05$).

Tablo 7.1. Dondurulup-çözdürülmüş Simental boğalardan elde edilen CASA spermatolojik parametre bulguları

Spermatolojik Parametreler	Mean±SE (n = 55)	P Value	Minimum	Maximum
Motilite	72,93±1,56	0,011	48,34	91,91
Progressive motilite	53,07±1,51	0,462	28,48	79,91
VCL	96,90±2,16	0,028	65,15	130,26
VAP	50,33±1,19	0,886	34,15	70,93
VSL	34,49±1,07	0,806	23,00	53,46
STR	61,75±0,73	0,177	52,44	72,24
LIN	35,37±0,77	0,139	26,02	48,17
WOB	53,28±0,59	0,395	46,54	64,09
ALH	4,39±0,09	0,023	3,05	5,88
BCF	6,54±0,15	0,095	4,90	10,90
Plazma membran bütünlüğü (HOST) (%)	59,10±1,00	0,003	42,00	78,00

Tablo 7.2. Önemli bazı sperm parametreleri ile plazma membran bütünlüğü ve akrozom bütünlüğü arasındaki korelasyonlar

	Mot	Pmot	VCL	VAP	VSL	STR	LIN	WOB	ALH	BCF	Sconc	PMI	CB	TBG	Spermac
Mot	1,000														
Pmot	0,860**	1,000													
VCL	0,164	0,582*	1,000												
VAP	0,071	0,451*	0,848**	1,000											
VSL	0,042	0,332	0,637**	0,914**	1,000										
STR	-0,030	0,056	0,036	0,343*	0,644**	1,000									
LIN	-0,117	-0,129	-0,198	0,237	0,542*	0,912**	1,000								
WOB	-0,179	-0,255	-0,356	0,129	0,379*	0,718**	0,934**	1,000							
ALH	0,227	0,588*	0,894**	0,539**	0,280	-0,176	-0,470*	-0,632*	1,000						
BCF	-0,191	0,046	0,295	0,685**	0,803**	0,637**	0,643**	0,585	-0,095	1,000					
Sconc	-0,096	-0,213	-0,310*	-0,394*	-0,462*	-0,332*	-0,225	-0,100	-0,145	-0,401*	1,000				
PMI	0,516*	0,343	-0,090	-0,195	-0,261	-0,327*	-0,314*	-0,259	0,001	-0,277	0,024	1,000			
CB	0,570*	0,538*	0,295	0,258	0,252	0,009	-0,069	-0,164	0,245	-0,025	-0,133	0,337*	1,000		
TBG	0,620**	0,545*	0,177	0,135	0,096	-0,054	-0,068	-0,093	0,190	-0,117	-0,103	0,339*	0,373*	1,000	
Spermac	0,157	0,171	0,083	0,067	0,023	-0,045	-0,045	-0,047	0,089	-0,054	0,174	0,021	0,242	-0,009	1,000

Mot: motilite; **PMot:** Progressive motilite; **SConc:** Sperma yoğunluğu; **PMI:** Plazma Membran bütünlüğü; **CB:** Coomassie Blue boyama; **TBG:** Trypan blue-Giemsa boyama; **Spermac:** Spermac boyama

*: P<0,05;

** : P<0,01

7.2. CASA Kinematik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Tez çalışmamızdan elde edilen çözüm sonu spermatozoa kinematik parametreleri Tablo 7.2’de verilmiştir. Toplam 55 adet Simental dondurulmuş boğa spermasının çözüm sonu kinematik parametreleri değerlendirildiğinde veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P>0,05$). Özellikle dikkate alınması gereken önemli kinematik parametrelerden VCL, VAP, ALH ve WOB değerlerinin tür bazında ortalama değerlere sahip olduğu ve istenilen aralıklarda olduğu belirlenmiştir.

Spermatozoanın bilgisayar destekli analizi sayesinde ortaya konulabilen bireysel hız parametrelerinden VCL, VSL, BCF ve ALH kinematik parametreleri ile elde edilen gebelik oranı arasında yüksek düzeyde pozitif korelasyonların var olduğu bildirilmiştir. VSL, VAP ve VCL parametreleri spesifik yollara göre spermatozoa hızının ölçümleri olarak tanımlandığından bu değerler yüksek motiliteye sahip spermatozoa olarak sınıflandırılan spermatozoonun daha düşük motiliteye sahip olarak sınıflandırılanlardan daha hızlı yüzdüğünü göstermektedir (Gillan et al., 2005; İnanç et al., 2018; King et al., 2000). Bir başka yaklaşıma göre ise gebelik oranı ya da başarı tahmin edilirken spermatozoon kinematik parametrelerinden ALH değerlerinin geleneksel sperma kalitesi kriterlerinden daha güvenilir olduğu tespit edilmiştir. ALH'nin ayrıca fertilizasyon oranları ile de bir ilişkisinin olduğu bildirilmektedir (Hirano et al., 2001; İnanç vd., 2018). Bizim tez çalışmamızdan elde edilen veriler ışığında yapılan değerlendirmelere göre yukarıda verilen literatür bilgisi ile doğru orantılı olarak spermatozoa kinematik parametrelerinin (VCL, VAP, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF) akrozomal bütünlüğün tespiti amacıyla kullanılan boyama prosedürlerinin etkinliği üzerine etkileri değerlendirildiğinde özellikle VCL ve ALH kinematik parametreleri olmak üzere bunların yanısıra BCF'nin de akrozomal bütünlük ile doğrudan ve önemli oranda pozitif etkileşimde oldukları tespit edilmiştir ($P<0,001$). Diğer parametreler VAP, VSL; STR, LIN ve WOB değerlerinin ise VCL; ALH ve BCF kadar akrozomal bütünlüğün tespitinde etkili olmadıkları belirlenmiştir ($P>0,05$). Sperma kinematik parametrelerinden BCF ile spermatozoa yoğunluğu arasında %40’lık düzeyde negatif bir korelasyonun bulunduğu tespit edilmiştir ($r = -0,401, **$) (Tablo 7.1).

Spermatozoa kinematik parametrelerinden oldukça önemli kabul edilen VSL'nin rolünün ise spermatozoon transportunda, dişi üreme kanalından geçişte ve

oosit penetrasyonu sırasında etkili olduğu düşünülmektedir (Gillan et al., 2005; İnanç vd., 2018). İn vitro fertilizasyon çalışmalarında kullanılan spermaların kinematik parametrelerle olan ilişkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada da in vitro fertilizasyon oranlarının STR parametresi ile önemli derecede bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Donnelly et al., 1998; İnanç vd., 2018). Bu alandaki çalışmalardan yola çıkılarak yapılan genel değerlendirmelere göre VCL, VSL ve VAP sperm kinematik değerlerinin in vivo fertilizasyonun tahmininde; STR, LIN ve WOB kinematik değerlerinin ise in vitro fertilizasyon başarı oranlarıyla pozitif korelasyona sahip olduğu bildirilmektedir (Demirhan et al., 2020). Boğa spermalarında VCL ve ALH değerlerinin yüksek ve LIN değerinin düşük oluşunun hiperaktif durumdaki spermatozoada gözlemlendiği ve ayrıca fertilité parametreleri açısından sığırlarda ortalama VCL değerinin 70,00'den, ALH ortalama değerinin ise 7,00'den yüksek olması gerektiği bildirilmiştir (İnanç vd. 2018). Bizim çalışmamızda çözümü yapılan Simental boğa spermalarında ortalama VCL değeri $96,90 \pm 2,16$ tespit edilmiş olup literatürde verilen değerden oldukça yüksek belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, sperm kinematiklerinden önemli parametrelerden ALH değerinde ise ortalama değer $4,39 \pm 0,09$ ile istenilen değer altında tespit edilmiştir.

