



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HOLSTEİN BOĞALARDA İN VİTRO SPERMATOLOJİK PARAMETRELERİN ERKEK FERTİLİTESİ İLE İLİŞKİSİ

Veteriner Hekim Halil DÖNMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER DÖLERME ve SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Muhammed Enes İNANÇ

BURDUR-2023

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HOLSTEİN BOĞALARDA İN VİTRO SPERMATOLOJİK
PARAMETRELERİN ERKEK FERTİLİTESİ İLE İLİŞKİSİ**

Halil Dönmez

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Muhammed Enes İNANÇ

Bu araştırma *Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri*
Koordinatörlüğü tarafından 0779-Y-21 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2023

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca yardımlarını her zaman hissettiğim danışman hocam Doç. Dr. Muhammed Enes İNANÇ'a, lisans eğitimimden itibaren bilgilerini her zaman bizlere özveri ile aktaran Prof. Dr. Ayhan ATA'ya, tez çalışmamın istatistiksel analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Şükrü GÜNGÖR'e, spermatolojik analizlerin yapılmasında ve analizlerinde önemli katkılar sunan Dr. Öğr. Üyesi Fırat KORKMAZ'a, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Öğr. Gör. Hasan Ali ÇAY, Öğr. Gör. Durmuş KAHRAMAN, Vet. Hek. Mine HERDOĞAN, Vet. Hek. Feyza Nur MART'a, hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu dönemde de bana her zaman destek olan aileme, eşime ve biricik oğlum Hüseyin'e şükranlarımı sunarım.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Spermatozoa Motilitesi	2
2.1.1. Subjektif Yöntem	2
2.1.2. Objektif Yöntem	3
2.3. Hipo-Osmotik Şişme (HOS) Test	7
2.4. Ölü Spermatozoa Tespiti	8
2.5. Akrozom Hasarının Değerlendirilmesi	10
2.6. Mitokondriyal Aktivasyonun Değerlendirilmesi	12
2.7. Kapasitasyon Seviyesinin Değerlendirilmesi	14
2.8. Apoptozis seviyesinin Değerlendirilmesi	14
2.9. Spermada Konsantrasyon ve Yoğunluk Tayini	14
2.10. Oksidatif Stres'in Flow Sitometrik Olarak Değerlendirilmesi	15
2.11. Spermatozoada Lipid Peroksidasyon Analizi	16
2.12. Spermatozoada DNA Hasarlarının İncelenmesi	17
2.13. Florasan Boyamalar ve Flow Sitometrik Sonuçların Fertilite ile İlişkileri	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Hayvan Materyali	21
3.2. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	23
3.2.1. Çözüm Sonu Spermatozoa Motilitesi	23
3.2.2. Flow sitometri Analizleri	23
3.2.2.1. Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	24
3.2.2.2. Lipit peroksidasyon Seviyesinin Belirlenmesi	25
3.2.2.3. Mitokondriyal Oksidatif Stresin Belirlenmesi (MITOSOX/PI)	26
3.2.2.4. Ölü-Canlı Oranının Belirlenmesi	27
3.3. İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Spermada subjektif sperma muayenesi	3
Şekil 2.2.	Bilgisayar destekli sperm analiz sistemi (BDSA); Computer Asisted Sperm Analyzer (CASA)	4
Şekil 2.3.	BDSA ile motilite muayenesi	5
Şekil 2.4.	BDSA kinetik parametreler	5
Şekil 2.5.	Hos Test mikroskopik görüntü	8
Şekil 2.6.	Spermatozoonda Eozin boyaması	9
Şekil 2.7.	Spermatozoonda ölü canlı oranının floresan mikroskopta değerlendirilmesi	9
Şekil 2.8.	Spermatozoon ölü-canlı muayenesinin flow sitometrik olarak değerlendirilmesi	10
Şekil 2.9.	Akrozom hasarının floresan mikroskopta değerlendirilmesi	11
Şekil 2.10.	Spermatozoon plazma membran/akrozom hasarının flow sitometrik olarak değerlendirilmesi	11
Şekil 2.11.	Spermatozoon mitokondrial aktivasyonun floresan mikroskopta değerlendirilmesi	13
Şekil 2.12.	Spermatozoon mitokondrial aktivasyonun flow sitometride değerlendirilmesi	13
Şekil 2.13.	Spermatozoonda mitokondrial oksidatif stresin flow sitometride değerlendirilmesi	16
Şekil 2.14.	Spermada lipit peroksidasyon seviyesinin flow sitometride belirlenmesi	17
Şekil 2.15.	Spermada COMET analiz yöntemi ile DNA hasarının belirlenmesi	18
Şekil 3.1.	Flow sitometride hedef popülasyonun seçilmesi	24
Şekil 3.2.	PMAI'nın flow sitometrik analizi	25
Şekil 3.3.	Lipit peroksidasyon seviyesinin flow sitometrik olarak analizi	26
Şekil 3.4.	Mitokondrial oksidatif stresin flow sitometrik olarak incelenmesi	26
Şekil 3.5.	Ölü canlı seviyesinin belirlenmesinde flow sitometrik analiz	27

TABLÖLAR

Tablo 4.1.	Suni Tohumlama yapılan boğalara ait ortalama spermatolojik parametreler	29
Tablo 4.2.	Spermatolojik parametreler ve gebelik arasında korelasyon sonuçları	30
Tablo 4.3.	Suni Tohumlama yapılan boğa spermalarında bireysel gebelik&spermatolojik parametreler arasındaki korelasyonlar	30
Tablo 4.4	Suni tohumlamada kullanılan boğa spermalarının gebelik sonuçları	30



SİMGELER ve KISALTMALAR

AO	Acridine Orange
ATP	Adenozin trifosfat
ALH	Amplitude of Lateral Head Displacement
BCF	Beat Cross Frequency
BDSA	Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sistemleri
BrdU	Bromodeoksiüridin
C°	Santigrad
CTC	Chlortetracycline
CASA	Computer Asisted Sperm Analyzer
DAF2-DA	5-diaminofluorescein-2/diacetate
DNA	Deoksiribonükleik asit
DCF	Dichlorodihydrofluorescein
DCFH-DA	Dichlorodihydrofluorescein diasetate
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Na₂HPO₄	Di-Sodium Hydrogen Phosphate Dihydrate
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik
FITC-PNA	Flurescein Isothiocyanate Conjugated Peanut Agglutinin
FS	Forward Scatter
FSC-A	Forward Scatter Area
FSC-H	Forward Scatter Hight
HCl	Hidroklorik Asit
HOS Test	Hipo-Osmotik Şişme Testi
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimi-dazolylycarbocyanine iodide
LIN	Linearity
LPO	Lipid Peroksidasyonun
MITO	MitoTracker
NRR	Non Return Rate
NERR	Non-Estrus Return Rate
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PMAI	Plasma Membrane and Acrosome Integrity
PI	Propidium Iodide
ROS	Reaktive Oxygen Species
R123	Rhodamine 123
SS	Side Scatter
SSC-A	Side Scatter Area
NaCl	Sodium chloride
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
STR	Straightness
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
VAP	Velocity Average Path
VCL	Velocity Curve Linear
VSL	Velocity Straight Line
WOB	Wobble

ÖZET

Holstein Boğalarda İn Vitro Spermatolojik Parametrelerin Erkek Fertilitesi ile İlişkisi

Bu çalışmanın amacı, sahada rutin olarak suni tohumlama uygulamalarında kullanılan dondurulmuş çözdürülmüş boğa spermalarının laboratuvar şartlarında analiz edilerek fertilite yetenekleri ile spermatolojik parametrelerin ilişkilerinin belirlenmesidir. Çalışmada 5 farklı ithal holstein ırkı boğalardan üretilmiş her bir boğanın 5 farklı toplama tarihini içeren dondurulmuş-çözdürülmüş ejakulatları (payetleri) kullanıldı. Boğa spermaları ile Burdur/ Yeşilova Merkez ve köylerinde her bir boğa için 35 olacak şekilde toplamda 175 baş inekte suni tohumlama uygulandı. Suni tohumlamada kullanılan boğa spermaları motilite, plazma membran bütünlüğü (PMAI), canlılık, lipid peroksidasyon seviyesi ve mitokondrial oksidatif stres açısından incelendi. Tohumlama sonrası 60. gündeki gebelik oranı ultrason ile tespit edilerek hayvanların gebelik durumları tespit edildi. İn vitro spermatolojik parametreler ile gebelik sonuçları arasında anlamlı korelasyonlar tespit edilemedi ($p>0,05$). Ancak tek bir boğanın çözüm sonu motile sonuçları ile gebelik sonuçları arasında pozitif korelasyon tespit edildi ($p<0,05$). Boğalar arasında motilite, canlılık ve lipid peroksidasyon seviyesi açısından istatistiki bir fark tespit edilemezken ($p>0,05$); PMAI ve mitokondrial oksidatif stres parametreleri açısından istatistiki farklılıklar tespit edildi ($p<0,05$). Gebelik oranları açısından boğaların spermaları arasında istatistiki bir farklılık tespit edilemedi ($p>0,05$). Spermatolojik parametreler kendi arasında değerlendirildiğinde motilite ile PMAI ve canlılık arasında pozitif; PMAI ile canlılık ve lipid peroksidasyon seviyesi arasında pozitif; mitokondrial oksidatif stres ile negatif; mitokondrial oksidatif stres ile canlılık ve lipid peroksidasyon seviyesi arasında negatif; canlılık ve lipid peroksidasyon seviyesi arasında pozitif korelasyon tespit edildi ($p<0,05$). Sonuç olarak, hücreyi oluşturan organel ve yapıların birbirleri ile sıkı ilişkili şekilde metabolik aktivitelerini devam ettirdikleri görülmektedir. Ayrıca, tekli spermatolojik parametrelerin ilişkilendirilmesi yanında, çoklu regresyon analizleri için birden fazla kombinasyonun oluşturularak fertilite tahminine ve ilişkilendirilmesine gidilmesi gerektiği, yüksek ve düşük fertiliteye sahip boğalarda da ilişkilendirmeler ve korelasyonların yapılarak, boğalar arasında oluşan bu ilişki ve farklılıkların nasıl ve hangi yollarla ile oluştuğuna dair çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Boğa, Fertilite, Flow sitometre, Spermatolojik parametreler, Suni tohumlama

ABSTRACT

Relationship Between Invitro Spermatological Parameters and Male Fertility in Holstein Bulls

The aim of this study was to determine the fertility ability and spermatological parameters of frozen-thawed bull semen routinely used in artificial insemination applications in the field by analyzing them under laboratory conditions. Frozen-thawed ejaculates (straws) produced from 5 different imported Holstein bulls, each containing 5 different collection dates, were used in the study. Artificial insemination was performed with bull semens in a total of 175 head of cows, 35 from each bull, in Burdur / Yeşilova Center and villages. Bull semens used in artificial insemination was analyzed for motility, plasma membrane integrity (PMAI), viability, lipid peroxidation level and mitochondrial oxidative stress. Pregnancy status of the animals was evaluated by determining the ultrasound examination at 60 days after insemination. No significant correlations founded between in vitro spermatologic parameters and pregnancy rate ($p>0.05$). However, a positive correlation was detected between motile results and pregnancy rate results in one bull ($p<0.05$). While no statistical difference was detected between bulls in terms of motility, viability, and lipid peroxidation level ($p>0.05$), statistical differences were detected between bulls in terms of PMAI and mitochondrial oxidative stress parameters ($p<0.05$). There was no statistical difference between bulls in terms of pregnancy rates ($p>0.05$). When spermatologic parameters were evaluated among themselves, positive correlations were found between motility with PMAI and viability; positive correlations were found between PMAI with viability and lipid peroxidation level; negative correlations were found between mitochondrial oxidative stress with viability and lipid peroxidation level; and positive correlations were found between viability and lipid peroxidation level ($p<0.05$). As a result, it is seen that the organelles and structures that make up the cell maintain metabolic activities in close relation with each other. In addition to correlating single spermatological parameters, it is thought that more than one combination should be created for multiple regression analyses to predict and correlate fertility, associations and correlations should be made in bulls with high and low fertility, and studies should be carried out on how and through which pathways these relationships and differences between bulls are formed.

Key Words: Bull, Fertility, Flow cytometer, Spermatological parameters, Artificial insemination

1.GİRİŞ

Spermatolojik parametrelerin değerlendirilmesinin temel amacı, sperma kalitesi ile fertilite arasındaki ilişkinin değerlendirilmesidir. Sığırlarda spermanın dondurulması, saklanması ve çözündürülmesi üzerine yoğun çalışmalar devam etmektedir. Başlangıçta biyoçeşitlilik olarak başlayan bu dondurma süreçleri, günümüzde ticari olarak geniş bir alan bulmaktadır. Spermanın dondurulma aşamaları, sperma hücresinde farklı derecelerde hasarlara sebep olmaktadır. Oluşan bu hasarlar ise, spermatazoonun oositi dölleme yeteneğini azaltmaktadır. Bu etmenlerden dolayı, dondurulmuş spermanın kalitesinin önceden belirlenmesi çok önemlidir. Üreme başarısı, birçok sperma fonksiyonunun etkinliğine bağlıdır. Bu nedenle, düşük fertilite potansiyeline sahip hayvanların damızlıktan çıkarılması için dondurma ve çözdürme sonrası birkaç spermatolojik parametrenin değerlendirilmesine dayanan bir fertilite tahmin sistemine sahip olması yararlı olacaktır. Böylece, önemli ölçüde zaman tasarrufu ve ekonomik kazanç sağlanacaktır. Daha önce yapılan çalışmalarda spermanın fertilite yeteneğinin tahmin edilmesinde bir dizi parametre ile çalışılmıştır (Gliozzi ve ark., 2017).

Fertilite ve sperma kalitesi hakkında evcil hayvanlarda membran bütünlüğü (Januskauskas ve ark., 2003), erken (Del Olmo ve ark., 2016) ve geç kapasitasyon (Thundathil ve ark., 1999), DNA bütünlüğü (Januskauskas ve ark., 2003; Evenson, 2016) gibi çeşitli spermatolojik parametreler değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar ışığında birkaç parametrenin birlikte analiz edilerek çoklu regresyon analiz değerlendirmelerinin yapılması gerektiği belirtilmektedir (Gliozzi ve ark., 2017). Bu analizler ise günümüzde bilimin ışığında teknolojik cihaz ve ekipmanların kullanılması ile sağlanabilmektedir. Laboratuvar şartlarında yapılan çalışmalarda floresan ataçmanlı mikroskoplar, Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sistemleri (BDSA); Computer Asisted Sperm Analyzer (CASA) ve flow sitometri cihazları kullanılarak spermatolojik parametreler analiz edilerek değerlendirilmektedir.

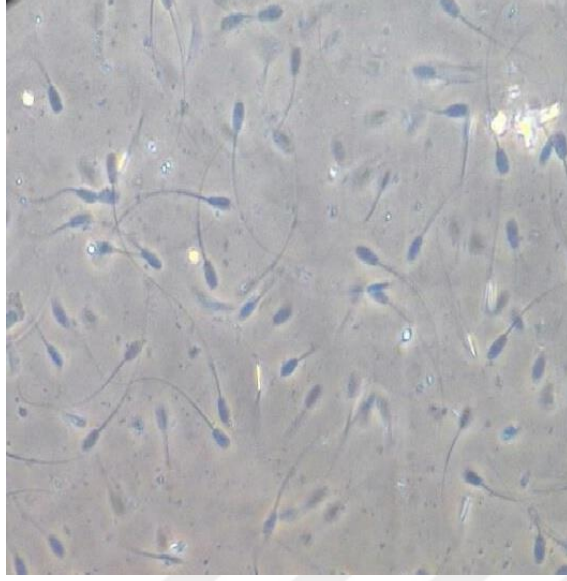
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spermatozoa Motilitesi

Motilite, hareket etme veya hareketlilik anlamında kullanılan bir terimdir. Spermatozoa motilitesi, bir yönde ve güçlü ileri doğru hareket eden spermatozoonların, diğer yönde ve hareketsiz olan spermatozoonlara oranı demektir. İdeal olarak faz kontrast ataçmanlı ısıtma tablalı mikroskoplar kullanılarak 20x ve 40x objektiflerde muayene edilmektedir. Progresif motil olarak değerlendirilen bir spermatozoon, başı yönünde ve güçlü düzgün doğrusal olarak hareket eder, progresif olmayan motil spermatozoonların hareket yeteneği bulunmaktadır; ancak doğrusal olmayan, güçsüz ya da normal olmayan bir şekilde hareket eden spermatozoonlar olarak değerlendirilmektedir. Total motilite ise hareket yeteneğine sahip spermatozoonların tamamı olarak ifade edilebilir. Motil olmayan spermatozoonların ise hareket kabiliyeti yoktur. Sperma motilitesi subjektif ve objektif yöntem olmak üzere iki şekilde incelenmektedir (Ak, 2008; Sönmez, 2022).

2.1.1. Subjektif Yöntem

Taze ve/veya sulandırılmış spermanın üzeri lamel ile kapatıldıktan sonra ısıtma tablalı faz kontrast mikroskoplarda 20x veya 40x objektifler ile motilite yönünden incelenmektedir. Burada her hareketli spermatozoonun motil olarak kabul edilmemesi gerekir. Örneğin, geriye doğru giden, titreşim ve dairesel hareket yapan hücreler değerlendirilmeye alınmaz. Mikroskop sahasında ileriye doğru hareket edenler dikkate alınır ve % olarak değerlendirilir. Aynı preparatta en az 5 farklı saha taranarak sonuca varılır (Ak, 2008; Sönmez, 2022).



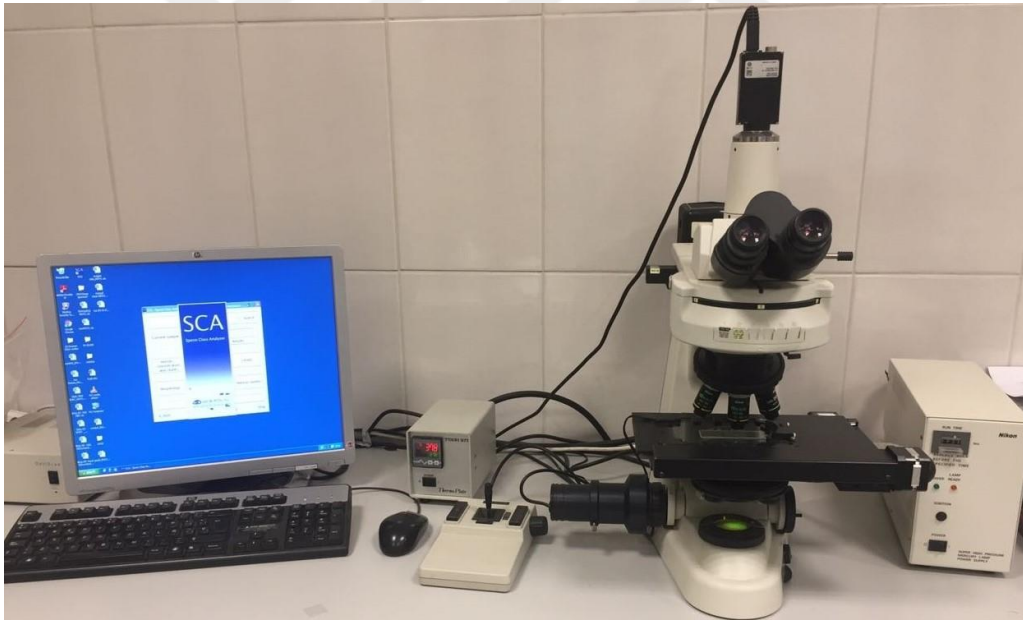
Şekil 2.1. Spermada subjektif sperma muayenesi

2.1.2. Objektif Yöntem

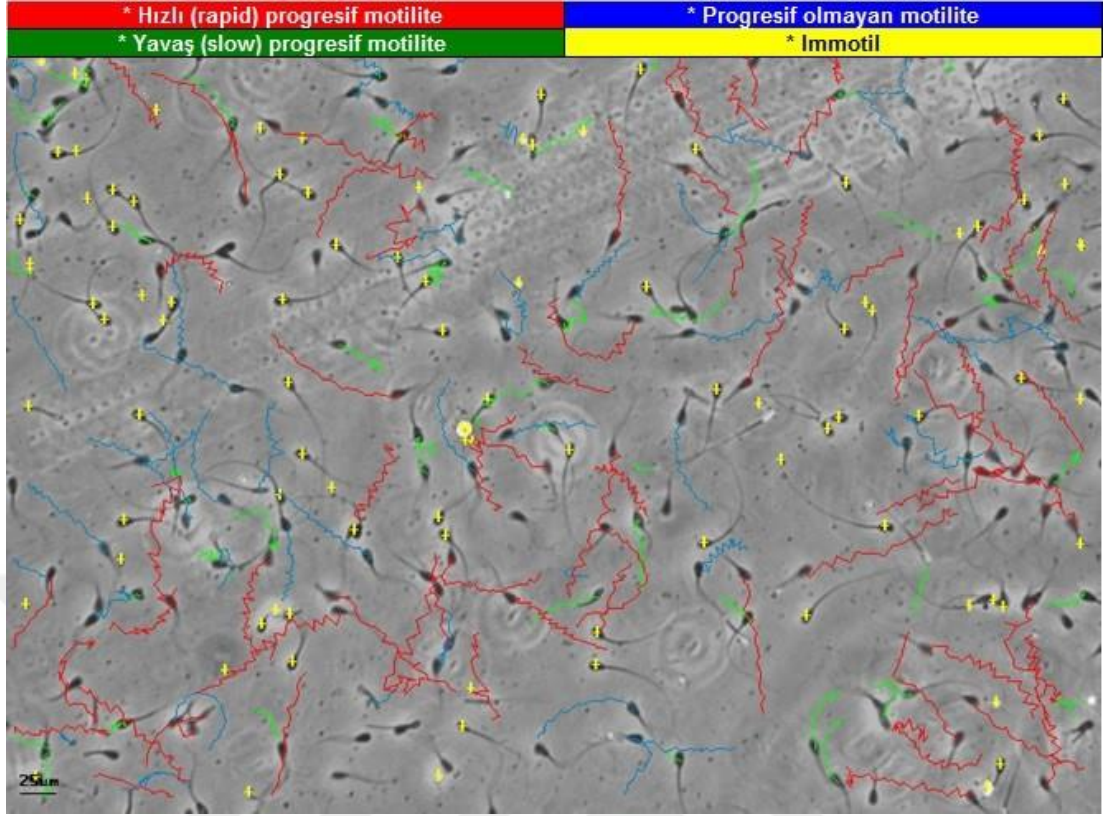
Taze veya sulandırılmış spermada objektif yöntem CASA kullanılarak yapılmaktadır. CASA'nın faydalı bir şekilde kullanılmasının temelinde, bu sistemin nasıl çalıştığını anlamak ve mikroskopta yüzen bir grup spermatozoon olarak görülen nesnelerin CASA sistemi vasıtasıyla motilite ve bazı hareket özelliklerini ölçülebilen sayılara dönüştüğünü anlamaktan geçmektedir. CASA sisteminin temel bileşenleri arasında video kamera, video-frame kart ve bilgisayar bulunmaktadır. Bilgisayar yazılım sistemi, spermatozoonların video görüntülerinin alınmasını ve bu görüntülerden elde edilecek bilgilerin hesaplamasını yapmaktadır (Ak, 2008; Sönmez, 2022, İnanç ve ark., 2017).

CASA yazılım programında parameterlerin değerlendirilmesinde; total motilite hareket özelliği bulunan spermatozoonların tamamı olarak ifade edilmektedir. Progresif motil olarak değerlendirilen bir spermatozoon, düzgün doğrusal, güçlü olarak başı yönünde hareket sağlar. Progresif olmayan motil spermatozoon ise hareket yeteneğine sahip olmakla birlikte güçsüz, doğrusal olmayan bir şekilde hareket eden spermatozoonlar olarak değerlendirilir. Motil olmayan spermatozoonların ise hareket yeteneği bulunmamaktadır. CASA sistemi, motilite parametrelerinin yanı sıra, spermatozoonun kinetik (hız parametreleri) parametre değerleri hakkında da bilgiler

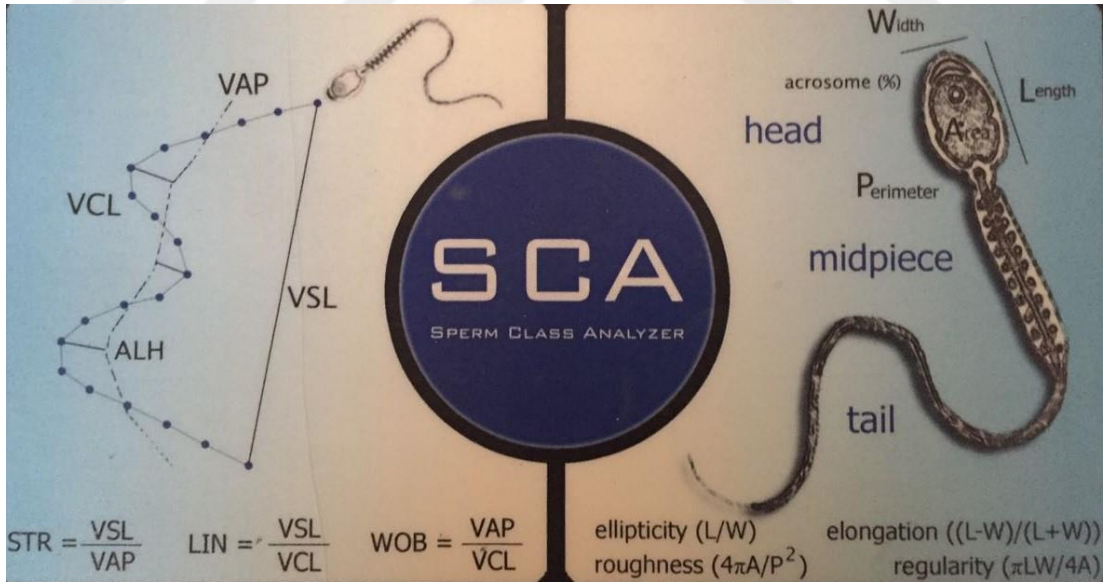
vermektedir. Spermatozoon ortalama hız parametreleri VSL (Velocity Straight Line); doğrusal bir eksen yönünde izlediği yolun başlangıcından sonuna kadar olan ortalama hızı $\mu\text{m/s}$, VCL (Velocity Curve Linear); spermatozoonun izlediği yol boyunca ortalama hızı $\mu\text{m/s}$, VAP (Velocity Average Path); aldığı toplam yol süresince ortalama hızı $\mu\text{m/s}$ şeklinde belirtilmektedir. Ayrıca, spermatozoonların takip ettiği yol ve aldığı mesafe açısından parametreler ise, LIN (Linearity %); spermatozoonun doğrusal yer değiştirmesini ($\text{VSL/VCL} \times 100$), STR (Straightness %); spermatozoonun doğrusal bir yörünge boyunca aldığı mesafeyi ($\text{VSL/VAP} \times 100$), WOB (Wobble %); aldığı toplam yol zamanı boyunca sola sağa sendeleme derecesini ($\text{VAP/VCL} \times 100$), Beat Cross Frequency (BCF); spermanın izlediği hücre yolu sıklığını, Amplitude of Lateral Head displacement (ALH); sperma yüzdüğü esnada baş hareketlerinin oluşturduğu genişliğin ortalamasını ölçtüğü belirtilmiştir (Verstegen ve ark., 2002; Foote, 2003; Malo ve ark., 2006, İnanc ve ark., 2017).



Şekil 2.2. Bilgisayar destekli sperm analiz sistemi (BDSA); Computer Asisted Sperm Analyzer (CASA)



Şekil 2.3. BDSA ile motilite muayenesi



Şekil 2.4. BDSA kinetik parametreler

2.2. CASA Motilitesi ve Kinetik Parametrelerinin Fertilizasyon ile İlişkisi

CASA, geniş bir aralıkta spermanın motilite parametrelerini ortaya koymaktadır. Böylece spermatozoonun fizyolojik durumu hakkında subjektif motiliteye göre fertilitenin tespit edilebilmesi için daha kesin bir sonuç vermektedir (Farrell ve ark., 1998; Christensen ve ark., 1999). CASA tarafından ortaya koyulan kinetik parametreler, fertilizasyon başarısının belirlenmesinde önemli görevler üstlenebilmektedir. Chenoweth ve ark. (1994) Amerikan Theriogenology topluluğunun androlojik muayene rehberine göre; 15 aylık boğanın skrotal çevre uzunluğunun 30 cm ve üzerinde, normal morfolojik spermatazoon oranının %70 ve üzerinde, progresif motil spermatazoon oranının ise en az %30 olması istendiği belirtilmektedir. Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın Suni Tohumlama, Tabii Tohumlama ve Embriyo Transferi Faaliyetleri Hakkındaki 08.12.2011 tarih ve 28136 sayılı yönetmeliğine göre, ithal edilecek spermaların belirli spermatolojik parametreleri taşıması gerektiği bildirilmektedir. Bu taallimata göre; CASA çözüm sonu cinsiyeti belirlenmemiş boğa spermasında total motilitesi en az %40, koç-teke sperma motilitesi en az %30, manda sperma motilitesi en az %40, spor atı sperma motilitesi en az %35, saf kan arap atı total motilitesi en az %30; subjektif total motilitesinin ise en az %30 olması istenmektedir. Cinsiyeti belirlenmiş boğa spermasında çözüm sonu 1 tohumlama dozunda en az 1 milyon ve üzerinde motil spermatazoon istenmektedir (Anonim, 2021).