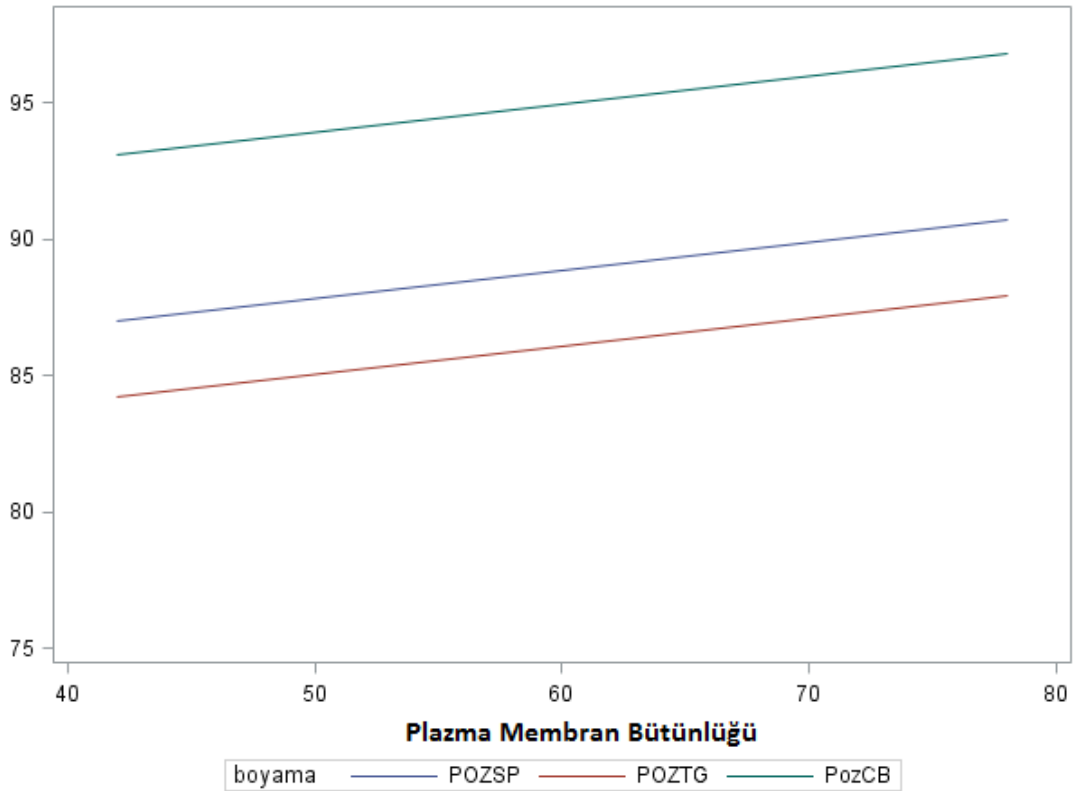
7.3. Plazma Membran Bütünlüğünün HOST ile Değerlendirilmesi

Günümüz koşullarında vital veya floresan gibi değişik boyalar kullanılarak spermatozoanın membran bütünlüğü farklı yöntemlerle belirlenebilmektedir. Fakat HOST uygulamasının basit olması ve plazma membran bütünlüğü hakkında net olarak bilgi vermesi yanında spermatozoon membranından sıvı ve diğer madde alışverişinin fizyolojik olarak normal olup olmadığını hakkında da bilgi verdiğinden dolayı önem arz etmektedir. HOST uygulaması beşeri hekimlikte rutin sperma analizi uygulamalarında spermatozoanın membran potansiyeli ve fonksiyonel bütünlüğü hakkında bilgi edinmek için güvenle kullanılmaktadır (Hafez, 1993). Spermatozoanın fonksiyonel bütünlüğünü ölçmede HOST'un rahatlıkla kullanılabileceğini, ancak hatalı negatif veya pozitif sonuçların önüne geçebilmek için diğer spermatolojik analizlerle bir arada değerlendirilmesi ve doğrulanması gerektiği bildirilmiştir. Kumi-Diaka, (1993) köpek spermasında, Lin et al., (1998) ile Bedford and Hoskins, (1990) ise insan spermasında yaptıkları çalışmada taze spermatozoa motilitesi ile HOST uygulaması sonuçları arasında sıkı bir ilişki olduğunu, bu sıkı ilişkinin spermanın çözdürülmesi sonrasında görülmediğini bildirmişlerdir. Çünkü bilindiği üzere

dondurulup-çözdürme işlemi tüm memelilerde spermatozoonun özellikle de membran yapısında irreversibl değişikliklere sebep olmaktadır. İşte bundan dolayıdır ki özellikle dondurulup-çözdürülmüş spermalarda plazma membran bütünlüğünün mutlaka tespit edilmesi ve ona göre önlemler alınması gerekmektedir. Neild et al., (1999), taze ve çözdürülmüş aygır spermasını fruktoz, sükroz, laktoz ve sodyum sitrat (300, 150, 100, 50 ve 25 mOsm) solüsyonlarda inkübe etmişler, inkübasyon sonunda fruktoz, sukroz ve laktoz içeren medyumların 100, 50 ve 25 mOsm ozmotik basınçlı ortamlarda en yüksek oranda şişme olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar, taze ve dondurulmuş spermada motilite ve normal spermatozoon sayısı ile HOST arasında korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Boğa spermasında in vitro fertilizasyon yeteneği ile HOST arasındaki ilişkiyi inceleyen Rota et al., (2000), çözdürme ve kapasitasyon sonrası spermayı 5 dakika süreyle 100 mOsm fruktoz/sodyum sitrat HOST medyumunda inkübe etmişler ve sonuçlara göre HOS testinin tek başına sperma kalitesi hakkında yeterli bir fikir verebileceğini bildirmişlerdir. HOST ile motilite ve morfoloji arasında da korelasyonun bulunduğu çoğu araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Ahmadi and Ng, 1997; Buckett et al., 1997; Calamera et al., 1998; Christensen et al., 1999; Correa, Heersche, et al., 1997; Correa, Pace, et al., 1997; Lagares et al., 2000; Liu and Foote, 1998; Neild et al., 1999). Yapmış olduğumuz tez çalışmasında yukarıda bahsi geçen literatür verileriyle benzerlik arz eden nitelikte spermanın çözdürülmesi sonrasında elde edilen HOST plazma membran bütünlüğü verileri ile spermatozoa motilitesi arasında yüksek bir korelasyon bulunmuş (Tablo 7.2), ancak diğer bulgular ile bir ilişkisinin olmadığı saptanmıştır. Hipoosmotik Swelling Testin (HOST) ucuz, basit ve kolay uygulanabilir bir test olması, spermatozoon membranının fonksiyon bütünlüğü arasında sıkı bir ilişki bulunduğu, bilinen spermatolojik testler ile uygulanması halinde spermanın fonksiyonel yapısı hakkında önemli fikirler edinilebileceği kanısına varılmıştır (Nur et al., 2003). Bu bağlamda, fertilizasyon sırasında meydana gelen birçok fizyolojik olay sırasında son derece önemli olan plazma membran bütünlüğünü koruyan hücre sayısı ne kadar yüksekse, sperm kalitesi de o kadar yüksek olmaktadır (Nie and Wenzel, 2001). Plazma membran bütünlüğü, hücrelerdeki tüm süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığından, spermatozoa için hayati öneme sahiptir (Rizal et al., 2003). Yapmış olduğumuz çalışmada yapılan tüm çözme işlemlerinde spermatozoadaki plazma membran bütünlüğü yüzdesi %42,00 ile %78,00 arasında ortalama %60,00 civarında ve kabul edilebilir düzeyde olarak kategorize edilebilmiştir ($P<0.05$). HOST ile tespit edilmiş spermatozoanın plazma membran bütünlüğünün ile

spermatozoa akrozomal bütünlüğü arasında çok güçlü ve önemli pozitif ilişki belirlenmiştir ($P<0,001$). Yani bu bağıntıya göre plazma membran bütünlüğü yüksek tespit edilen spermalarda akrozomal bütünlüğün de yüksek oranda korunmuş olduğu ve bu iki parametrenin aralarındaki etkileşimin spermanın fertilite kabiliyetinin belirlenmesinde son derece etkili parametreler olduğunu söylemek mümkündür.

Plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranı ile incelenen sperma parametreleri arasındaki ilişki Tablo 7.3’de sunulmuştur. Üç boyama prosedürü de spermatozoanın plazma membran durumunun tespitinde rahatlıkla kullanılabilir yöntemlerdir (Şekil 7.1). Söz konusu tez çalışmasında, elde edilen verilerin yapılan istatistiksel değerlendirilmesinde plazma membran bütünlüğüne sahip spermatozoa oranı ile total ve progresif motilite değerleri arasında yüksek bir korelasyon olduğu görülmüştür ($r=0,516$ ve $r=0,343$; $P<0.01$) (Tablo 7.2). Buna ilaveten yine plazma membran bütünlüğü ile spermanın kinematik parametrelerinin arasında sadece ALH ($r=0,001$) kinematik parametresi hariç diğer bütün kinematik parametrelerde (VCL, VAP, VSL, STR, LIN, WOB, BCF) negatif korelasyon tespit edilmiştir (r değerleri sırasıyla: $-0,090$; $-0,195$; $-0,261$; $-0,327$; $-0,314$; $-0,259$; $-0,277$).



Şekil 7.1. Plazma membran bütünlüğü ile boyama protokollerinin ilişkisi.

Tablo 7.3. Dondurulup-çözölmüş Simental boğa spermalarında plazma membran bütönlüğü ile farklı boyama prosedürleri tespit edilmiş akrozom bütönlüğü ilişkisi

Spermatolojik Parametreler		Mean±SE (n = 55)	P Value	Minimum	Maximum
Plazma Membran Bütönlüğü (HOST) (%)		59,10±1,00	0,003	42,00	78,00
Akrozom Bütönlüğü (%)	Coomassie Blue Boyama	94,85±0,30 ^a	0,000	87,00	98,00
	Trypan Blue-Giemsa Boyama	85,98±0,42 ^b	-8,872	76,00	93,00
	Spermac Boyama	88,78±0,42 ^c	-6,072	82,00	95,00

a,b,c: Aynı sütun içinde farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir (P < 0,05)

7.4. Farklı Boyama Prosedürlerine Göre Akrozomal Bütönlüğün Değerlendirilmesi

Erkeklerde fertilitenin değerlendirilmesi sürecinde veya sperma saklama yöntemlerinin değerlendirilmesinde diğer önemli parametreler sperm canlılığının ve akrozomal bütönlüğün analizidir (Thomas et al., 1997). Bununla birlikte, başarılı bir fertilizasyon ve zigot oluşumu büyük ölçüde, boğa dâhil memeli spermatozoalarında başarılı bir kapasitasyon sürecine ve müteakiben şekillenecek sorunsuz ve zamanında gerçekleşen bir akrozomal reaksiyona bağlıdır. Bu nedenle, tohumlama için kullanılan sperma, sağlam akrozomal yapı ve membrana sahip spermatozoa içermelidir (Jankovičová et al., 2008). Başarılı bir fertilizasyon için uygun zamanda çözölme sonrası motilite ve akrozom reaksiyonunun gerçekleşebilmesi gerektiğinden spermatozoanın akrozomal bütönlüğü olmazsa olmazdır (Singh et al., 2017; Thomas et al., 1997). Akrozom, zona pellucida (ZP) yoluyla sperm penetrasyonunda önemli rol oynayan enzimler içeren spermatozoa çekirdeğii üzerinde bulunan zara bağlı yapıdır (Yanagimachi, 1994). Ayrıca spermin ZP'ye bağlanması, akrozom reaksiyonunu tetikleyerek, bir sonraki aşama olan vezikülasyon için dış akrozom zarının plazma zarı ile füzyonuna yol açar. Bu nedenle, bozulmamış akrozom, fertilizasyon için ön koşuldur (Rodriguez-Martinez et al., 1997). Dokulardaki yapısal farklılıkları bir

boyama reaktifi ile farklı şekilde boyayan histokimyasal boyama ve akrozom reaksiyonu ile açığa çıkan proteinlere iyi bağlanan bir boyama olmak üzere memeli spermatozoonlarında akrozomları boyamak için iki ana yöntem vardır (Bolwell et al., 1980; Celeghini et al., 2010; Chelucci et al., 2015; O'connell et al., 2002). Doğrudan boyama, nispeten basit bir şekilde gerçekleştirilebildiği ve genel bir mikroskopla kolayca gözlemlenebildiği için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca doku boyalı slaytlar fikze edilebilir ve mikroskop altında ışığa maruz kalmaktan zarar görmez, bu nedenle diğer araştırmacıların incelemenden sonra tekrar inceleyebilecekleri bir avantaj sunar (Celeghini et al., 2010; Chelucci et al., 2015; O'connell et al., 2002). Bununla birlikte, immünofloresan analiz tekniği pahalı bir floresan mikroskobu gerektirdiğinden ve bir floresan maddenin özelliklerini harici bir ışık kaynağı ile okuma özelliğine sahip olduğundan, floresan boyamadan hemen sonra sperma lamını incelemek ve veri elde etmek gereklidir. Yani bu teknolojiye, preparatı boyamadan hemen sonra değerlendirmek faydalı olup, başka bir zamanda isteğe bağlı değerlendirme yapılmak istenildiğinde aynı floresan reaksiyonunu ve ışımayı görebilmek pek mümkün olmayacaktır. Dolayısıyla, sonraki değerlendirmeler objektif olmayabilir.

Akrozomal bütünlüğün tespitinde kullanılan boyama yöntemleri kendi aralarında başarı yönünden karşılaştırıldığında Coomassie blue yönteminin diğerlerine oranla daha başarılı olduğunu söylemek mümkündür (Şekil 7.2). Her ne kadar kullanılan tüm yöntemlerle akrozomal bütünlüğü tespit etmek mümkün oldu ise de yöntemleri uygulama kolaylığı, maliyet ekonomisi ve etkinlik açısından bir sıralama yapmak gerektiğinde Coomassie blue yönteminden sonra Spermac boyama prosedürü ve son olarak da Trypan blue-Giemsa yönteminin etkili olduğu bulunmuştur. Aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Ancak her üç boyama prosedürü de spermatozoanın akrozomal bütünlük durumunun tespitinde rahatlıkla kullanılabilir yöntemlerdir.

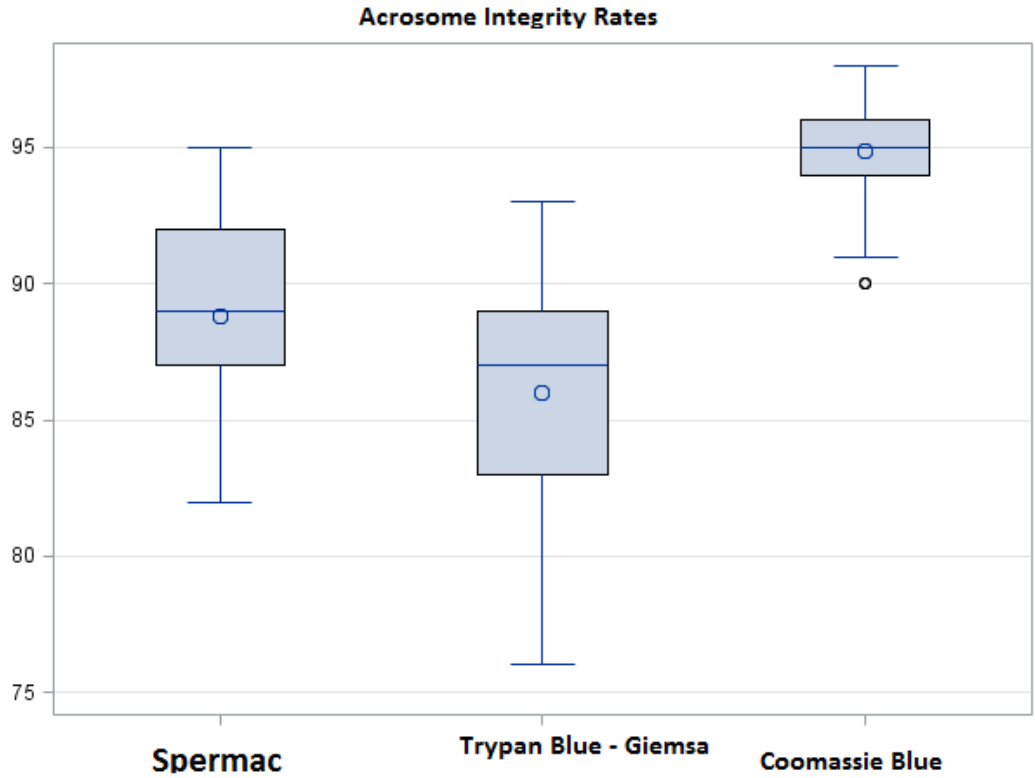
Coomassie blue boyası (CBB) 1960'lardan beri moleküler biyoloji araştırmalarında protein boyaması için kullanılmaktadır (de Oliveira et al., 2011). Sığır, at, tavşan, laboratuvar hayvanları ve insanlar dahil olmak üzere birçok türde spermatozoon akrozom bütünlüğü tespitinde faydalanan ucuz ve kolay bir boyama prosedürü olarak kabul edilmektedir (Chelucci et al., 2015; Cross and Hanks, 1991). CBB boyasının G-250 tipi ve R-250 tipi olmak üzere iki farklı tipi bulunmakta olup,