Birçok araştırmacı, boğa spermatozoonlarındaki kinetik parametreler ile in vitro oosit bağlanma yeteneği ve sahada yapılan fertilizasyon çalışmaları arasındaki ilişkiyi araştırmıştır (Farrell ve ark., 1998; Kathiravan ve ark., 2008). Amann (1989), dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermalarında motilite kinetik parametrelerini incelemiş ve BCF, ALH, VSL, VCL ve LIN'in fertilitite indeksi ile ilişkili olduğunu tespit etmiştir. Kathiravan ve ark. (2008) boğa spermatazoonlarındaki değişik hareket çeşitleri ile oosite bağlanma yeteneği arasında bir ilişki tespit etmiştir. Bu ilişkinin pozitif anlamda progresif motilite ile olduğunu belirtmiştir. Hız parametrelerinden olan VAP, VSL, VCL'nin in vitro fertilizasyon yeteneği açısından bir ilişkisi olduğu da belirlenmiştir (ChanSteven ve ark., 1990; Holt ve ark., 1994). Nagy ve ark. (2015) CASA sistemi yardımı ile spermatozoa kinetik parametrelerini değerlendirmiş ve

yaklaşık 9.000 adet hayvanı bu spermalarla tohumlamıştır. Tohumlamalar sonucunda, hız parametrelerinden VCL, VSL, VAP değerlerinin diğer parametrelere göre daha kullanışlı olduğu tespit edilmiştir. Bu parametreler içerisinde de (VCL, VSL, VAP) VAP'nin fertilitenin tahmin edilmesinde en kullanışlı parametre olduğu bildirilmiştir. Robayo ve ark. (2008) koç sperması ve çeşitli hayvan türlerinin servikal mukusları ile yaptıkları çalışmada, koç spermasının motilite ve kinetik parametreleri CASA'da incelenmiş ve aynı spermalar çeşitli hayvan türlerinin servikal mukusları (koyun, keçi, inek) ile muamele edilerek hareketleri incelenmiştir. İnceleme sonucu spermanın koyun servikal mukusunda ilerleyişi ile VCL, VAP değerlerinin ($p<0,05$), keçi servikal mukusundaki ilerleyişinde VCL, VAP, STR ve LIN değerleri ile pozitif yönde ($p<0,01$); inek servikal mukusundaki ilerleyişinde ise sadece ALH ile negatif bir korelasyon ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir.

2.3. Hipo-Osmotik Şişme (HOS) Test

Fertilizasyonun gerçekleşmesi için, spermatozoonun kapasitasyon sürecini, akrozom reaksiyonu sürecini geçirebilmesi ve oosite bağlanabilmesi için fonksiyonel bir hücre membranına ihtiyacı vardır. Hipo-osmotik şişme testi, spermatozoonun plazma membran bütünlüğünü değerlendirmesinin yanı sıra, spermatozoonun fertilizasyon yeteneğinin tespiti için önemli bir testtir. HOS test, spermatozoon membranının çevre ile arasında olan denge farkı ile membran bütünlüğünü saptamaya yardımcı olur. Hipo-osmotik fark nedeniyle kuyruğun kıvrılması, balonlaşması veya şişmesi gözlemlenir. İncelenen örneklerde yüksek oranda şişmiş spermatozoon, sağlam ve fonksiyonel bir plazma membran bütünlüğünün göstergesidir (Sivakumar ve Rajasingam, 2013).

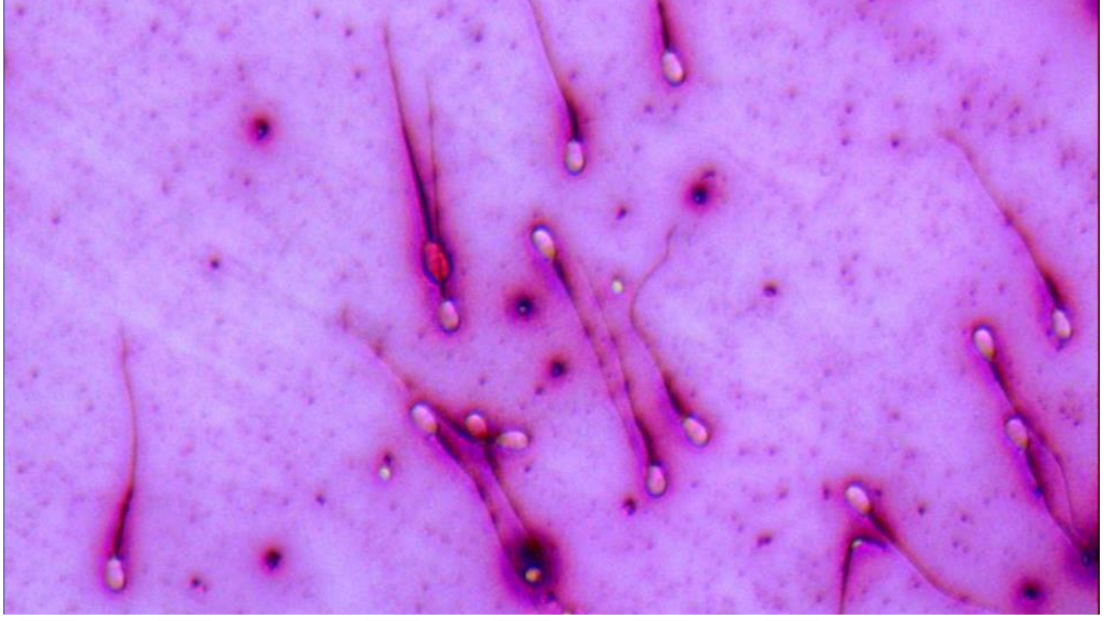


Şekil 2.5. Hos Test mikroskobik görüntü

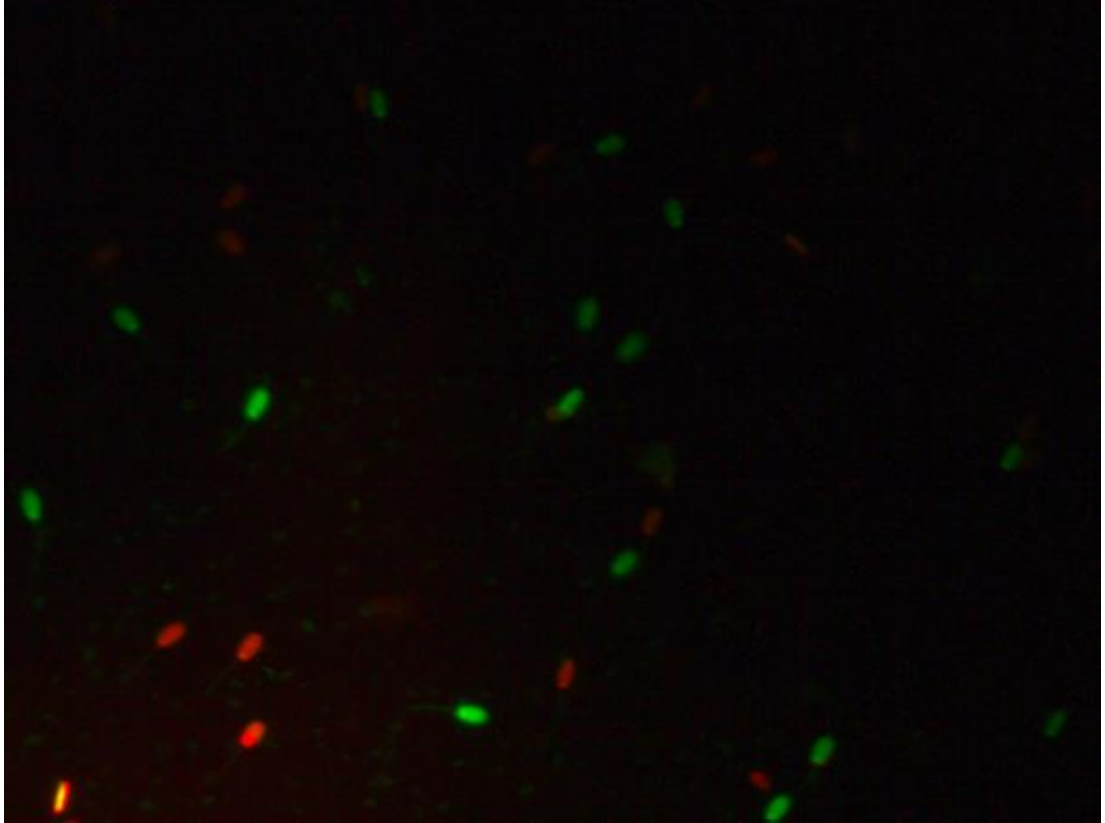
2.4. Ölü Spermatozoa Tespiti

Spermatozoonlarda ölü-canlı tespiti için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasından en çok tercih edilen çift veya tek renk veren metotlardır. Bu yöntemler içerisinde en çok tercih edilen ise fertilite potansiyelini en iyi gösteren yöntemdir. Geçmişten günümüze kadar tekli boyama ile yapılan boyamalarda morfolojik ve ölü canlı ve muayenelerinin yapılması için eozin boyama yöntemi kullanılmaktadır. Eozin boyama yönteminde, canlı spermatozoonlar düşük membran geçirgenliğine sahip olduğu için baş kısmı beyaz olarak görüntülenmektedir. Ölü spermatozoonlar ise membranların seçici geçirgenliği bozuk olduğu için baş kısmının turuncu-kırmızı (eozinofilik) olarak boyanması esasına dayanarak çalışmaktadır (Sönmez, 2022).

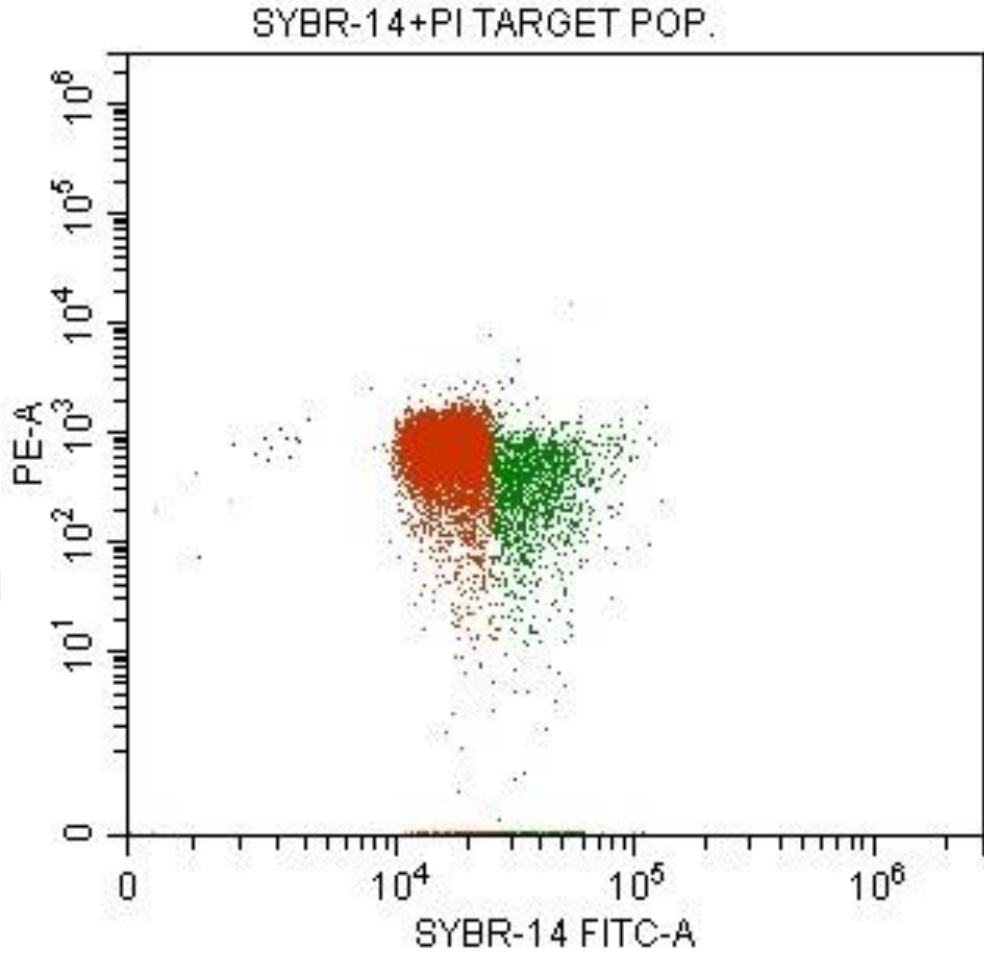
Günümüzde sperma örneklerinde ölü canlı tespitinde kullanılan çeşitli floresan boyalar bulunmaktadır. Çift renkli boya olarak çalışan SYBR-14 ve Propidium Iodide (PI) birlikte veya tek başına PI membranların sağlamlığının incelenmesinde ve değerlendirilmesinde tercih edilmektedir. SYBR-14 plazma membran geçirgenliğine sahip olan Deoksiribonükleik asit (DNA) boyasıdır. (uyarımı 488 nm; yayımı 516 nm). Canlı olan DNA hücrelerinin yeşil renkli floresan olarak gösterilmesini sağlar. PI ise, hücre çekirdeklerini kırmızı-turuncu olarak boyanmasını sağlayan (yayımı 617 nm, uyarımı 530 nm) plazma membranları hasarlı ve bozuk olan spermatozoonların bulunmasında tercih edilen bir boyama yöntemidir. (Chalah ve Brillard, 1998).



Şekil 2.6. Spermatozoonda Eozin boyaması



Şekil 2.7. Spermatozoonda ölü canlı oranının floresan mikroskopta değerlendirilmesi

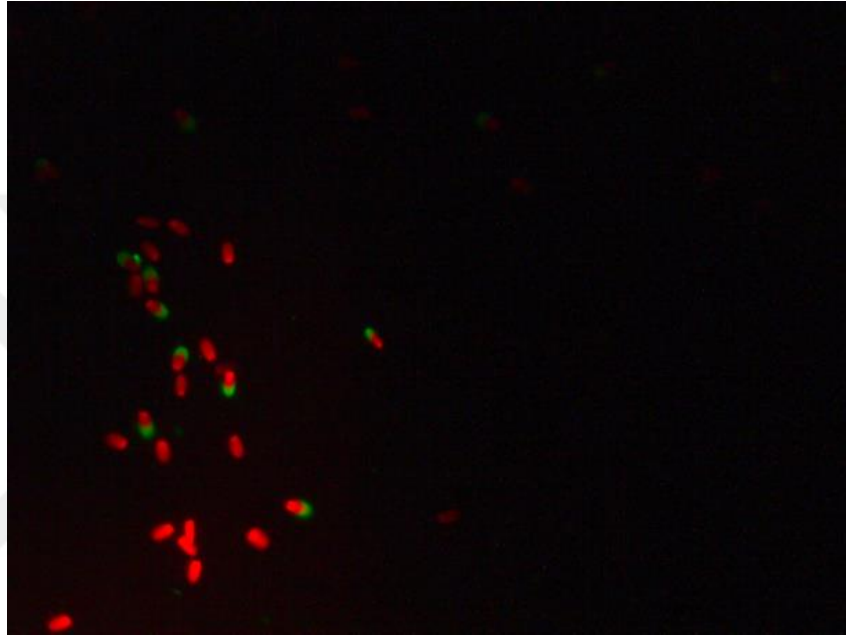


Şekil 2.8. Spermatozoon ölü-canlı muayenesinin flow sitometrik olarak değerlendirilmesi

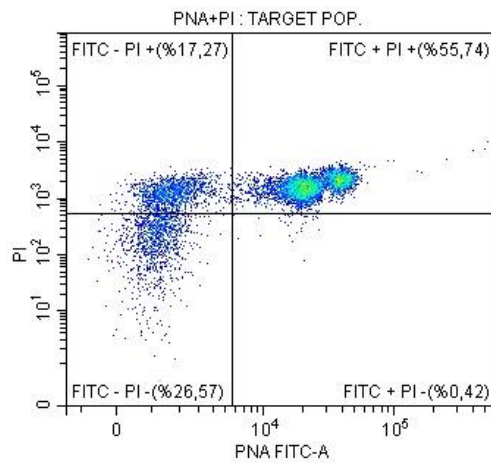
2.5. Akrozom Hasarının Değerlendirilmesi

Endoplazmik retikulum ve golgi aygıtından üretilen bir organ olan akrozom, fertilizasyon sırasında görevli farklı hidrolitik enzimleri içerisinde bulundurmaktadır. Fertilizasyon sırasında açığa çıkan akrozomal enzimlerin salınması vasıtası ile akrozom reaksiyonu sağlamaktadır. Ayrıca, akrozom reaksiyonu ve zona spermatozoon birleşmesinde hiperaktivasyonun katkısı sperm hücresinin zona pellüsidağa bağlanmasını sağlamaktadır. Spermatozoa, dişi genital kanalında fertilizasyon bölgesinde ilerlemesi öncesinde ve sırasında zona pellüsidağa bağlanana kadar, spermatozoonun baş kısmında bulunan akrozom bölümünün sağlam ve bütün olması gerekmektedir. Akrozom reaksiyonu sırasında, plazma membranının dış akrozom membranı ile birleşmesi ve bunun sonucunda ekzositoz için kalsiyum (Ca)

gerekli bir iyon olarak belirtilmektedir. Zona pellüsida ile etkileşimi ile öncelikle oluşan reaksiyon ile spermatozoonda Ca'nın ve alkaliliğin buna bağlı olarak pH'ın yükselmesidir. Akrozom hasarının değerlendirilmesinde Flurescein Isothiocyanate Conjugated Peanut Agglutinin (FITC-PNA) yöntemi tercih edilen en yaygın yöntemdir. Ayrıca akrozom bütünlüğü Lyso Tracer™ Green DND-26 boyama prosedürü kullanılarak da değerlendirilebilir (Gillan ve ark., 2005).



Şekil 2.9. Akrozom hasarının floresan mikroskopta değerlendirilmesi

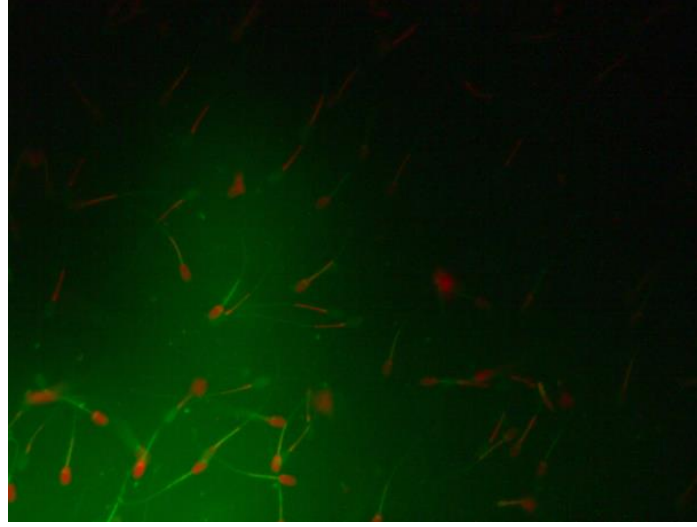


Şekil 2.10. Spermatozoon plazma membran/akrozom hasarının flow sitometrik olarak değerlendirilmesi

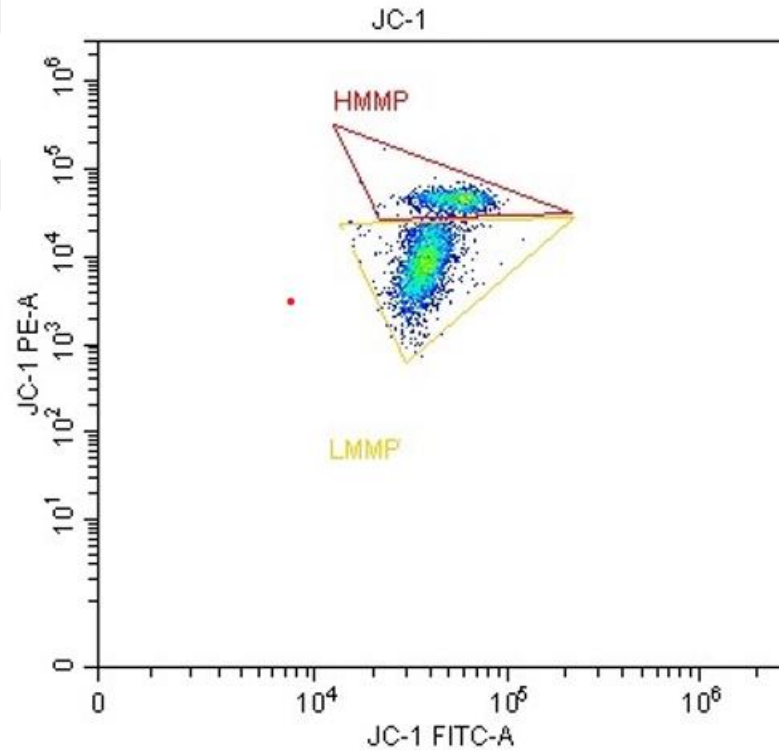
2.6. Mitokondriyal Aktivasyonun Değerlendirilmesi

Memeli spermatozoonları tipik olarak 50 ila 75 arasında mitokondriye sahiptir (Ankel-Simons ve Cummins, 1996). Spermatozoanın mitokondrileri kendine özgü özellikler gösterir. Aksonemler sıkıca sarılmış bir şekilde orta bölüme hapsedilmiştir. Spermiyogenezis sırasında, mitokondri uçtan uca sıralanır ve hücrenin dış plazma zarının hemen altında kalın mitokondriyal kılıfı oluşturmak için flagellum etrafında sarmal olarak sarılır (Ho ve Wey, 2007; Lindemann ve Lesich, 2016). Spermatozoanın flagellar hareketi ve motilitesi Adenozin trifosfat (ATP)'dan üretilen enerji vasıtasıyla sağlanacağı için, spermanın fertilizasyon yeteneğinin ve kalitesinin değerlendirilmesinde çeşitli yöntem ve tekniklere gerek duyulmaktadır. Spermatozoonun orta kısmında bulunan mitokondrilerde fiziksel veya kimyasal hasarlar, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) artışı, dondurma-çözdürmenin oluşturacağı hasarlar vb. ATP üretiminde aksaklıklara sebep olabilir. (Hallap ve ark., 2005; Gravance ve ark., 2000). Oluşacak bu etmenlere bağlı olarak mitokondriyal fonksiyonlardaki değişikliklerin ölçülmesi için çeşitli floresan boyamalar kullanılmaktadır.

Mitokondriyal fonksiyon değişiklikleri floresan boyalar kullanılarak flow sitometre veya floresan mikroskop kullanılarak ölçülmektedir. Mitokondrisi aktif spermatozoalarda 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimi-dazolyil-carbocyanine iodide (JC-1), rhodamine 123 (R123) ve MitoTracker (MITO) gibi 3 farklı floresan boyama kullanılarak fonksiyonlar tespit edilebilir. Floresan mikroskopta MITO ve R123 protokollerinde tek renkli yeşil görüntü elde edilirken, bunun tam tersi olarak JC-1 ile mitokondrisi boyananlarda hem kırmızı- turuncu hem de yeşil spermatozoonlar görülebilmektedir (Garner ve ark., 1997).



Şekil 2.11. Spermatozoon mitokondrial aktivasyonun floresan mikroskopta değerlendirilmesi



Şekil 2.12. Spermatozoon mitokondrial aktivasyonun flow sitometride değerlendirilmesi

2.7. Kapasitasyon Seviyesinin Değerlendirilmesi

Spermatozoonda kapasitasyon seviyesinin değerlendirilmesi, spermatozoonda kalsiyum (Ca) değişikliklerinin incelenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde florokrom özelliği bulunan bir antibiyotik türevi olan chlortetracycline (CTC) ile değerlendirilmektedir. CTC'nin hücre membranını Ca'ya olan geçirgenliğini artırarak serbest olarak bulunan Ca'nın hücre içine girmesi sağlanır. Hücre içine Ca girmesi ile floresan özellik gösteren CTC floresan mikroskop ve flow sitometre ile değerlendirilerek fertilizasyon ile ilişkisi değerlendirilmektedir (Kerns ve ark., 2018). Ca seviyesinin belirlenebilmesi için Fluo-3 ve Fluo-4 AM floresan boyaları kullanılabilir.

2.8. Apoptozis seviyesinin Değerlendirilmesi

Apoptozis, kelime anlamı olarak programlı hücre ölümü anlamına gelmektedir. Hücresel olarak nükleer hasarları ve kromatin agregasyonunu içeren kompleks bir durum olarak açıklanabilir. Programlı hücre ölümünün (apoptozis) fertilizasyon ile ilişkisi floresan boyamalar vasıtası ile flow sitometrik olarak değerlendirilebilir. Bu yöntemde yaygın olarak Annexin V boyaması kullanılmaktadır. Annexin V 35-36 Kd ağırlığında fosfolipit bağlayıcı ve Ca^{+2} bağımlı bir proteindir. Annexin V'in hücre lipid membranının iç kısmında bulunan phosphatidylserine'lere bağlanma özelliği bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise uğrarsa, phosphatidylserin molekülleri hücre membranında iç taraftan dış tarafa doğru yer değiştirirler. Ayrıca, Annexin V'in FITC kombine preparatlarının yapılan çalışmalarda hassas olarak çalıştığı tespit edilmiştir. Ayrıca, ticari preparatlarda değişmekle birlikte bu kombinasyon PI ile de olmaktadır (Chaveiro ve ark., 2007; Aydın, 2008).

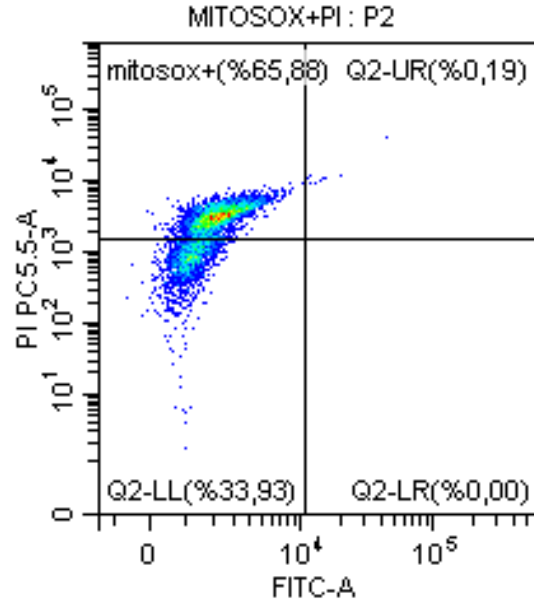
2.9. Spermada Konsantrasyon ve Yoğunluk Tayini

Çeşitli yöntemlerle alınan ejakulatların in vitro fertilizasyon (IVF) ve diğer reproduktif biyoteknolojilerde kullanılırken ml'de bulunan spermatozoon sayısının belirlenmesi çok büyük önem arz etmektedir. Daha önce yapılan hemositometrik ve CASA analiz yöntemlerinin yanı sıra flow sitometrik olarak da yoğunluk tespit

edilebilir. Flow sitometrik olarak olarak ‘beads’ taneciklerinin analiz edilerek örneğe eklenmesi ve analiz edilmesi esasına dayanarak diğer in vitro spermatolojik analizlerle (özellikle canlılık (SYBR-14/PI)) birlikte bu analiz yapılabilir. Yapılan çalışmalarda, türlere bağlı değişiklik göstermekle birlikte boğa sperması için, sulandırılan ejakülat (1:100- 1:250) ya da dondurulmuş çözündürülmüş 60×10^6 sperma örnekleri (1:20) Propidium iodide (PI) ve SYBR-14 boyama prosedürü ile boyanarak belirli bir hacimin okuması istenir. Side Scatter (SS)/Forward Scatter (FS) popülasyonlarının belirlenmesi ile elde edilecek sayı popülasyonu belirlenen hacimde konsantrasyon/yoğunluk parametresi olarak değerlendirilir. (Korkmaz ve Çil, 2020).

2.10. Oksidatif Stres’in Flow Sitometrik Olarak Değerlendirilmesi

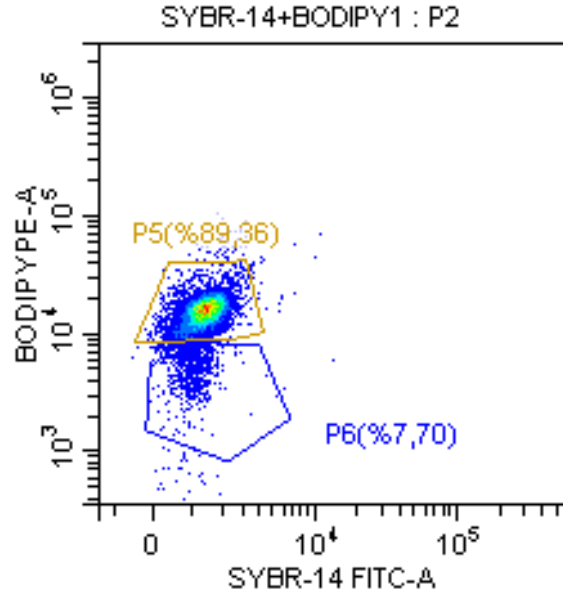
ROS oluşumuna bağlı olarak spermatozoonun kendi antioksidan savunma sistemlerinin dengesinin bozulması ve buna bağlı yetersiz kalması ile oluşan DNA hasarı, membran lipid yapısının zarar görmesi ve fertilitede düşüklükler oksidatif strese bağlı olarak görülen durumlardır. Spermanın dondurularak saklanması ve daha sonra çözündürülme işlemlerinin oksidatif stresin oluşumunda yeri büyüktür (Gürler ve ark., 2016). Bu açıdan, spermada oksidatif stres parametrelerinin incelenmesi ve değerlendirilmesi, dondurma-çözdürme işlemlerine karşı hassasiyetin tespiti açısından önemlidir. Oksidatif stresin flow sitometride belirlenmesinde, Dichlorodihydrofluorescein diasetate (DCFH-DA) sıklıkla kullanılan bir boyadır. 5-(ve-6)-karboksi-2',7'-diklorodihidro floresan’ın diasetat formu olan bu floresan boya, nitrojen dioksit, hidroksil, hidrojen peroksit, süperoksit anyon radikalleri ve karbonat anyon radikalleri tarafından yeşil floresan renk veren Dichlorodihydrofluorescein (DCF)’e dönüştürülür (Kalyanaraman ve ark., 2012). Bu yöntemde, 5 µl DCFH-DA (10 mM) ve 3 µl PI (2.99 mM), 492 µl sulandırılmış spermaya ilave edilerek boyama yapılır (Korkmaz ve ark., 2017). Bu yöntemlerin dışında, MitoSOX™, Dihydroethidium (DHE), CellROX Deep Red, 5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAF2-DA) ve CellROX Orange (De Castro ve ark., 2016) oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılan diğer floresan boyalardır. Bunun yanı sıra, MitoSOX™ floresan boyamasının spesifik olarak süperoksit anyonlarının (O_2^-) ve mitokondrial ROS seviyesinin belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmektedir (Koopers ve ark., 2008; Kumeresan ve ark., 2017)



Şekil 2.13. Spermatozoonda mitokondrial oksidatif stresin flow sitometride değerlendirilmesi

2.11. Spermatozoada Lipid Peroksidasyon Analizi

Doymamış yağ asitlerinden zengin bir yapısı olan spermatozoonlarda oksidatif stres, ROS ile yağ asitlerinin yapısının değişmesine ve buna bağlı olarak spermatozoa membranlarının yapısının bozularak, spermatozoonun işlevlerinin aksamasına sebep olmaktadır. Lipid Peroksidasyonun (LPO) değerlendirilmesinde en çok kullanılan yöntem yağ asidi analogu olan C11- BODIPY581/591 boyama protokolüdür (Ball, 2001). Floresan mikroskopta membran yapısı sağlam olan kırmızı (PI boyaması kullanıldığı için), peroksidasyona uğramış membranların ise yeşil (520 nm) renk veren spermatozoa hücreleri görülmektedir. Bu analiz yönteminde 5 µl BODIPY C11 (5mM) ve 3 µl PI (2.99 mM), 492 µl sulandırılmış sperma numunesi kullanılarak boyama yapılabilir. (Korkmaz ve ark., 2017).