G tipi iki metil grubuna daha sahiptir. Bu özellikten dolayı, suda çözünürlük açısından bir farklılık olmasına rağmen (Fannessia et al., 2015; Flesch et al., 2000), her iki CBB reaktifi için akrozom boyama yöntemi hakkında karşılaştırmalı veriler bulmak zordur.

Spermatozoon fertilitasını tesbit için geliştirilmiş birçok test olmasına rağmen, bunların en güvenilir olanı akrozomal bütünlüğün morfolojik değerlendirmesi olarak bildirilmiştir (Spalding et al., 1975). Bu bağlamda CBB'nin teknik gerektirmeyen, basit, kullanılabilir metod olması avantajdır. Comassie Blue, Gümüş Nitrat, Naphthol Yellow S- Eritrosin B, Tripan Blue- Giemsa, May- Grunwald Giemsa, Eozin- Comassie Blue ile yapılan boyamalar sonucunda bazı boyama yöntemlerinde morfolojik olarak çok güzel boyandığı, spermatozoonu oluşturan baş, orta kısım, kuyruk, akrozom bölümlerinin çok kolay olarak ayırt edilebildiği; bazı boyama yöntemlerinde ise bu başarının sağlanamadığı görülmüştür. Comassie Blue boyaması ile daha önce fare ve hamsterlarda (Moller et al., 1990), farklı tür memelilerde (Larson and Miller, 1999) yaptığı çalışmalardaki sonuçlarla benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda akrozomları sağlam olan spermatozoanın apikal kısımlarının koyu renkle boyandığı, akrozomları sağlam olmayan spermatozoanın ise çok az boyandığı veya hiç boya almadığı görülmüştür. Ayrıca, cauda-epididimal yöntemle elde edilen spermalarla Coomassie Blue boyamasının spermatozoanın akrozom durumlarını ve morfolojik olarak spermaların kalitesini belirlemek için hızlı ve güvenilir bir metot olduğunu ortaya çıkarmıştır. Brum et al., (2006)'nın belirttiği gibi, spermatozoanın akrozom durumlarını belirlemek için bunun gibi birçok yöntem olmasına rağmen; bu boyama tekniğinin pahalı laboratuvar şartlarını gerektirmemesi ve froti hazırlandıktan sonra yaklaşık 5-10 dakika gibi çok kısa bir zaman sonra boyama işleminin tamamlanması, pratik ve iyi sonuç veren bir yöntem olması nedeni ile birçok kişi tarafından tercih edilmesini sağlamıştır. Eğer ki, dondurulmuş spermalarındaki sulandırıcılarda bulunan hayvansal proteinlerin yoğun konsantrasyonlarda kullanılması söz konusu ise Coomassie Blue boyamasının iyi sonuç veremeyebileceği de bir handikap olarak bildirilmektedir (Rungruangsak et al., 2021).

Çalışmamızdaki verilerin istatistiksel değerlendirmesi sonrasında akrozomal bütünlüğün tespiti amacıyla kullanılan ve en başarılı prosedür olarak belirlenen Coomassie blue boyama yöntemi ile spermatozoa kinematik parametrelerinden VCL arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir ($P<0,05$). Aynı ilişki diğer boyama

yöntemleri ile VCL arasında tespit edilememiştir ($r=0,295$; $P>0,05$). Bilindiği gibi VSL, VAP ve VCL parametreleri spesifik yollara göre spermatozoa hızının ölçümleri olarak tanımlandığından bu değerler yüksek motiliteye sahip spermatozoa olarak sınıflandırılan spermatozoonun daha düşük motiliteye sahip olarak sınıflandırılanlardan daha hızlı yüzdüğünü göstermektedir (Gillan et al., 2005; İnanç et al., 2018; King et al., 2000). Dolayısıyla, Coomassie blue boyama sonuçları ile VCL kinematik parametresi arasında tespit edilen pozitif korelasyona bağlı olarak tekrarlayan CASA ölçümleri ile elde edilen VCL değerlerinin akrozomal bütünlük bağıntısı sayesinde sadece VCL değeri üzerinden de akrozomal bütünlük açısından bir değerlendirme yapabilmek mümkün olabilir. Çalışmamızda elde edilen diğer verilere göre motilite ve progresif motilite ile yine Coomassie blue ve Trypan blue-Giemsa boyamaları arasında da çok yüksek düzeyde olmasa da pozitif korelasyon bulunduğu belirlenmiştir ($r=0,373$; $P<0,05$). Aynı ilişki Spermac boyama prosedürü ile hareket parametreleri arasında bulunamamıştır ($P>0,05$) (Tablo 7.2).



Şekil 7.2. Akrozomal bütünlüğün belirlenmesinde kullanılan boyama metotlarının başarı durumu

Silva et al. (2003), sığır spermatozoa membran ve akrozom bütünlüğünü değerlendirmek için çift Trypan Blue-Giemsa (TBG) boyaması kullanmış ve in vitro oosit bölünmesi ile orta düzeyde pozitif bir korelasyon gözlemlemiştir. TBG boyamasının, termorezistens testi ve dişi köpeklerin doğal kızgınlıkta tohumlanmasından sonra doğurganlık oranları ile ilişkilendirildiğinde, köpek spermatozoon akrozom bütünlüğünü değerlendirmede etkili olduğu gösterilmiştir (Santos et al., 2007). Ayrıca, canlı sığır spermatozoa hücrelerinin değerlendirilmesi için TBG ve FITC-PNA/PI teknikleri arasında yüksek bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (Zúccari et al., 2008). Yukarıda bahsedilen gerçeklere dayanarak, HOST ve TBG'yi birleştiren bir tekniğin, sperm morfolojik anormalliklerini tespit etmek ve aynı anda plazma ve akrozomal membran bütünlüğünü değerlendirmek için uygun olacağını savunuyoruz. Bizim çalışmamızda floresan problemlerle organize edilen ve daha yüksek imkân ve altyapıya sahip olmayı gerektiren ve daha fazla masrafa ihtiyaç duyulan bir test yerine onunla korele olabilen ve daha uygun koşullarda ve birçok laboratuvarında bulunan altyapı varlığıyla kolayca uygulanabilecek boyama tekniğinin yaygınlaştırılmasını sağlamaktır.