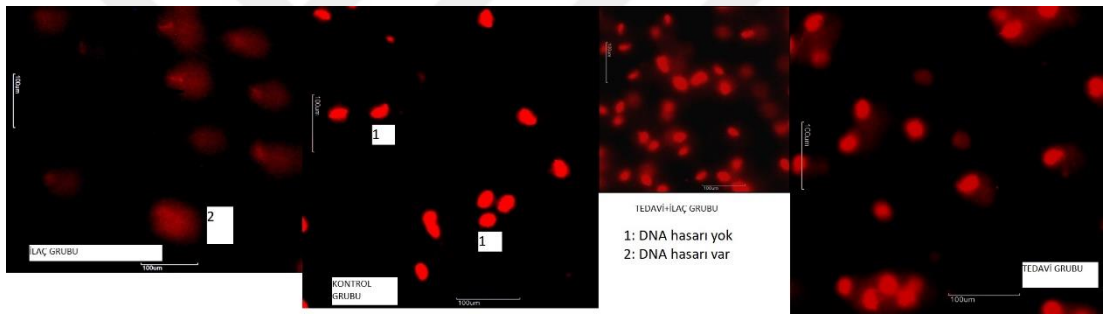
Şekil 2.14. Spermada lipid peroksidasyon seviyesinin flow sitometride belirlenmesi

2.12. Spermatozoada DNA Hasarlarının İncelenmesi

Fertilizasyon sırasında ovum ve spermatozoonun birleşimi esnasında DNA metilasyonları ve paketlenme hataları, histonlarda katlanmalar genetik olabileceği gibi, çeşitli toksik etkiler ve oksidatif strese bağlı olarak veya spermanın saklanması sırasında oluşabilmektedir (Gürler ve ark., 2016). Bu etmenlerden dolayı, embriyonik yaşamın önemli bir kriteri olan ve fertilizasyon başarısını etkileyen DNA hasarının belirlenmesi in vitro spermatolojik analiz yöntemleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. DNA hasarı, tek hücre jel elektroforezi (COMET) floresan mikroskopta, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) ya da sperm chromatin structure assay (SCSA) ile flow sitometride ortaya konulabilir (Sharma ve ark., 2013; Evenson, 2016). TUNEL ve SCSA yöntemlerinin floresan mikroskoplarda değerlendirilmesi de mümkündür. Sperm kromatin yapı analizi (SCSA) spermatozoa'da nükleer kromatininin ısı denatürasyonuna hassasiyet derecesi ve acridine orange (AO) boyasının tek iplikçikli DNA'da kırmızı olarak çift iplikçikli DNA da ise yeşil renk verme boyama prosedürüne bağlı olarak çalışmaktadır (Evenson, 2017). TUNEL metodu ise, spermatozoonun tespit edilmesi ve ticari kitlerin kullanılması ile 488 nm lazer ile analiz edilmesi esasına dayanmaktadır. Sperma numuneleri, konsantrasyonları 2×10^6 spermatozoon/ml olacak şekilde sulandırılır. 200 µl sperma

örneği önce 400 µl asit-deterjan solüsyonu ile (0.15-M Sodium chloride [NaCl], 0.08-N Hidroklorik asit [HCl], pH: 1.2 ve 0.1% Triton X-100) ile 30 saniye, daha sonra fosfat sitrat tamponu ilave edilmiş 1.2-mL (6 mg/L) ve saflaştırılmış AO (0.15-M NaCl, 0.2-M Di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate [Na₂HPO₄], 1-mM Etilendiamin tetraasetik [EDTA], 0.1-M sitrik asit, pH 6.0) ile boyanır. Hazırlanan sperma numuneleri, 3 dakikalık karanlıkta inkübasyonundan sonra flow sitometride analizi gerçekleştirilir (Malama ve ark., 2017).

Domuzlarda yapılan çalışmada domuz spermasının kısa süreli (yaklaşık 15 gün) ve taze olarak saklanması sonucu yapılan suni tohumlama çalışmalarında DNA hasar derecesinin çiftleşme ve doğan yavru sayısı ile negatif ilişkisinin olduğu tespit edilmiştir (Broekhuijse ve ark., 2012).



Şekil 2.15. Spermada COMET analiz yöntemi ile DNA hasarının belirlenmesi

2.13. Florasan Boyamalar ve Flow Sitometrik Sonuçların Fertilite ile İlişkileri

Boğa spermasında apoptozunun tespiti üzerine yapılan bir çalışmada taze ve dondurulmuş spermada apoptozis seviyesi ve bunun fertilite ile ilişkisinin belirlenmesi üzerine çalışma yapılmıştır. Beş farklı fertilite yeteneğine sahip hayvandan üçer ejakulat toplanmıştır. Apoptozis seviyesinin ölçümünde phosphatidylserine translokasyonu için bir test Annexin V ve PI; Bromodeoksiüridin (BrdU) flow sitometrik test yöntemi kullanılmıştır. Her iki test de taze spermada %10-20 arasında değişen apoptotik spermatozoon oranı tespit edilmiştir. Boğalar arasında apoptotik spermatozoon yüzdesinde önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. Dondurarak saklama, phosphatidylserine'nin dış katmana translokasyonunu uyardığı tespit edilmiştir. Boğaların fertilizasyon yetenekleri ile Annexin V / PI testindeki nekrotik veya canlı

sperm yüzdesi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu; taze spermada apoptotik spermatozoa oranının yüksekliği ile boğalarda fertilizasyon yeteneğindeki düşüşler arasında ilişki tespit edilmiştir (Anzar ve ark., 2002).

Fertiliteyi tahmin edebilecek tek bir analiz arayışı çoğunlukla sonuçsuz kalmıştır. Birçok in vitro spermatolojik parametre fertilizasyon ile korelasyon göstermiştir, ancak çoğu durumda çalışmaya bağlı olarak oldukça değişken sonuçlar tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda ise yalnızca birkaç testin kombinasyonu yüksek korelasyonlara yol açmıştır (Rodriguez-Martinez, 2003). Flow sitometrinin kullanımı, yüksek hassasiyetine ve tekrarlanabilir olmasına rağmen, SCSA® tarafından yapılan DNA analizi durumu dışında bu durumu tam anlamı ile iyileştirememiştir. Daha önce belirtildiği yukarıda da açıklandığı üzere, pek çok yazar tarafından fertil olmayan bireylerin tespiti ve DNA fragmentasyon indeksi için SCSA ile boğa ve domuz spermasının fertilizasyon ile bağlantısı ortaya konulmuştur (Waterhouse ve ark., 2006; Boe-Hansen ve ark., 2008; Didion ve ark., 2009).

Flow sitometri analizleri, spermatozoon fizyolojisindeki ince değişiklikleri saptayan ve fertilizasyon ile ilişkilendirilebilecek sonuçlar sunmaktadır. Bununla birlikte, dondurulmuş çözürülmüş spermaların analizinde bazı parametreler arasında oluşan korelasyonların önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Januskauskas ve ark. (2003) SCSA ve fertilite arasında da düşük korelasyonlar tespit etmiştir. Bazı yazarlar ise flow sitometri sonuçlarını diğer testlerle (örneğin CASA) birleştirdikten sonra yüksek korelasyonlar elde etmiştir ($r = 0.9$). Bu nedenle, bazı flow sitometri analizleri, sperma örneklerinin fertilite potansiyelini değerlendirmek için umut verici bir durum sunduğu, diğer spermatolojik parametreler ile de desteklenmesi gerektiği bildirilmektedir (Rodriguez- Martinez 2006).

Fertilite ve sperma analizlerinin sonucu arasında tek bir ilişki bulmayı amaçlamak yerine, yeni stratejiler, spermatozoayı zorlayan fonksiyonel testleri sperm analizleriyle birleştirme eğilimine gidilmelidir. Bu testler, sperm örneklerinin doğal heterojenliğinden yararlanarak gerçek fertilite potansiyelinin ortaya çıkarılmasına izin verir (Rodriguez-Martinez, 2006; Petrunkina ve ark., 2007). Örneğin, boğa sperması ile çalışan Bollwein ve ark. (2008) SCSA® ile fertilizasyon arasında hiçbir ilişki

bulamamıştır. Bununla birlikte, çözülmüş örnekleri 38 ° C'de 3 saat inkübe ettikten sonra, 56 günlük geri dönmeme oranı, Non Return Rate (NRR) ile negatif bir DNA hasar oranı korelasyonu elde edilmiştir.

Flow sitometre gibi gelişmiş analitik tekniklerle fizyolojik zorlukları birleştiren değerlendirme testlerinin geliştirilmesinin, fertilite ilişkili olarak in vitro değerlendirmenin tahmin değerini artırması beklenmektedir. Son yapılan flow sitometre çalışmalarında ise yukarıda bahsedilen tekli çalışmaların yanında multicolor (çoklu renk) olarak adlandırılan çoklu parametrelerin birlikte değerlendirilmesi ile (3 lazer, violet, mavi, kırmızı) hücrenin bütününe çeşitli flow sitometri parametreleri ile analizi yapılarak fertilite ile ilişkisi değerlendirilmektedir. Bucher ve ark. (2019) suni tohumlama ve sperma üretim merkezinde yetiştiriciliği yapılan 20 boğayı retrospektif fertilite kayıtlarına göre yüksek (n:10) ve düşük fertilite (n:10) yeteneği olan hayvanlar olarak sınıflandırarak bu hayvanların toplamda 91 ejakulatını çözüm sonrası 0. Saat ve 3. Saatlerde (38 C°'de bekleterek) flow sitometrik olarak analiz etmiştir. Flow sitometri analizinde sperm esterez aktivitesi için Calcein violet (yüksek esterez aktivitesi, C pos), plazma membran bütünlüğü için Propidium Iodide (PI neg), akrozom bütünlüğü için lektin (PNA neg), hücre içi kalsiyum seviyesi için (F neg) ve yüksek mitokondrial aktivite için Mitoprobe (M pos) kullanılmıştır. Yüksek ve düşük fertilite yeteneğine sahip boğalar karşılaştırıldığında belirtilen parametreler için boğalar arasında fertilite açısından bir farklılık bulunamamıştır. Fakat 0. saat değerleri arasında F neg ile PI neg/PNA neg değerleri arasında; F neg ile PI neg/Mpos parametreleri arasında bir ilişki olduğu ve yüksek fertilite yeteneğine sahip boğalarda bu değerlerin yüksek olduğu belirlenmiştir. Tüm değerlendirme sonrası 0. saat F neg ile PIneg/Mpos parametrelerinin önemli bir fertilite göstergesi olabileceği belirtilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, sahada rutin olarak suni tohumlama uygulamalarında kullanılan dondurulmuş çözdürülmüş boğa spermalarının laboratuvar şartlarında analiz edilerek fertilite yeteneklerini ve fertilite ile korelasyonlarının ve ilişkilerinin belirlenmesidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Çalışma kullanılan hayvan materyali için, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan **17.11.2021 tarih ve 821 sayılı** karar ile izin alınmıştır. Ayrıca, çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından **0779-YL-21** nolu yüksek lisans projesi ile desteklenmiştir.

Çalışmada boğa sperması olarak sahada suni tohumlama organizasyonlarında rutin olarak kullanılan 5 farklı ithal holstein ırkı boğalardan üretilmiş her bir boğanın 5 farklı toplama tarihini içeren dondurulmuş-çözdürülmüş ejakulatları (payetleri) kullanıldı. İthalat izni verilen firmalardan temin edilen spermalar (5 farklı boğa x 5 farklı toplama tarihi) ile her bir toplama tarihinden 7 adet suni tohumlama olacak şekilde toplamda 175 dişi hayvan kullanıldı. Kullanılan boğalar Tablo 3.1'de; katalog bilgileri ise dipnot olarak sunulmuştur.

Tablo 3.1. Kullanılan Boğalar ve Dondurma Tarihi/Kodları (Toplama Tarihleri)

No	Boğa Adı	Kulak Numarası	Dondurma Tarihi/Kodu
1	Alta	HOUSAM000069522869	26.01.2015
	Bering ¹		02.02.2015
			16.09.2015
			21.09.2015
			28.09.2015
2	Alta	HOUSAM000070694620	25.07.2016
	Defector ²		04.08.2016
			08.08.2016
			18.08.2016
			22.08.2016
3	Alta	HO840M003004886557	08.08.2012
	Treasure ³		27.02.2014
			24.04.2014
			05.06.2014
			08.08.2014
4	FWS	DEUM000354449388	160208
	Boom ⁴		190912
			161114
			160718
			170227
5	Nog Josef ⁵	DEUM000353896196	151001
			151005
			151008
			151012
			151015

¹ Anonim 2022a

² Anonim 2022b

³ Anonim 2022c

⁴ Anonim 2022d

⁵ Anonim 2022e

Çalışmada suni tohumlamada kullanılacak olan dişi hayvanlar Burdur/ Yeşilova Merkez ve Köylerinde bulunan reproduktif geçmişlerine ve klinik muayenelerine bakılarak, vücut kondisyon skoru 2,5-3,5 olan hayvanlar çalışmada kullanıldı. En az 1 doğum yapmış, herhangi bir reproduktif problemi olmayan doğumdan sonra 45-60 gün geçmiş, 2-4 yaşlı hayvanlar çalışmaya dahil edildi. Çalışmada doğumdan sonraki ilk kızgınlığa gelen hayvanlar kullanıldı. Tohumlama öncesi dış klinik belirtiler ve çara akıntısının varlığı ile tespit edildi. Klinik olarak hayvanın östrus döneminde olduğu ise rektal palpasyonda graff folikülünün varlığı ve uterus tonusu ile doğrulandı. Östrus döneminin klinik ve gözlem belirtileri ile doğrulanmasının ardından, suni tohumlama hayvan sahibinden alınan anemnez doğrultusunda kızgınlığın başlangıcından en az 12 saat sonra yapıldı. Tohumlamalar, 37 C°'de 30 saniyede çözdürülen sperma ile rektovajinal olarak korpus uteriye bırakılarak gerçekleştirildi. Tohumlama sonrası 60. gündeki gebelik oranı Bonway (Bw560v) marka ultrason ile tespit edildi.

3.2. Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

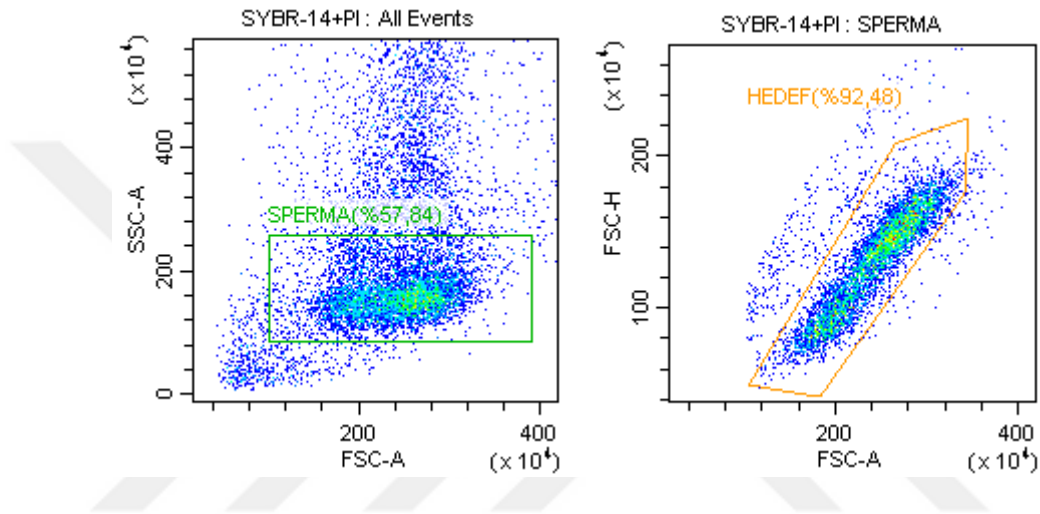
3.2.1. Çözüm Sonu Spermatozoa Motilitesi

Subjektif olarak değerlendirilen motilite; 40x objektifte faz kontrast mikroskopta beş farklı sahanın ortalaması alınarak yapıldı (İnanç ve ark., 2022)

3.2.2. Flow sitometri Analizleri

Flow sitometri analizleri Cytoflex Flow sitometri (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) cihazı ile yapıldı. Sperma örnekleri 488 nm (50 mW laser output)'lık tek lazer ve üç renkli 610 ± 20 nm, 585 ± 42, 525 ± 40 filtreler ile değerlendirildi. Cihazın okuma hızı 30 µL/dakika saniyede olarak ayarlanarak her bir örnek için 10.000 hücre analiz edildi. Popülasyon seçimi (Kapılama [gate]) için hücre büyüklüğü esasına göre ayırım yapan Forward Scatter Area (FSC-A) ve hücrelerin granülitesine göre ayırım yapan Side Scatter Area (SSC-A) tüm hücreler okunarak sperm popülasyonu tespit edildi. Ardından FSC-A ve Forward Scatter Hight (FSC-H) kapıları ile hedef popülasyon seçimi yapıldı (Şekil 3.1).

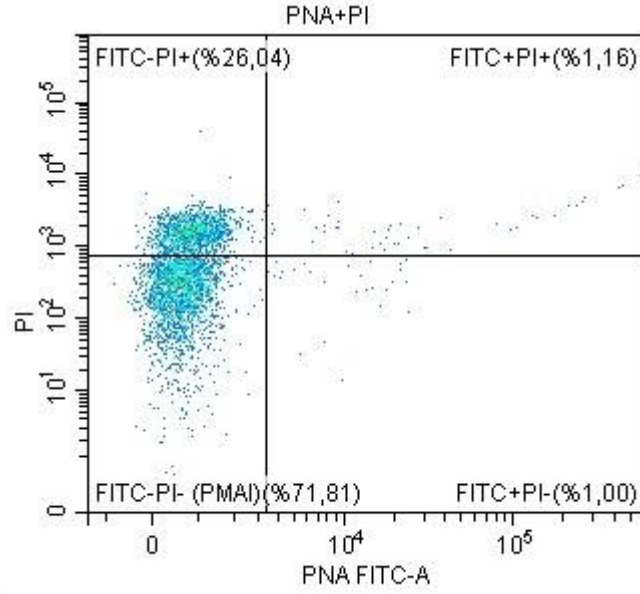
Çalışma solüsyonları 100 µg/mL fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin 100 µg/ml FITC-PNA [L7381, Sigma, Emission: 521 nm], 2.99 mM propidium iodide (PI) (Emission: 629 nm), 1:10 SYBR 14 [L7011, molecular probes, Invitrogen, Emission: 520 nm], 5 µM BODIPY [D38611, molecular probes, Invitrogen, Emission: 598 nm], 5 µM MitoSOX (M36008, molecular probes, Invitrogen, Emission: 582 nm) Dimethyl sulfoxide (DMSO) ile hazırlanarak 30-µL porsiyonlara ayrıldı, -20 °C’de saklandı.



Şekil 3.1. Flow sitometride hedef popülasyonun seçilmesi

3.2.2.1. Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

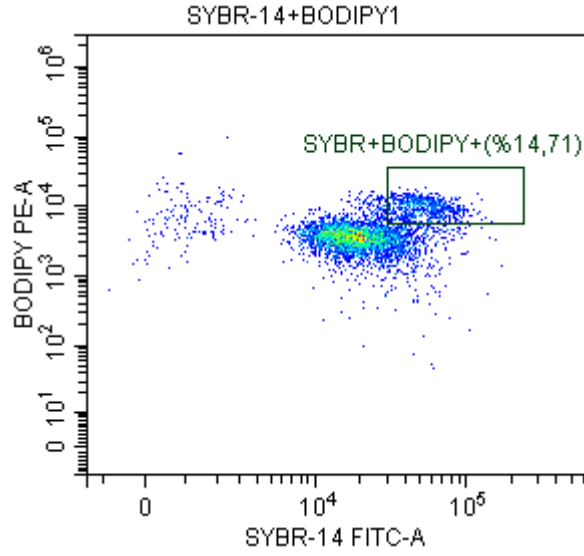
Çift boyama yönteminin kullanıldığı FITC-PNA/PI boyamada spermada plazma membran ve akrozom bütünlüğü değerlendirildi. 5 µL FITC-PNA ve 3 µL PI 492 µL PBS eklendi, daha sonra 10 µL sperma Phosphate-Buffered Saline (PBS) solüsyonuna ilave edilerek spermatozoon konsantrasyonu 5×10^6 sperm/mL olacak şekilde sulandırılma yapıldı. Numuneler 37 °C’de 15 dakika karanlık ortamda inkubasyona bırakıldı. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırıldı ve CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) ile analiz gerçekleştirildi. Analiz sırasında FITC- PI- popülasyonunun (%) plazma membranı ve akrozomu sağlam, Plasma membrane and Acrosome Integrity (PMAI) popülasyon (%) olarak değerlendirildi (Şekil 3.2.) (İnanç ve ark., 2022).



Şekil 3.2. PMAI'nın flow sitometrik analizi

3.2.2.2. Lipit peroksidasyon Seviyesinin Belirlenmesi

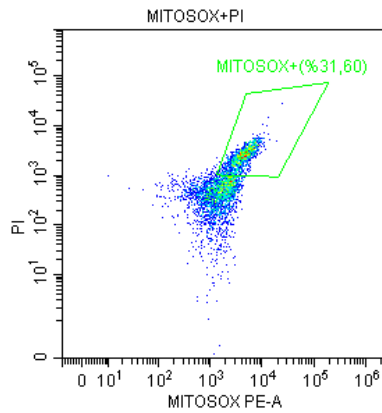
Sitozolik lipit peroksidasyon seviyesi BODIPY+SYBR 14 çift boyama yöntemi ile değerlendirildi. Hücrelerdeki ROS'un göstergesi olarak kullanılan BODIPY indirgenmiş bir floresein formudur. Bu boyama yönteminde 5 µL BODIPY ve 3 µL SYBR-14 492 µL PBS ilave edildi, ardından 10 µL sperma PBS solüsyonuna solüsyonuna ilave edilerek spermatozoon konsantrasyonu 5×10^6 sperm/mL olacak şekilde sulandırılma yapıldı. Numuneler 37 C°'de 15 dakika karanlık ortamda inkubasyona bırakıldı. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırılarak CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) ile analiz gerçekleştirildi. Analiz, SYBR 14 boyasını alan (canlı spermatazoa) popülasyon içerisindeki BODIPY + (hücre) popülasyonu değerlendirilerek gerçekleştirildi (Şekil 3.3.) (Korkmaz ve ark.,2017).



Şekil 3.3. Lipit peroksidasyon seviyesinin flow sitometrik olarak analizi

3.2.2.3. Mitokondrial Oksidatif Stresin Belirlenmesi (MitoSOX/PI)

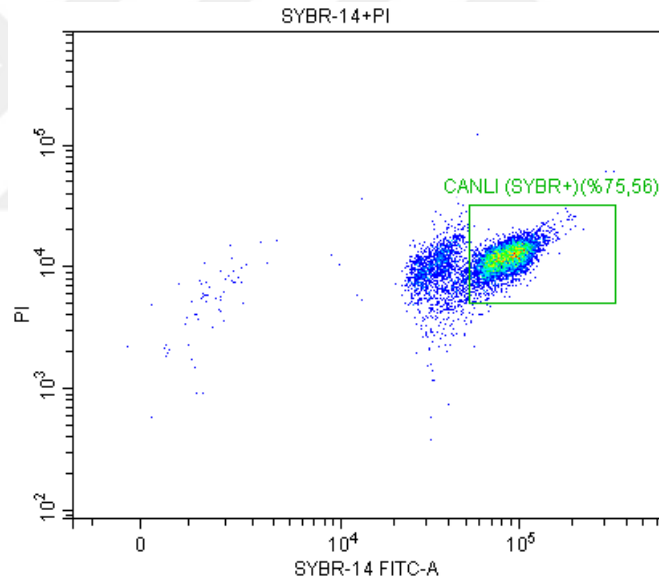
Çift boyama yönteminin kullanıldığı Mitosox/Pi boyamada spermada mitokondrial oksidatif stres değerlendirildi. 5 µL Mitosox ve 3 µL PI 492 µL PBS ilave edildi, daha sonra 10 µL sperma PBS solüsyonuna ilave edilerek spermatozoon konsantrasyonu 5×10^6 sperm/mL konsantrasyonu olacak şekilde sulandırılma yapıldı. Numuneler 37 C°'de 15 dakika karanlık ortamda inkubasyona bırakıldı. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırılarak CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analiz gerçekleştirildi (Şekil 3.4). Analiz, MITOSOX + popülasyon (%) mitokondrial oksidatif stres olarak değerlendirildi.



Şekil 3.4. Mitokondrial oksidatif stresin flow sitometrik olarak incelenmesi

3.2.2.4. Ölü-Canlı Oranının Belirlenmesi

Sybr 14 ve PI boyaları spermada ölü-canlı oranın değerlendirilmesinde kullanıldı. 5 µL Sybr 3 µL PI (2.99 mM) 492 µL of buffer solution eklenerek, daha sonra 10 µL sperma süspansiyonu fosfat buffer solüsyonuna ilave edilerek spermatozoon konsantrasyonu 5×10^6 sperm/mL konsantrasyonu olacak şekilde sulandırılma yapıldı. Numuneler 37 C°'de 15 dakika karanlık ortamda inkubasyona bırakıldı. Debris (sperma olmayan alanlar) kapı alınarak uzaklaştırılarak CytExpert 2.3 software (Beckman Coulter) analiz gerçekleştirildi (Şekil 3.5). Analiz, SYBR 14 boyasını alan ve PI boyasını almayan popülasyon (%) canlı olarak değerlendirildi (İnanç ve ark., 2022).



Şekil 3.5. Ölü canlı seviyesinin belirlenmesinde flow sitometrik analiz

3.3. İstatistiksel Analiz

Önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden ShapiroWilks test ile varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Boğalar arasında istatistiksel açıdan farklılığın kontrolü tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı

değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi'nden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 22.0 paket programından yararlanıldı. Gebelik oranı ki kare testi kullanılarak analiz edildi. Ayrıca, regresyon analizi de kullanılarak spermatolojik parametrelerin fertilité ile ilişkileri ortaya konuldu.



4. BULGULAR

Suni tohumlama yapılan boğalara ait ortalama spermatolojik parametreler Tablo 4.1’de sunulmuştur. Motilite, canlılık ve lipid peroksidasyon seviyesi (BODIPY +) açısından boğalar arasında istatistiki bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$). En düşük PMAI FWS Boom adlı boğada ($p<0,05$); en yüksek mitokondrial oksidatif stres (MITOSOX +) Alta Trasure ve FWS Boom boğalarında tespit edildi ($p<0,05$).

Tablo 4.1. Suni Tohumlama yapılan boğalara ait ortalama spermatolojik parametreler

	MOTİLİTE (%)	PMAI (%)	MITOSOX + (%)	CANLILIK (%)	BODIPY + (Hücre)
Alta Bering	54,50±4,56	71,49±1,77 ^b	23,86±3,59 ^a	65,03±3,03	725,40±145,57
Alta Treasure	51,50±1,27	68,30±2,20 ^b	33,84±4,33 ^{ab}	48,92±6,21	1330,40±559,70
Nogjosef	59,37±4,60	67,31±4,48 ^b	22,70±2,58 ^a	63,89±3,54	1752,68±555,62
Fws Boom	54,75±5,57	48,57±3,66 ^a	47,17±6,06 ^b	52,44±12,66	704,50±206,55
Alta Defector	60,00±3,70	70,41±4,80 ^b	29,02±6,58 ^a	64,73±4,57	1108,60±210,43
Total	55,90±1,77	65,91±2,20	31,00±2,68	59,94±2,73	1141,80±180,28
p		*	*		

*Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiki olarak farklıdır ($p<0,05$)

Spermatolojik parametreler ve gebelik sonuçları arasında korelasyonlar Tablo 4.2.’de sunulmuştur. Gebelik&spermatolojik parametreler arasında istatistiki olarak anlamlı ilişki tespit edilemedi ($p>0,05$). Spermatolojik parametreler kendi arasında değerlendirildiğinde Motilite ile PMAI ve canlılık arasında pozitif; PMAI ile Canlılık ve BODIPY + arasında pozitif, MITOSOX + ile negatif; MITOSOX + ile canlılık ve BODIPY + arasında negatif; canlılık ve BODIPY + arasında pozitif korelasyon tespit edildi ($p<0,05$).

Tablo 4.2. Spermatolojik parametreler ve gebelik arasında korelasyon sonuçları

	MOTİLİTE	PMAI	MITOSOX +	CANLILIK	BODIPY+	GEBELİK
MOTİLİTE						
PMAI		,262**				
MİTOSOX +		-,121	-,649**			
CANLILIK		,221**	,313**	-,675**		
BODIPY +		,039	,256**	-,271**	,272**	
GEBELİK		,021	,027	-,058	,063	,078

**p<0,01

Suni Tohumlama yapılan boğalarda bireysel gebelik&spermatolojik parametreler arasındaki korelasyonlar Tablo 4.3.'de gösterilmiştir. Bireysel değerlendirmede sadece Alta Treasure boğasında motilite ile anlamlı korelasyon tespit edildi (p<0,05).

Tablo 4.3. Suni Tohumlama yapılan boğalarda bireysel gebelik&spermatolojik parametreler arasındaki korelasyonlar

	MOTİLİTE	PMAI	MITOSOX+	CANLILIK	BODIPY +
Alta Bering	-,089	-,224	-,075	,101	,279
Alta Treasure	,416*	-,050	,019	,333	,240
Nog Josef	,099	-,086	,69	,097	,68
Fws Boom	-,035	-,198	,63	,003	,088
Alta Defactor	,220	,206	-,217	,234	,151

*p<0,05.

Suni tohumlamada kullanılan boğa spermalarının gebelik sonuçları Tablo 4.4.'de verilmiştir. Gebelik sonuçları açısından boğalar arasında istatistiki bir fark tespit edilemedi (p>0,05).