Çalışmamızda yer alan akrozomal bütünlük tespitinde kullanılan Spermac boyama prosedürü ise boğa spermalarının yanı sıra koç, teke, köpek, aygır, yaban domuzu, çita ve insandan alınan taze ve dondurulmuş spermanın akrozomun boyanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Chan et al., 1996; Hay et al., 1997; Oetjen, 1988). Spermac metakromatik özellikli bir boyadır, esas olarak çeşitli derecelerde akrozomal hasarları görünür kılmak için kullanılır ve ayrıca akrozomal reaksiyon sırasında meydana gelen değişikliklerin bir kısmının da görülebilirliğinin ortaya konulması açısından tercih edilen bir boyama yöntemidir (Schäfer and Holzmann, 2000). Bu tez çalışması sonuçlarının yapılan değerlendirmelerine göre, Spermac boyama tekniği hızlı, güvenilir ve uygulanabilirlik açısından pratik olma avantajlarına sahip olup, aynı zamanda diğer birçok türde olduğu gibi boğa spermasında da akrozomal morfolojinin incelenmesinde başarıyla kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında, bu tekniğin çözündürme sonrası spermada önde gelen kusur tiplerinden biri olan akrozomal bütünlük kusurlarının belirlenmesinde faydalı olabileceğini vurguluyoruz.

Erkek damızlık fertilesini tahmin etmenin daha yeni bir yöntemi, spermatozoanın akrozom reaksiyonuna girebilme yeteneğini tespit etmektir. İn vitro

akrozom reaksiyonunu indüklemek için kalsiyum iyonofor veya glikozaminoglikanların kullanımı, doğurganlığı değerlendirmede potansiyel olarak değerli bir yöntemdir (Ax et al., 1985; Ax and Lenz, 1987; Carver-Ward et al., 1996; Cummins et al., 1991). Sığırlarda, atlarda ve insanlarda, in vitro akrozom reaksiyonlarının indüksiyonu ile doğurganlık arasında bir korelasyon gösterilmiştir (Ax et al., 1985; Ax and Lenz, 1987; Blue et al., 1989; Carver-Ward et al., 1996; Christensen et al., 1996; Cummins et al., 1991; Graham and Foote, 1987; Whitfield and Parkinson, 1992). Yüksek verimli hayvanlardan alınan spermalar, dölverimi düşük olan hayvanlardan alınan spermalara oranla daha sık indüklenen akrozom reaksiyonuna girme eğilimindedir. Bu tahlillerde, akrozomal durum çeşitli teknikler kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu tekniklerin bazıları bir antikorun mevcudiyetine dayanır ve tamamlanması önemli miktarda zaman gerektirebilir ve bazıları yalnızca belirli türleri değerlendirmek için kullanılabilir. Bu çalışmada yer verilen Coomassie blue boyama prosedürü, akrozomal durumu belirlemeye yönelik diğer yöntemlerden daha basit ve daha hızlıdır. Bu prosedür, birçok memeli türünde spermdeki akrozomal durumu aydınlatmak için bir araştırma veya klinik ortamda faydalı olabilir. Bu çalışmanın sonuçları, Coomassie Blue G-250 boyama prosedürü kullanılarak akrozomal durumun hızlı ve doğru bir şekilde belirlenebileceğini, ancak çalışmamızda yer alan Trypan blue-Giemsa (TBG) ve Spermac boyamalarının da dondurulup-çözdürülmüş Simental boğa spermalarında akrozomal bütünlük tespitinde rahatlıkla kullanılabileceğini göstermiştir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Spermanın dondurularak saklanması her ne kadar spermaya geri dönüşümsüz hasar veren bir teknoloji olsa da sperma dondurma tekniği, sığırcılık ve diğer birçok damızlık hayvan endüstrisi için değerli bir araçtır. Bilindiği üzere dondurma ve çözündürme işlemi, en başta spermatozoon plazma membranı permeabilitesi ve mitokondriyonların hasarına neden olmaktadır. Spermatozoonların sulandırma, soğutma, ekilibrasyon, dondurma ve çözündürmeye maruz bırakıldığı işlemler sonucunda çok önemli bir komponent olan akrozomda önemli hasarlar meydana gelmektedir. Bu sebeplerden dolayı saha kullanımına sunulmadan önce dondurulmuş spermaların temel parametre analizlerinin yanı sıra akrozomal bütünlük açısından da değerlendirilmesinde büyük fayda söz konusu olduğunu düşünüyoruz. Spermaların akrozomal bütünlük açısından da rutin analizlere tabi tutulmasının mümkün olduğu kadar basit olarak uygulanabilen, ucuz ve etkili boyama prosedürleri ile değerlendirilmesinin hayvancılık sektörüne önemli katkılar sağlayacağını düşünüyoruz.

Tez çalışma sonuçlarımız Trypan Blue-Giemsa, Spermac ve Coomassie Blue boyama prosedürlerinin, Simental boğa spermalarında akrozom bütünlüğün değerlendirmesinde basit, ucuz ve güvenilir yöntemler olarak tercih edilebileceğini göstermiştir. Bu yöntemler ile tek frotide spermanın hem morfolojik muayene hem de ölü-canlı muayenesi yapılarak hızlı bir şekilde spermatozoonun değerlendirilmesi sağlanabilmektedir. Bu üç boyama yöntemi kendi aralarında karşılaştırıldığında, temel spermatolojik parametreler ile en yüksek düzeyde pozitif korelasyon gösteren Coomassie Blue boyama yöntemi en başarılı olarak belirlenmiştir. Coomassie blue boyama prosedürü, fertilizasyon çalışmaları ve erkek damızlıklarda fertilitite potansiyeli değerlendirmesinin bir parçası olarak faydalı katkılar sunabilecek bir prosedür olarak tercih edilebilir. Ancak, spermatozoon biyolojisi üzerine temel araştırmaların yapılması söz konusu ise bu basit boyamalar yerine daha etkili ve kompleks değerlendirmelere imkan sağlayan ve oldukça hassas olan flöresan boyalar ve probalar (SYBR-14, Propidium iodide (PI), FITC-PNA, FITC-PSA, Yo-Pro-1, 7-AAD, rhodamine 123, carboxyfluorescein diacetate) ya da bunların PI ile kombinasyonlarının tercih edilmesi daha yerinde olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdelhakeam, A., Graham, E., Vazquez, I., & Chaloner, K. (1991). Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: development of an extender for freezing: effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology*, 28(1), 43-49.
- Ahmadi, A., & Ng, S.-C. (1997). The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 68(2), 346-350.
- Akyol, N. (2005). In vivo and In vitro Fertilization in Cattle)(A Review). *Lalahan Hayvancilik Arastirma Enstitusu Dergisi*, 45(2), 53.
- Almadaly, E., Farrag, F., Shukry, M., & Murase, T. (2014). Plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed bull spermatozoa supplemented with desalted and lyophilized seminal plasma. *Global Vet*, 13, 753-766.
- Alomar, M., Mahieu, J., Verhaeghe, B., Defoin, L., & Donnay, I. (2006). Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(3), 395-402.
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17. e13.
- Amin, A.-H., Bailey, J. L., Storey, B. T., Blasco, L., & Heyner, S. (1996). A comparison of three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 11(4), 741-745.
- Ax, R., Dickson, K., & Lenz, R. (1985). Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to nonreturn rates of dairy bulls. *Journal of Dairy Science*, 68(2), 387-390.
- Ax, R., & Lenz, R. (1987). Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *Journal of Dairy Science*, 70(7), 1477-1486.
- Bacinoğlu, S., & Kemal, A. (2007). The effects of thawing time, post-thawed thermal applications and resistance test on semen characteristics in bulls. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(2), 13-22.
- Bailey, J., Morrier, A., & Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*, 83(3), 393-401.
- Bedford, J., & Hoskins, D. (1990). The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. *Marshall's Physiology of Reproduction*, 2, 379-568.
- Beletti, M. E., Da Fontoura Costa, L., & Guardieiro, M. M. (2017). Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Journal of Morphological Sciences*, 22(2), 0-0.
- Blue, B., Mckinnon, A., Squires, E., Seidel Jr, G., & Muscari, K. (1989). Capacitation of stallion spermatozoa and fertilisation of equine oocytes in vitro. *Equine Veterinary Journal*, 21(S8), 111-116.
- 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.

- Bolwell, G., Callow, J., & Evans, L. (1980). Fertilization in brown algae. III. Preliminary characterization of putative gamete receptors from eggs and sperm of *Fucus serratus*. *Journal of Cell Science*, 43(1), 209-224.
- 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.
- Brum, A. M., Thomas, A. D., Sabeur, K., & Ball, B. A. (2006). Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, 67(2), 358-362.
- Bryan, J. H., & Akruk, S. R. (1977). A naphthol yellow S and erythrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *Stain Technology*, 52(1), 47-51.
- Bucak, M. N., & Tekin, N. (2007). Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54(1), 67-72.
- Buckett, W. M., Luckas, M. J., Aird, I. A., Farquharson, R. G., Kingsland, C. R., & Lewis-Jones, D. I. (1997). The hypo-osmotic swelling test in recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*, 68(3), 506-509.
- Burant, C., & Davidson, N. (1994). GLUT3 glucose transporter isoform in rat testis: localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 267(6), R1488-R1495.
- Calamera, J., Doncel, G., Olmedo, S. B., Kolm, P., & Acosta, A. (1998). Modified sperm stress test: a simple assay that predicts sperm-related abnormal in-vitro fertilization. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(9), 2484-2488.
- Canbolat, Ü. N. (2019). Boğa sperm akrozomal enzimleri üzerinde sitokimyasal çalışmalar. *Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2019, KONYA*.
- Carver-Ward, J., Jaroudi, K., Hollanders, J., & Einspinner, M. (1996). Andrology: High fertilization prediction by flow cytometric analysis of the CD46 antigen on the inner acrosomal membrane of spermatozoa. *Human Reproduction*, 11(9), 1923-1928.
- Celeghini, E., Nascimento, J., Raphael, C., Andrade, A., & Arruda, R. (2010). Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62, 536-543.
- Chan, P., Corselli, J., Jacobson, J., Patton, W., & King, A. (1996). Correlation between intact sperm acrosome assessed using the Spermac stain and sperm fertilizing capacity. *Archives of Andrology*, 36(1), 25-27.
- Check, J. H., Epstein, R., Nowroozi, K., Shanis, B. S., Wu, C. H., & Bollendorf, A. (1989). The hypoosmotic swelling test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. *Fertility and Sterility*, 52(1), 159-161.
- Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G. G., Manca, M. E., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2015). Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*, 83(6), 1064-1074.
- Cheng, F. P., Fazeli, A., Voorhout, W. F., Marks, A., Bevers, M. M., & Colenbrander, B. (1996). Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*, 17(6), 674-682.
- Chenoweth, P. J. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64(3), 457-468.

- Chinnaiya, G., & Ganguli, N. (1980). Acrosomal damage of buffalo spermatozoa during freezing in extenders. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 27(4), 339-342.
- Christensen, P., Brockhoffarticle No., P., & Lehn-Jensen, H. (1999). The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(6), 503-507.
- Christensen, P., Whitfield, C., & Parkinson, T. (1996). In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. *Theriogenology*, 45(6), 1201-1210.
- Comhaire, F. H., Huysse, S., Hinting, A., Vermeulen, L., & Schoonjans, F. (1992). OPINION: Objective semen analysis: has the target been reached? *Human Reproduction*, 7(2), 237-241.
- Correa, J., Heersche, G., & Zavos, P. (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.
- Correa, J., Pace, M., & Zavos, P. (1997). Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, 48(5), 721-731.
- Cross, N. L., & Hanks, S. E. (1991). Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Human Reproduction*, 6(9), 1279-1283.
- Cummins, J. M., Pember, S. M., Jequier, A. M., Yovich, J. L., & Hartmann, P. E. (1991). A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge: relationship to fertility and other seminal parameters. *Journal of Andrology*, 12(2), 98-103.
- De Leeuw, F., De Leeuw, A., Den Daas, J., Colenbrander, B., & Verkleij, A. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32-44.
- De Lourdes Pereira, M., Oliveira, H., Fonseca, H. M., E Costa, F. G., & Santos, C. (2016). The Role of Cytometry for Male Fertility Assessment in Toxicology. In *Flow Cytometry-Select Topics*. IntechOpen.
- De Oliveira, V. P., Marques, M. G., Simões, R., Assumpção, M. E. O. D. Á., & Visintin, J. A. (2011). Influence of Caffeine and Chondroitin Sulfate on Swine Sperm Capacitation and In Vitro Embryo Production. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(2), 1-6.
- Demirci, E. (2002). Evcil hayvanlarda reproduksiyon, suni tohumlama ve androloji ders notları. *Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Notları* (53).
- Demirhan, A., Tekin, K., Daşkin, A., & Uysal, O. (2020). Assessment of morphological features of bull semen thawed at various temperatures and periods of time with CASA. *Kocatepe Veterinary Journal*, 13(3), 286-293.
- Diemer, T., & Desjardins, C. (1999). Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Human Reproduction Update*, 5(2), 120-140.
- Donnelly, E. T., Lewis, S. E., McNally, J. A., & Thompson, W. (1998). In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility*, 70(2), 305-314.
- Duran, E., Morshedi, M., Taylor, S., & Oehninger, S. (2002). Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction*, 17(12), 3122-3128.
- Erdemir, F., Fırat, F., & Gençten, Y. (2011). Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Türk Urol Sem*, 2(15), 11-17.

- Fannessia, L., Karja, N., Adnyane, I., & Setiadi, M. (2015). Detection of acrosomal damage of ram spermatozoa during freezing process using lectin histochemical technique. *Journal Veteriner*, 16(4), 560-568.
- Fiser, P., & Fairfull, R. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, 21(5), 542-551.
- Flesch, F., Colenbrander, B., Van Golde, L., & Gadella, B. (2000). Capacitation induced molecular alterations in the plasma membrane of boar spermatozoa in relation to zona pellucida affinity. *Boar Semen Preservation*, 4, 21-31.
- Foote, R. H. (1989). Preservation and fertility prediction of spermatozoa. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Belfield Campus, University College Dublin (Ireland), 26-30 Jun 1988.
- Foote, R. H. (1999). Artificial insemination from the origins up to today. In Proceedings of the International Symposium. From the first artificial insemination to the modern reproduction biotechnologies: traditional ways and the new frontiers of animal production. *Reggio Emilia (Italy)* (pp. 23-68).
- Foulkes, J., & Watson, P. (1975). Hyaluronidase activity in seminal plasma as a method of assessing bull sperm integrity. *Reproduction*, 43(2), 349-353.
- Fraser, L. R., Abeydeera, L., & Niwa, K. (1995). Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 40(2), 233-241.
- Fukushima, T., Kato, M., Adachi, T., Hamada, Y., Horimoto, M., Komiyama, M., Mori, C., & Horii, I. (2005). Effects of sulfasalazine on sperm acrosome reaction and gene expression in the male reproductive organs of rats. *Toxicological Sciences*, 85(1), 675-682.
- Gago, C., Perez-Sanchez, F., Yeung, C., Tablado, L., Cooper, T., & Soler, C. (1998). Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. *International Journal of Andrology*, 21(3), 169-176.
- García-Herreros, M., Aparicio, I., Barón, F., García-Marín, L., & Gil, M. (2006). Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 29(5), 553-563.
- Garner, D., & Hafez, E. (2000). Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in Farm Animals*, 96-109.
- Garner, D. L., Pinkel, D., Johnson, L. A., & Pace, M. M. (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, 34(1), 127-138.
- Ghonimi, W., Balah, A., Bareedy, M. H., Sharaf, A., & Abuel-Atta, A. A. (2014). Seminal Glands of Buffalo Bulls (*Bos bubalis* L.) During Prepubertal and Pubertal Periods: Histological and Histochemical. *Veterinary Science & Technology*, 5(4), 1.
- Gil, M. C., García-Herreros, M., Barón, F. J., Aparicio, I. M., Santos, A. J., & García-Marín, L. J. (2009). Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, 71(2), 254-263.
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457.
- Graham, E.F. (1978). Fundamentals of the preservation of spermatozoa. *National Academy of Sciences*.