Tablo 4.4. Suni tohumlamada kullanılan boğa spermalarının gebelik sonuçları

Boğalar	Gebelik (%)
Alta Bering	85 29/35
Alta Treasure	82 28/35
Nog Josef	74 25/35
Fws Boom	74 25/35
Alta Defactor	74 25/35

5. TARTIŞMA

Suni tohumlama uygulamalarında kullanılan boğaların fertiliteye etkisi, sahada dondurulmuş spermaların yaygın olarak kullanılması sebebi ile çözüm sonu yöntemlerle değerlendirilmektedir. Kullanılan bu yöntemler boğaların potansiyel fertilitésinin in vitro spermanın muayenesi ile sığır endüstrisinde basit, doğru ve güvenilir faydalar sağlamaktadır (Gillan ve ark., 2008). Geçtiğimiz on yıl içerisinde fertilizasyon yeteneğinin değerlendirilmesinde motilite muayenesi, spermatolojik muayeneler arasında önemli bir yeri bulunmaktadır (Kathiravan ve ark., 2011).

Motilite, fertilizasyon yeteneği ile ilgili en önemli bir gösterge olduğuna inanılmaktadır (Kathiravan ve ark., 2011). Farell ve ark. (1998) taze spermada CASA motilite değerleri ortaya konan ve 59. gündeki geri dönmeme oranı göz önüne alınarak tespit edilen fertilizasyon sonuçları arasında yüksek bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde Januskauskas ve ark. (2000) 56. gündeki geri dönmeme oranı ile progresif motilite arasında bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Jeulin ve ark. (1996) swim up tekniği ile seçilen motil spermatozoa'daki ALH değerleri ile fertilizasyon arasında pozitif bir korelasyon olduğunu tespit etmiştir. Ibanescu ve ark. (2020) 24 boğanın 84 ejakulatı ile yaptıkları çalışmada, boğalardan alınan ejakulatlar dondurma öncesi, çözündürme sonrası 0. Saat ve 3. Saat (38 C°'de inkübe ederek) dilimlerinde CASA sistemi ile motilite muayenelerini yapmıştır. Boğaların 1 yıllık ilk tohumlama sonrası 56 günlük non-estrus return rate (NERR56, östrus göstermeme oranı) ile kinetik parametreler incelenmiştir. Bu analize göre, NERR56 ile dondurma öncesi High Velocity (Yüksek hız) ve Low Linearity (düşük doğrusallık) ile pozitif anlamda bir ilişki tespit edilirken total ve progresif motilite ile zaman dilimlerinin hiçbirinde (dondurma öncesi, çözüm sonu, çözüm sonu inkübasyon sonrası) bir ilişki bulunamamıştır. Yapılan başka bir çalışmada, dondurma çözündürme sonrası canlı ve motil spermatazoonların fazla, anormal spermatazoon oranının düşük olduğu boğa sperma numunelerinde swim up tekniği uygulandığında daha fazla motil popülasyonunun elde edildiği tespit edilmiştir (Gillan ve ark., 2008). Aynı çalışmada, yüksek subjektif motilite, VSL, morfolojik bütünlük, swim up yeteneği ve servikal mukusa bağlanma yeteneği fazla olan boğa spermalarının fertilizasyon yeteneklerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Gillan ve ark., 2008). Yapılan tez çalışmasında ise,

boğalar arasında istatistiki bir farklılık olmamasına rağmen en yüksek subjektif motilite $60,00 \pm 3,70$ ile Alta Defector, en düşük değer ise $51,50 \pm 1,27$ ile Alta Treasure boğasında tespit edildi. Hopkins ve Spitzer (1997)'ye göre boğa spermasının suni tohumlama uygulamalarında kullanılması için en az (en alt değer) %30 motiliteye sahip olması gerektiği bildirilerek %70 ve üzerindeki motilite sonucu çok iyi olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, ülkemizde yürürlükte olan Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın Suni Tohumlama, Tabii Tohumlama ve Embriyo Transferi Faaliyetleri Hakkındaki 08.12.2011 tarih ve 28136 sayılı yönetmeliğine göre ithalat ve üretimi yapılan cinsiyeti belirlenmemiş boğalarda asgari spermatolojik kalite testlerine göre normal sınırlar içerisinde bulunarak ithalatına izin verilmiştir. Motilite ve saha fertilite sonuçları Tablo 4.2'de incelendiğinde, tüm boğaların sperma ortalamalarına göre gebelik sonuçları ile bir ilişki saptanmamıştır ($p > 0,05$). Bireysel boğa spermaları değerlendirildiğinde yukarıdaki çalışmaları destekleyecek sonuçlar elde edilmiştir. Tablo 4.3 incelendiğinde, Alta Treasure adlı boğada motilite ile gebelik sonuçları arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Elde edilen bu korelasyon spermatozoonun dişi genital sistemde taşınması ve oosit penetrasyonunun sağlanması ile ilişkilendirilebilir. Çalışmanın sonuçlarını destekleyecek şekilde, subjektif motilite ile saha fertilite sonuçları ile ilişki tespit edilmesine rağmen (Rodriguez-Martinez, 2000); motilite değeri %50 ve üzeri bulunan sonuçları ile güçlü korelasyonların tespit edilemeyeceği (Stalhammar ve ark., 1994) farklı ırklarda belirtilmektedir (Amann, 1989).

Canlılık, akrozom durumu ve mitokondriyal aktivite gibi parametreler çeşitli floresan boyama teknikleri kullanılarak sperma örneklerinde kullanılmaktadır. Bu ölçümlerin hem in vitro inceleme hem de fertilite yeteneğini belirlemede önemli olduğunu belirten çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Pena ve ark., 1999; Al Naib ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda, floresan boyama ile incelenen spermatozoa canlılığı ve fertilite arasında ilişkinin olduğu belirtilmektedir (Juonala ve ark., 1999; Alm ve ark., 2001). Alm ve ark. (2001) fertilizasyon yeteneğinin tahmin edilmesinde spermatozoa canlılığının bilinmesi gerektiği belirtilmektedir. İnanc ve ark. (2018) ise progresif motilite, total motilite ve canlılık parametreleri ile geri dönmeme arasında pozitif bir korelasyon tespit etmiştir. Spermatozoanın orta bölümünde bulunan

mitokondri organeli erişilebilir enerji üreterek kuyruk liflerine enerji sağlamaktadır. Bu nedenle, mitokondri, spermatozoonun hem oosite ulaşmasını hem de zona pellusidaya nüfuz edebilmesi için etkili bir uyarıyı sağlamaktadır (O'Connell ve ark., 2002). İnanç ve ark (2018) dondurulmuş çözündürülmüş boğa spermasında en düşük motilite ve mitokondrial aktiviteyi benzer hayvanda tespit etmiştir. Bu sonuçlar mitokondriyal zarın potansiyel değişiklikleri, fizyolojik bozulmanın doğru bir işareti olabileceğini onaylamaktadır (Bucak ve ark., 2013). Akrozomal bütünlük, fertilizasyon için çok önemlidir. Akrozomal enzimler hücre dışına çıkıncaya kadar zona pellusida ile temas edinceye kadar hücre dışına çıkış yapmamaktadır. Bu nedenle, spermatozoonun zona pellusida'ya penetrasyonu salınan proteazların yardımı ile olabilir. (Rodriguez-Martinez ve ark., 1997). Başarılı bir dölleme, akrozomu sağlam spermatozoonun uygun şekilde akrozom reaksiyonunun uyarılması ve indüksiyonu ile gerçekleşmektedir. Motilite ve akrozom bütünlüğünün yapay sığır mukusunda veya servikal kanalda spermatozoa tarafından katedilen mesafe ile pozitif ilişkisi belirlenmiştir (Oura ve Toshimori, 1990; Anilkumar ve ark., 2001).

Bollwein ve ark. (2008) tarafından plazma membran bütünlüğünün (canlılık) yüksek mitokondrial membran ile çözüm sonrası 0. saatte korelasyon tespit edilmiştir. Sunulan tez çalışmasında canlılık ile MITOSOX + ile negatif korelasyon elde edilmiştir. Bu sonuç ile benzer ilişkiler tespit edilen çalışmada, dondurma çözündürme prosedürlerinden eşit şekilde belirtilen parametrelerin etkilendiği söylenebilir. Ayrıca, plazma membran bütünlüğü (canlılık) ile yüksek mitokondrial membran potansiyel değerlerinin 56 günlük NRR ile bir ilişkisinin olmadığı belirtilmiştir. Bunun sebebini ise, belirtilen parametrelerin sadece fertilizasyon için önemli olduğunu, embriyo gelişimi için önemli olmadığı belirtilmiştir (Watson, 1995). 60. gün gebelik ile canlılık ve MITOSOX + değerleri arasında ilişki tespit edilememesi bu yorumu desteklemektedir. Buradan yola çıkarak bu parametrelerin payette bulunan spermatozoon sayısı ile telafi edilebileceği belirtilmektedir (Evenson, 1999). Çalışmada, proven fertil hayvanların kullanılması ve ithalat kriterlerine göre minimum 5 milyon motil/payet konsantrasyona sahip olması bu sonuç ile paralellik göstermektedir. Gliozzi ve ark. (2017) yüksek ve düşük fertiliteye sahip boğalarda yaptığı çalışmada, total motilite ve CASA kinetik parametrelerinden STR, LIN, ACT

değerlerini yüksek fertiliteli boğalarda daha yüksek bulunmuştur. Aynı boğalarda flow sitometrik olarak canlılık, akrozom bütünlüğü, mitokondrial fonksiyon, lipit peroksidasyon seviyesi, DNA bütünlüğü incelenmiştir. Her iki grup arasında farklılık sadece canlılık ve DNA fragmentasyon indeksinde tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada, bireysel (tek test) spermatolojik parametrelerin fertilitenin tahmini ve ilişkisi açısından çok zayıf kaldığı; bunun yerine bu testlerin belirli bir model ile birleştirilerek değişkenliklerin ve fertilitelik farklılıklarının açıklanabileceği belirtilmektedir. Tez çalışmasına benzer şekilde BODIPY ile ölçüm yapılan lipit peroksidasyon seviyesinin canlı spermatozoa oranının artışı ile yükseldiğinin görülmesine karşın, yüksek ve düşük fertiliteli her iki grupta bir farklılık oluşturmamıştır. Çalışmamızda BODIPY ile yapılan lipit peroksidasyon analizinde bir farklılığın tespit edilememesi açısından çalışmayı destekler nitelikte olduğu düşünülmektedir. Düşük ve kontrollü seviyelerde reaktif oksijen türlerinin salınması, fertilizasyon sırasında spesifik olarak hiperaktivasyon, kapasitasyon akrozom reaksiyonu ve zona bağlantısı için gerekli olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Bailey ve ark., 2000). Fakat, spermanın çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olması, oksidatif stres hasarlarına karşı savunmasız hale getirerek infertiliteye sebep olmaktadır (Aitken ve ark., 2007). ROS üretimi ve antioksidanlar arasındaki denge, ROS sonucu oluşacak oksidatif stres ve zararlarının engellenmesi açısından önemlidir. Yapılan çalışmada, BODIPY ve MITOSOX ile ölçülen oksidatif stres parametreleri ve akrozom bütünlüğünün fertilizasyon ile aralarında anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir ($p>0,05$). Gliozzi ve ark. (2017) yaptığı çalışmada bulunan sonuçlara benzer şekilde fertilitelik ile ilgili bir ilişki tespit edilememiştir. Bunun yanı sıra, Sellem ve ark. (2015) canlı hücre popülasyonunda oksidasyon ile negatif korelasyon görülmesine rağmen; in vitro oksidasyonun hidrojen peroksit ile artırılması sonucu sperma hücrelerinin fertilitelik ile pozitif korelasyonu tespit edilmiştir (Sellem ve ark., 2015). Bu sonuçlar ise yukarıda bahsedildiği gibi oksidasyonun olumlu (pozitif) ve olumsuz (negatif) etkilerini göstermektedir. Hücre içi yüksek oksidasyon lipit yapısını bozarak hücre bütünlüğünde ve fertilizasyonda düşüklüğe sebep olur. Fakat, uygun sınırlar içerisinde olduğu takdirde kapasitasyon ve fertilizasyon yeteneğinde görev olarak pozitif ilişkiler görülmektedir. Çalışmamızda lipit peroksidasyon ile fertilitelik sonuçları arasında bir ilişkinin bulunmaması oksidasyonun normal sınırlar içerisinde

gerçekleşmesinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmaktadır. Bunun yanı sıra, tek spermatolojik parametrenin ile fertilizasyon ile ilişkinin tespitinin zor olmasına, çoklu regresyon analizlerinde birden fazla parametrenin toplu ilişkisi ile değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Spermatolojik parametreler kendi arasında değerlendirildiğinde Motilite ile PMAI ve Canlılık arasında pozitif; PMAI ile Canlılık ve BODIPY arasında pozitif, MITOSOX + ile negatif; MITOSOX+ ile canlılık ve BODIPY + arasında negatif; canlılık ve BODIPY + arasında pozitif korelasyon tespit edildi. Bucher ve ark. (2019) çoklu boyama şeklinde yüksek ve düşük fertiliteye sahip boğalarda yaptığı flow sitometrik analizlerde yüksek esteraz aktivitesi, plazma membran ve akrozom bütünlüğü ve yüksek mitokondrial aktivite ile fertilizasyon arasında bir ilişkinin bulunmadığını belirtmiştir. On sekiz parametrenin toplu olarak değerlendirilmesinde hücre içi düşük kalsiyum seviyesi ile plazma membran bütünlüğü ve mitokondrial membran potansiyelinin fertilizasyon ile pozitif ilişkisi bulunmuştur. Yapılan çalışmada, flow sitometrik analizlerin korelasyonları incelendiğinde, çalışmamızla benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Yüksek mitokondrial aktivasyonla birlikte plazma membran potansiyelinin canlılık, düşük hücre içi kalsiyum ve akrozom bütünlüğü ile pozitif korelasyonu tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise, plazma membranındaki yapısal değişiklikler ile mitokondrial membran potansiyeli arasında güçlü korelasyonun olduğu belirtilmektedir (Bollwein ve ark., 2008). Elde edilen bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen korelasyonlar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, mitokondrial membran potansiyelinin canlı sperma popülasyonu ile akrozom bütünlüğü olan hücre popülasyonu ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Yüksek mitokondrial membran potansiyelinin sağlam akrozomlu ve canlı popülasyondan oluştuğu söylenebilir. Mitokondrial membran potansiyelinin hücrenin fonksiyonları ve canlılığı için kritik görevleri olduğu yapılan çalışmalarda ayrıntılı olarak gösterilmektedir (Amaral ve ark., 2013; Zorova ve ark., 2018). Mitokondri, motilite (Paoli ve ark., 2011; Ferramosca ve ark., 2012) ve sperma metabolizmasının görevleri yanında memeli sperma hücrelerinde hücre içi apoptotik yolun major bileşenleri arasında gösterilmektedir (Hendricks ve Hansen 2009; Kim ve ark., 2013). Yapılan çalışmada mitokondrial aktivasyon analizi MITOSOX florokrom