- Graham, J., & Foote, R. (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24(1), 42-52.
- Gravance, C., Champion, Z., & Casey, P. (1998). Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, 49(6), 1219-1230.
- Gunay, U., Dogan, I., Nur, Z., Manolov, I., Sagirkaya, H., Soylu, M. K., Kaptan, C., & Akpinar, L. (2006). Influence of bull seminal plasma on post-thaw ram semen parameters and fertility. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*, 50(4), 503.
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J., & Bollwein, H. (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562-571.
- Hafez, E. (1993). Semen evaluation. *Reproduction in Farm Animals*, 5, 405-423.
- Hammadeh, M., Askari, A., Georg, T., Rosenbaum, P., & Schmidt, W. (1999). Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology*, 22(3), 155-162.
- Hammadeh, M., Dehn, C., Hippach, M., Zeginiadou, T., Stieber, M., Georg, T., Rosenbaum, P., & Schmidt, W. (2001). Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. *International Journal of Andrology*, 24(2), 66-72.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11(1), 73-88.
- Harrison, R., Ashworth, P., & Miller, N. (1996). Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 45(3), 378-391.
- Haugland, R. (1996). Assays for cell viability, proliferation and function. *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 365-398.
- Hay, M., King, W., Gartley, C., Leibo, S., & Goodrowe, K. (1997). Canine spermatozoa—cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, 48(8), 1329-1342.
- Henkel, R., Schreiber, G., Sturmhoefel, A., Hipler, U.-C., Zermann, D. H., & Menkveld, R. (2008). Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 89(2), 449-455.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., & Dorado, J. (2006). Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology*, 66(4), 996-1003.
- Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., Tsunoda, H., & 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(4), 215-220.
- Holden, C. A., & Trounson, A. O. (1991). Staining of the inner acrosomal membrane of human spermatozoa with concanavalin A lectin as an indicator of potential egg penetration ability. *Fertility and Sterility*, 56(5), 967-974.
- Hong, C., Huang, J., Wu, P., Lo, S., & Wei, Y. (1988). Fluorescence Supravital Stain of Human Sperm: Correlation with Sperm Motility Measured by a Transmembrane

- Migration Method/Supravital-Fluoreszenz-Färbung von menschlichen Spermatozoen: Korrelation zur Spermatozoenmotilität (Messung mittels Transmembran-Migration-Methode). *Andrologia*, 20(6), 516-520.
- Hossain, M., Afrose, S., Sawada, T., Hamano, K.-I., & Tsujii, H. (2010). Metabolism of exogenous fatty acids, fatty acid-mediated cholesterol efflux, PKA and PKC pathways in boar sperm acrosome reaction. *Reproductive Medicine and Biology*, 9(1), 23-31.
- İleri, İ. K., Ak, K., Pabuççuoğlu, S., & Birler, S. (2000). Reprodüksiyon ve sun'i Tohumlama. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Yayını. Ders Notu No: 23*.
- İnanç, M. E., Cil, B., Tekin, K., Alemdar, H., & Daşkin, A. (2018). The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 42(5), 452-458.
- Insani, K., Sri, R., Agung, P., & Aries, S. (2014). Kadar MDA spermatozoa setelah pembekuan. *Jurnal Biotropika*, 3(2).
- Jankovičová, J., Simon, M., Antalíková, J., & Horovská, L. (2008). Acrosomal and viability status of bovine spermatozoa evaluated by two staining methods. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56(1), 133-138.
- Jasko, D. J. (1992). Evaluation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8(1), 129-148.
- Jeyendran, R., Van Der Ven, H., & Zaneveld, L. (1992). The hypoosmotic swelling test: an update. *Archives of Andrology*, 29(2), 105-116.
- Kadirvel, G., Periasamy, S., & Kumar, S. (2012). Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(1), 143-150.
- Kakar, S., & Anand, S. (1984). Acrosomal damage and enzyme leakage during freeze preservation of buffalo spermatozoa. *Indian Journal of Experimental Biology*, 22(1), 5-10.
- King, L. M., Holsberger, D. R., & Donoghue, A. M. (2000). Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in turkeys. *Journal of Andrology*, 21(1), 65-71.
- Korkmaz, F., & Beste, Ç. (2020). Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15(1), 76-83.
- Kovacs, A., & Foote, R. (1992). Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnic and Histochemistry*, 67(3), 119-124.
- Kumar, D., Kumar, P., Singh, P., Yadav, S., & Yadav, P. (2016). Assessment of sperm damages during different stages of cryopreservation in water buffalo by fluorescent probes. *Cytotechnology*, 68(3), 451-458.
- Kumi-Diaka, J. (1993). Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 39(6), 1279-1289.
- Kusakabe, H., & Kamiguchi, Y. (2004). Chromosomal integrity of freeze-dried mouse spermatozoa after ¹³⁷Cs γ -ray irradiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 556(1-2), 163-168.
- Kwon, I.-K., Park, K.-E., & Niwa, K. (2004). Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71(5), 1430-1436.
- Lagares, M., Petzoldt, R., Sieme, H., & Klug, E. (2000). Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia*, 32(3), 163-167.

- Larson, J. L., & Miller, D. J. (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular Reproduction and Development*, 52(4), 445-449.
- Lenz, R., Ball, G., Lohse, J., First, N., & Ax, R. (1983). Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, 28(3), 683-690.
- Lin, M.-H., Morshedi, M., Srisombut, C., Nassar, A., & Oehninger, S. (1998). Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. *Fertility and Sterility*, 70(6), 1148-1155.
- Liu, Z., & Foote, R. (1998). Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *Journal of Dairy Science*, 81(7), 1868-1873.
- Łukaszewicz, E., Jerysz, A., Partyka, A., & Siudzińska, A. (2008). Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Research in Veterinary Science*, 85(3), 583-588.
- Malo, A. F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A. J., & Roldan, E. R. (2006). Sperm design and sperm function. *Biology Letters*, 2(2), 246-249.
- Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., Lee, W.-N. P., Boros, L. G., Fernández-Novell, J. M., Centelles, J. J., Medrano, A., Rodríguez-Gil, J. E., & Cascante, M. (2003). Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Letters*, 554(3), 342-346.
- Maxwell, W., Landers, A., & Evans, G. (1995). Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*, 43(7), 1201-1210.
- Mclaughlin, E., Ford, W., & Hull, M. (1992). Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Reproduction*, 95(2), 527-534.
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
- Meschede, D., Keck, C., Zander, M., Cooper, T., 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.
- Moller, C. C., Bleil, J. D., Kinloch, R. A., & Wassarman, P. M. (1990). Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Developmental Biology*, 137(2), 276-286.
- Morado, S. A., Pereyra, V., Breininger, E., Sara, R., & Cetica, P. D. (2015). Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility. *Austin Publishing Group; Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*; 2; 1; 2-2015; 1005-1008.
- Mukai, C., & Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*, 71(2), 540-547.
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., & Gadella, B. M. (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction*, 68(5), 1828-1835.
- Neild, D., Chaves, G., Flores, M., Mora, N., Beconi, M., & Agüero, A. (1999). Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51(4), 721-727.

- Nie, G., & Wenzel, J. (2001). Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, 55(4), 1005-1018.
- Nofa, Y., Karja, N. W. K., & Arifiantini, R. I. (2017). Status akrosom dan kualitas post-thawed spermatozoa pada beberapa rumpun sapi dari dua balai inseminasi buatan. *Acta Veterinaria Indonesiana*, 5(2), 81-88.
- Nur, Z., Dogan, I., Soylu, M., & Ak, K. (2003). Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 154(7), 487-490.
- Nur, Z., & Soylu, M. (2003). Donmuş boğa spermasında plazma membran sağlamlığının morfolojik bulgularla karşılaştırılması. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*, 1-2.
- Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H., & Ozguden, C. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73(9), 1267-1275.
- O'connell, M., McClure, N., & Lewis, S. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704-709.
- Oetjen, M. (1988). *Überprüfung verschiedener Akrosomfärbungen zur Qualitätsbeurteilung von Nativ-und Tiefgefriersperma des Pferdes* [Tierärztliche Hochschule].
- Oettlé, E. (1986). Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science*, 12(2), 145-150.
- Oettle, E., & Soley, J. (1986). Severe sperm abnormalities with subsequent recovery following on scrotal oedema and posthitis in a Bulldog. *Journal of Small Animal Practice*, 27(7), 477-484.
- Ohashi, K., Saji, F., Wakimoto, A., Tsutsui, T., Nakazawa, T., Okabe, M., Mimura, T., & Tanizawa, O. (1994). Selection of Acrosome-Reacted Sperm with MH61-Immunobeads. *Journal of Andrology*, 15(1), 78-82.
- Parks, J. E., & Graham, J. K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209-222.
- Petrunkina, A., & Harrison, R. (2011). Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations. *Cytometry Part A*, 79(5), 338-348.
- Pintado, B., De La Fuente, J., & Roldan, E. (2000). Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1), 145-152.
- Pontbriand, D., Howard, J., Schiewe, M., Stuart, L., & Wildt, D. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26(4), 341-354.
- Prihantoko, K., Yulastuti, F., Haniarti, H., Kusumawati, A., Widayati, D., & Budiyanto, A. (2020). The Acrosome Integrity Examination of Post-thawed Spermatozoa of Several Ongole Grade Bull in Indonesia Using Giemsa Staining Method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*.
- Rajamahendran, R., Ambrose, J., & Lee, C. (1994). Anti-human sperm monoclonal antibody HS-11: a potential marker to detect bovine sperm capacitation and acrosome reaction in vitro. *Reproduction*, 101(3), 539-545.
- Rath, D., Bathgate, R., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J., Strzezek, J., Waberski, D., Rodriguez-Martinez, H., Vallet, J., & Ziecik, A. (2009). Recent advances in boar semen cryopreservation. *Control of Pig Reproduction VIII*, 66, 51-66.

- Rizal, M., Toelihere, M., Yusuf, T., Purwantara, B., & Situmorang, P. (2003). Kualitas semen beku domba garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner, JITV*, 7(3), 194-199.
- Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B., Zhang, B. R., & Soderquist, L. (1997). In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *The Journal of Reproduction and Development*, 43(1), 1-11.
- Rodríguez-Martínez, H. (2006). Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 2-10.
- Rota, A., Penzo, N., Vincenti, L., & Mantovani, R. (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 53(7), 1415-1420.
- Rungruangsak, J., Suwimonteerabutr, J., Buranaamnuy, K., Chankrachang, A., & Tummaruk, P. (2021). A comparative study of two methods to determine acrosome integrity of frozen-thawed boar sperm: FITC-PNA/EthD-1 versus Coomassie blue staining. *Veterinarska Stanica*, 52(6), 629-638.
- Shahani, S. K., Revell, S. G., Argo, C. G., & Murray, R. D. (2010). Mid-piece length of spermatozoa in different cattle breeds and its relationship to fertility. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 13(16), 802-808.
- Saacke, R. (1982). Components of semen quality. *Journal of Animal Science*, 55(suppl_II), 1-13.
- Salamon, S., & Maxwell, W. (1995). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38(1-2), 1-36.
- Salisbury, G. W., Vandemark, N. L., & Lodge, J. R. (1978). *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. WH Freeman and Company.
- Samardzija, M., Karadjole, M., Getz, I., Makek, Z., Cergolj, M., & Dobranic, T. (2006). Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(1), 1-7.
- Sanchez-Partida, L., Maxwell, W., Paleg, L., & Setchell, B. (1992). Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 4(1), 113-118.
- Santos, I. W., Binsfeld, L., Weiss, R., Kozicki, L., Rochadelli, R., Resende, M., & Hossepián De Lima, V. (2007). Cryopreservation of dog spermatozoa: effect of bovine serum albumin on acrosomal integrity and pregnancy rates after artificial insemination. *Archives of Veterinary Science*, 47-54.
- Schäfer, S., & Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59(3-4), 201-211.
- Schürmann, A., Axer, H., Scheepers, A., Doege, H., & Joost, H.-G. (2002). The glucose transport facilitator Glut8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell and Tissue Research*, 307(2), 237-242.
- Silva, A. E. D. F., Dias, A. L., Unanian, M. M., Freitas, A. R. D., & Bloch Junior, C. (2003). Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32, 1890-1900.
- Singh, A., Sharma, M., Prasad, S., Bhat, Y., Kumar, A., Pandey, D., & Shukla, S. (2017). Effect of Butylated Hydroxytoluene on Acrosome Integrity and Viability of Crossbred Bull Spermatozoa. *International Journal of Livestock Research*, 7(7), 82-91.
- Shukla, M. K. (2011). *Applied veterinary andrology and frozen semen technology*. New India Publishing Agency.

- Sönmez, M. (2016). *Reproduksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları*. ELAZIĞ.
- Spalding, R., Everett, R., & Foote, R. (1975). Fertility in New York artificially inseminated Holstein herds in dairy herd improvement. *Journal of Dairy Science*, 58(5), 718-723.
- Stanic, P., Tandara, M., Sonicki, Z., Simunic, V., Radakovic, B., & Suchanek, E. (2000). Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 91(1), 65-70.
- Sutovsky, P. (2015). New approaches to boar semen evaluation, processing and improvement. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 11-19.
- Tekin, N. (2012). Ankara tekesi spermasının dondurulmasında tris sulandırıcı bileşenleri yerine katılan bor'un (Sodyum pentaborat) çözüm sonu sperma kalitesi üzerine etkisi.
- Thomas, C. A., Garner, D. L., Mel Dejarnette, J., & Marshall, C. E. (1997). Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 56(4), 991-998.
- Tischner, M. (1979). Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* (27), 53-59.
- Töpfer-Petersen, E., Čechová, D., Henschen, A., Steinberger, M., Friess, A., & Zucker, A. (1990). Cell biology of acrosomal proteins: Zellbiologie akrosomaler Proteine. *Andrologia*, 22(S1), 110-121.
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 268.
- Van Der Horst, G., Kitchin, R., Van Der Horst, M., & Atherton, R. (2009). The effect of the breeding season, cryopreservation and physiological extender on selected sperm and semen parameters of four ferret species: implications for captive breeding in the endangered black-footed ferret. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(2), 351-363.
- Van Dilla, M., Gledhill, B., Lake, S., Dean, P., Gray, J., Kachel, V., Barlogie, B., & Göhde, W. (1977). Measurement of mammalian sperm deoxyribonucleic acid by flow cytometry. Problems and approaches. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 25(7), 763-773.
- Van Huffel, X., Varner, D., Hinrichs, K., Garcia, M., Strzemienski, P., & Kenney, R. (1985). Photomicrographic evaluation of stallion spermatozoal motility characteristics. *American Journal of Veterinary Research*, 46(6), 1272-1275.
- Vasan, S. (2011). Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India*, 27(1), 41.
- Walker, J. S., Winet, H., & Freund, M. (1982). A comparison of subjective and objective sperm motility evaluation. *Journal of Andrology*, 3(3), 184-192.
- Whitfield, C., & Parkinson, T. (1992). Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology*, 38(1), 11-20.
- 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.
- World Health Organisation (WHO), (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. *Cambridge university press*.
- Wulster-Radcliffe, M. C., Wang, S., & Lewis, G. S. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument

and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*, 62(6), 990-1002.

Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371-372.

Yıldız, C., Ataman, M., Kaya, A., Tepeli, C., & Lehimcioğlu, N. (2000). Köpek ve koçlarda akrozom bozukluklarının belirlenmesi amacıyla farklı tespit ve boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11(2), 7-11.

Zúccari, C., Carrijo, P. R., Leite, P., Scaldeal, P., Rodovalho, N., Zanenga, C., Kiefer, C., & Silva, E. (2008). Seleção em gradiente de Percoll sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. *Rev Bras Saúde Prod An*, 9, 358-366.



ÖZ GEÇMİŞ

Emre KARA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 30.05.2019 tarihinde mezun oldu. 2019 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi (12.12.2022).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000 - 0002 - 8389 - 4331

Yayınlar:

1. KARA E, ÇEVİK M.: Evaluation of Acrosome Integrity of Frozen-Thawed Simmental Bull Semen with Different Staining Methods. *Second International Congress on Biological and Health Sciences*, Pages: 47-58, Online 24-27 February 2022, Oral Presentation (Tam Metin Bildiri basıldı): Published: 15/03/2022. ISBN: 978-605-71368-0-0. [Uluslararası].