boyası kullanılarak yapılmış ve boya alan hücre popülasyonunun (MITOSOX+) mitokondrial oksidatif stres olarak değerlendirilmiştir. Verilere göre MITOSOX+ ile canlılık arasında negatif korelasyon tespit edilmesi açısından araştırmacıların apoptozis ile ilgili düşüncesini desteklemektedir. Apoptozis planlı hücre ölümü olarak değerlendirilmektedir. Artan hücre ölümleri canlılığı etkileyeceği için negatif korelasyon görülmesi çalışmayı desteklediği düşünülmektedir. Ancak, yapılan çalışmada total oksidatif stres BODIPY florokrom boyasının SYBR 14 florokrom boyasının kombinasyonu ile boyanarak canlı popülasyon içerisindeki lipid peroksidasyon seviyesi tespit edilmiştir. BODIPY+/SYBR+ popülasyonun canlılık (SYBR 14 +) ile pozitif korelasyonda olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçta ise canlı popülasyon içerisindeki lipid peroksidasyonun tespit edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Fraser ve ark (2001) yaptığı bir çalışmada, farklı osmotik ortamlarda plazma membran bütünlüğüne göre, osmotik basıncın düşük (150 mOsm) ve yüksek (1120 mOsm) olduğu durumlarda PI boyasını daha fazla alarak boyandığı tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak ATP içeriğinin azalarak motilitenin düştüğü tespit edilmiştir (pozitif korelasyon). ATP içeriğinin dondurulmuş-çözdürülmüş ve taze boğa spermalarında progresif motilite ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Januskauskas ve Rodriguez-Martinez 1995). ATP üretiminin mitokondrilerde üretildiği göz önüne alındığında mitokondrial aktivasyon veya mitokondrial oksidatif stresin etkilendiğini desteklediği görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre hücreyi oluşturan organel ve yapıların birbirleri ile sıkı ilişkili şekilde metabolik aktiviteleri devam ettirdikleri görülmektedir. Bunun yanı sıra, tablo 4.4’de sunulduğu üzere boğalar arasında gebelik oranları açısından istatistik olarak bir fark tespit edilememiştir. Ata (2013) birinci laktasyondaki hayvanların ilkine tohumlamada ideal gebelik oranlarını (%) >65-60,1; yetişkin hayvanlar için ilkine tohumlama ideal gebelik oranlarını (%) 40-50 olarak belirtmiştir. Yapılan çalışmada belirtilen bu değerlere göre daha yüksek bir oran bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, in vitro spermatolojik parametreler ile saha gebelik sonuçları arasında anlamlı korelasyonlar tespit edilememiştir. Ancak tek bir boğada çözüm sonu motile sonuçları ile gebelik sonuçları arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Boğalar arasında motilite, canlılık ve BODIPY açısından boğalar arasında istatistiki bir fark tespit edilemezken ($p>0,05$); PMAI ve MITOSOX + parametreleri açısından boğalar arasında istatistiki farklılıklar tespit edildi ($p<0,05$). Gebelik oranları açısından boğa spermaları arasında istatistiki bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$). Ayrıca, spermatolojik parametreler kendi içinde değerlendirildiğinde pozitif ve negatif korelasyonlar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Elde edilen saha fertilitite sonuçları ile laboratuvarında incelenen spermatolojik parametrelerin korelasyonunda, bireysel parametrelerin ilişkilendirilmesi yanında, çoklu regresyon analizleri için birden fazla kombinasyonun oluşturularak fertilitite tahminine ve ilişkilendirilmesine gidilmesi gerekir. Bununla birlikte, yüksek ve düşük fertilititeye sahip boğalarda da ilişkilendirmeler ve korelasyonların yapılarak, boğalar arasında oluşan bu ilişki ve farklılıkların nasıl ve hangi yollarla ile oluştuğuna dair çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Anonim (2021). Dondurulmuş sperma ithalatı, raporlar. <https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Menu/34/Dondurulmus-Sperma-Ithalati> (Erişim Tarihi: 14.06.2021)

Anonim (2022a). AltaBERING boğa Katoloğu. <https://bullsearch.altagenetics.com/peru/BS/Bull/011HO11080> (Erişim Tarihi: 22.12.2022)

Anonim (2022b). AltaDEFECTOR boğa kataloğu. <https://bullsearch.altagenetics.com/turkey/BS/Bull/011HO11394> (Erişim Tarihi: 22.12.2022)

Anonim (2022c). AltaTREASURE boğa kataloğu. <https://bullsearch.altagenetics.com/turkey/BS/Bull/011HO10814> (Erişim Tarihi: 22.12.2022)

Anonim (2022d). FWS Boom boğa kataloğu. <http://www.dairybulls.com/search/sirepage/sireUSFrame2.asp?InterbullID=DEUM000354449388&Bre=HO&genbase=A> (Erişim Tarihi: 22.12.2022)

Anonim (2022e). NOG Josef <http://www.dairybulls.com/search/sirepage/sireUSFrame2.asp?InterbullID=DEUM000353896196&Bre=HO&genbase=A> (Erişim Tarihi: 22.12.2022)

Ak K (2008). Spermanın Muayenesi. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını Ders Notu No: 142, s: 75-91.

Aitken RJ, Wingate JK, De Iulii GN, McLaughlin EA (2007). Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol. Hum. Reprod.*, **13**(4), 203–211.

Al Naib A, Hanrahan JP, Lonergan P, Fair S (2011). In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology*, **76**, 161-167.

Alm K, Taponen J, Dahlbom M, Tuunainen E, Koskinen E, Andersson M (2001). A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology*, **56**, 677-684.

Amann RP (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. *J. Androl.*, **10**, 89-98.

Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reprod.*, **146**(5), R163–R174.

Anilkumar R, Devanathan TG, Pattabiraman SR, Edwin MJ (2001). Correlation between the spermatozoal characteristics and sperm penetration distance in polyacrylamide gel and bovine cervical mucus. *Theriogenology*, **55**, 685-691.

Ankel-Simons F, Cummins JM (1996). Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 13859–13863.

Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.*, **66**, 354-360.

Ata A (2013). Sütçü sığırlarda döl verimi ölçütlerinin güncel yorumu. *MAKÜ Sağ. Bil. Enst. Derg.* 1, 30-41.

Aydiner F (2008). *Sperm kriyoprezervasyonu sonrasında apoptozun değerlendirilmesi.* Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, **21**(1), 1–7.

Ball BA, Vo AT, Baumber J (2001). Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, **62**, 508-515.

Boe-Hansen GB, Christensen P, Vibjerg D, Nielsen MBF, Hedeboe AM (2008). Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*, **69**, 728-736.

Bollwein H, Fuchs I, Koess C (2008). Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, **43**, 189-195.

Broekhuijse MLWJ, Šoštarić E, Feitsma H, Gadella BM (2012). Relationship of flow cytometric sperm integrity assessments with boar fertility performance under optimized field conditions. *J. Anim. Sci.*, **90**, 4327-4336.

Bucak MN, Keskin N, Taşpınar M, Çoyan K, Başpınar N, Cenariu MC, Kurşunlu AN (2013). Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology*, **67**, 34-39.

Bucher K, Malama E, Siud M, Janett F, Bollwein H (2019). Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm: a tool for the evaluation of bull fertility. *J. Dairy Sci.*, **102**, 11652-11669.

Chalah T, Brillard JP (1998). Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology*, **50**, 487-493.

ChanSteven SY, Tsoi, WL, Leung J, Ng V, Lo T, Wang C (1990). The accuracy of sperm concentration determination by the automated CellSoft semen analyzer before and after discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Andrologia*, **22**, 55-61.

Chaveiro A, Santos P, Da Silva FM (2007). Assessment of sperm apoptosis in cryopreserved bull semen after swim-up treatment: a flow cytometric study. *Reprod. Domest. Anim.*, **42**, 17-21.

Chenoweth PJ, Hopkin FM, Spitzer JC, Larsen RE (1994). New guidelines for the evaluation of bulls for breeding soundness. *American association of bovine practitioners, Bovine proceedings*, **26**, 105-107.

Christensen P, Brockhoff PB, Lehn-Jensen H (1999). The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. *Reprod. Domest. Anim.*, **34**, 503-507.

De Castro LS, De Assis PM, Siqueira AF, Hamilton TR, Mendes CM, Losano JD, Assumpção ME (2016). Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 8213071.

Del Olmo E, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, Jiménez-Rabadán P, Iniesta-Cuerda M, Anel-Lopez L, Martínez-Pastor F, Soler AJ, Garde JJ and Fernández-Santos MR (2016). Estrous sheep serum enables in vitro capacitation of ram spermatozoa while preventing caspase activation. *Theriogenology*, **85**, 351–360.

Didion BA, Kasperson KM, Wixon RL, Evenson DP (2009). Boar fertility and sperm chromatin structure status: a retrospective report. *J. Androl.*, **30**, 655-660.

Evenson DP (1999). Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod. Fertil. Dev.*, **11**, 1–15.

Evenson DP (2017). Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Transl. Androl. Urol.*, **6**, S495.

Evenson DP (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, **169**, 56-75.

Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH (1998). Bilgisayar destekli sperm analizi (CASA) ile ölçülen boğa sperm özelliklerinin ölçümü ve doğurganlıkla ilişkisi. *Theriogenology*, **49**, 871-879.

Ferramosca A, Provenzano SP, Coppol L, Zara, V (2012). Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology*, **79(4)**, 809–814.

Foote RH (2003). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim. Reprod. Sci.*, **75**, 119-139.

Fraser L, Gorszczaruk K, Strzerek J (2001). Relationship Between Motility and Membrane Integrity of Boar Spermatozoa in Media Varying in Osmolality. *Reprod. Domest. Anim.*, **36(6)**, 325–329.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **57**, 1401-1406.

Gillan L, Evans G, Maxwell WMC (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, **63**, 445-457.

Gillan L, Kroetsch T, Maxwell WM, Evans G (2008). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, **103(3-4)**, 201–214.

Gliozzi TM, Turri F, Manes S, Cassinelli C, Pizzi F (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, **11**, 1975-1982.

Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA (2000). Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, **53**, 1691-1703.

Gürler H, Malama E, Heppelmann M, Calisici O, Leiding C, Kastelic JP, Bollwein H (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, **86**, 562-571.

Hallap T, Nagy S, Jaakma Ü, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H (2005). Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology*, **63**, 2311-2322.

Hendricks KE, Hansen PJ (2009). Can programmed cell death be induced in post-ejaculatory bull and stallion spermatozoa?. *Theriogenology*, **71(7)**, 1138–1146.

Ho HC, Wey S (2007). Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microscopy Research and Technique*, **70**, 719–723.

Holt W, Watson P, Curry M, Holt C (1994). Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil. Steril.*, **62**, 1277-1282.

Hopkins FM, Spitzer JC (1997). The new Society for Theriogenology breeding soundness evaluation system. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.*, **13(2)**, 283–293.

Ibanescu I, Siuda, M, Bollwein H (2020). Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches-associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, **215**, 106329.

İnanç ME, Güngör Ş, Ata A (2017). Spermatozoa Motilitesinin Değerlendirilmesinde Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sisteminin Kullanımı. *Türkiye Klinikleri J. Vet. Sci. Dölerme ve Suni Tohumlama Özel Sayısı*, **3**, 73-78.

İnanç ME, Cil B, Tekin K, Alemdar H, Daşkın A (2018). The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, **42**, 452-458.

İnanç ME, Güzel FN, Güngör Ş, Herdoğan M, Mart FN, Kahraman D, Çay HA (2022). The interaction between seminal plasma biochemical constituents and short-term semen preservation in Honamli and Hair goats. *Reprod. Dom. Anim.* DOI: 10.1111/rda.14297

Januskauskas A, Johannisson A, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H (2000). Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*, **53**, 859-875.

Januskauskas A, Rodriguez-Martinez H (1995). Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta. Vet. Scand.*, **36(4)**, 571–574.

Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, **60**, 743-758.

Jeulin C, Lewin LM, Chevrier C, Schoevaert-Brossault D (1996). Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer-aided image analysis. *Cell motil. cytoskeleton.*, **35**, 147-161.

Juonala T, Salonen E, Nurttala T, Andersson M (1999). Three fluorescence methods for assessing boar sperm viability. *Reprod. Domest. Anim.*, **34**, 83-87.

Kalyanaraman B, Darley-USmar V, Davies K J, Dennery P A, Forman H J, Grisham MB, Ischiropoulos H (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, 1-6.

Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C (2008). Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, **104**, 9-17.

Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system—a review. *Reprod. Domest. Anim.*, **46**, 165-172.

Kim HH, Funaro M, Mazel, Goldstein SM, Schlegel PN, Paduch DA (2013). Flow cytometric characterization of apoptosis and chromatin damage in spermatozoa *Reprod. Biomed. Online*, **26(4)**, 393–395.

Kerns K, Zigo M, Drobnis EZ, Sutovsky M, Sutovsky P (2018). Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nat. Commun.*, **9**, 1-10.

Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 3199-3207.

Korkmaz F, Malama E, Siuda M, Leiding C, Bollwein H (2017). Effects of sodium pyruvate on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity of cryopreserved bovine sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, **185**, 18-27.

Korkmaz F, Çil B (2020). Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı. *Ataturk Univ. Vet. Bilim. Derg.*, **15**, 76-83.

Kumeresan A., Johannisson A., Al-Essawe EM., Morrell JM (2017). Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above-and below-average fertility bulls. *J. Dairy Sci.* **100**, 5824-5836

Malama E, Zeron Y, Janett F, Siuda M, Roth Z, Bollwein H (2017). Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology*, **87**, 79-90.

Malo, AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ER (2006). Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.*, **2**, 246-249.

Nagy Á, Polichronopoulos T, Gáspárdy A, Solti L, Cseh S (2015). Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Vet. Hung.*, **63**, 370-381.

O'Connell M, McClure N, Lewis SEM (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.*, **17**, 704-709.

Oura C, Toshimori K (1990). Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int. Rev. Cytol.*, **122**, 105-151.

Lindemann CB, Lesich KA (2016). Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton*, **73**, 652–669

Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Baldi E, Francavilla S, Lenzi A, Lombardo F, Gandini L (2011). Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil. Steril.*, **95**, 2315-2319.

Pena A, Johannisson A (1999). Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, **52**, 965-980.

Petrunkina AM, Waberski D, Gunzel-Apel AR, Topfer-Petersen E (2007). Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reprod.*, **134**, 3-17.

Robayo I, Montenegro V, Valdes C, Cox JF (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reprod. Domest. Anim.*, **43**, 393-399.

Rodriguez-Martinez, H (2000). *Evaluation of Frozen Semen: Traditional and New Approaches*. In: Chenoweth PJ. (Eds.), *Topics in Bull Fertility*. International Veterinary Information Service.

Rodriguez-Martinez H (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod. Domest. Anim.*, **38**, 312-318.

Rodriguez-Martinez H (2006). Can we increase the estimative value of semen assessment. *Reprod. Domest. Anim.*, **41**, 2-10.

Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Zhang BR, Soderquist L (1997). In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J. Reprod. Dev.*, **43**, 1-11.

Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L and Koenen EPC (2015). Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* **84**, 1447–1454.

Sharma R, Masaki J, Agarwal A (2013). Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. In *Spermatogenesis*, p: 121-136.

Sivakumar R, Rajasingam SJ (2013). The Hypo-osmotic Swelling Test for evaluation of sperm embrane integrity. *Methods Mol. Biol.*, **927**, 21-25.

Stalhammar EM, Janson L, Philipsson J (1994). The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls. *Reprod. Nutr. Dev.*, **34**, 37-45.

Sönmez M (2022). Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları, s: 237-269; 262-263.

Thundathil J, Gil J, Januskauskas A, Larsson B, Söderquist L, Mapletoft R, Rodríguez-Martínez H (1999). Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int. J. Androl.*, **22**, 366–373.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, **57**, 149-179.

Waterhouse KE, Haugan T, Kommisrud E, Tverdal A, Flatberg G, Farstad W, De Angelis PM (2006). Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod. Fertil. Dev.*, **18**, 781-788.

Watson PF (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**, 871–891.

Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva AV, Juhaszova M, Sollott SJ, Zorov DB (2018). Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.*, **552**, 50-59.

