



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
REPRODÜKSİYON VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
VST-D-2015-0001

**SICAK STRESİNİN KOÇLARDA İN-VİTRO
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Niyazi KÜÇÜK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Melih AKSOY

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
REPRODÜKSİYON VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
VST-D-2015-0001

SICAK STRESİNİN KOÇLARDA İN-VİTRO
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ
DOKTORA TEZİ

Niyazi KÜÇÜK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Melih AKSOY

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Arş. Gör. Niyazi KÜÇÜK tarafından hazırlanan “**Sıcak Stresinin Koçlarda in-vitro spermatolojik parametreler üzerine etkisi**” başlıklı tez 15.06.2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1. Prof. Dr. Melih AKSOY

Adnan Menderes Üniversitesi

2. Prof. Dr. Hayrettin ÇETİN

Adnan Menderes Üniversitesi

3. Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Adnan Menderes Üniversitesi

4. Prof. Dr. Zekariya NUR

Uludağ Üniversitesi

5. Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA

Uludağ Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi Enstitü Yönetim Kurulunun
..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Gün geçtikçe artan insan nüfusu, sanayileşme ve fosil yakıt tüketimindeki artış, atmosferdeki sera gazlarının oranının artmasına ve küresel ısınmaya neden olmaktadır. Küresel ısınma, sera etkisinin artması ve buzulların erimesiyle şiddetlenerek devam etmektedir. Bu durum, bilim insanlarını küresel ısınmanın önlenmesine ve küresel ısınmanın canlılar üzerindeki etkilerinin incelenmesine yöneltmiştir.

Kuzey yarım kürede yer alan ülkemizin Aydın ilini de içinde barındıran güney batı, güney ve güney doğu kısımlarında yaz ayları oldukça sıcak geçmektedir. Bu nedenle Aydın ili sıcak stresinin canlılar üzerindeki olası etkilerinin incelenmesi için oldukça uygun koşullar sunmaktadır. Yazların oldukça sıcak geçtiği bölgeler, doğal yaşam alanlarında canlıların sıcak stresinden nasıl etkilendiğinin gözlenmesine olanak sağlarlar. Bu bölgeler küresel ısınmaya bağlı olarak olası sıcaklık artışlarının canlılar üzerinde oluşturacağı etkiler hakkında bilim insanlarına önemli bilgiler sunmak üzere tasarlanmış bir laboratuvar ortamı olarak düşünülebilirler.

Sıcak stresinin reproduksiyon üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların büyük bir çoğunluğu laboratuvar ortamında deney hayvanlarının yapay olarak sıcak stresine maruz bırakılmasına dayanmaktadır. Canlıların doğal ortamlarında maruz kaldığı çevresel sıcak stresi bizlere daha doğru, daha objektif bilgiler sağlayabilir. Sıcak stresinin erkek çiftlik hayvanları üzerine olası etkilerini inceleyen çalışmaların büyük bir çoğunluğu testis dokusunun çeşitli izolasyon malzemeleri ile sarılarak ısısının arttırılmasına dayanmaktadır. Ayrıca sıcak stresinin çiftlik hayvanları üzerine etkisini inceleyen çalışmaların sayısı deney hayvanlarına oranla daha az ve değerlendirilen parametreler yönünden daha yetersizdir.

Bu bilgiler ışığında, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimince desteklenen bu çalışma, Sıcak stresinin koçlarda in-vitro spermatolojik parametreler üzerine etkisini araştırmak ve yukarıda bahsedildiği üzere var olan bilimsel eksiklikler yönünden mevcut bilimsel altyapıya katkıda bulunmayı amaçlamaktadır.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	v
RESİMLER.....	vii
ŞEKİLLER.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sıcak Stresi ve Üreme.....	1
1.1.1. Sıcak Stresinin Uyarılması.....	2
1.1.2. Sıcak Stresinin Erkeklerdeki Etki Mekanizması.....	2
1.1.3. Sıcak Stresinin Spermatozoon Hacmi, Yoğunluğu, Motilitesi ve Anormal Spermatozoon Oranları Üzerine Etkileri.....	3
1.1.4. Sıcak Stresinin Spermatozoonların DNA Bütünlüğü Üzerine Etkileri.....	5
1.1.5. Sıcak Stresinin Spermatozoonların Fertilizasyon Kabiliyeti ve Bu Spermatozoonlardan Elde Edilen Embriyolar Üzerine Etkileri.....	6
1.1.6. Sıcak Stresinin Apoptozis ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri.....	7
1.1.7. Sıcak Stresine Karşı Savunma Sistemleri.....	9
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
2.1. Hayvan Materyali.....	11
2.2. Çevresel Sıcaklık ve Nem Değerlerine Göre Sıcak Stresi ve Kontrol Dönemlerinin Belirlenmesi.....	12
2.3. Spermanın Alınması.....	12
2.4. Spermaların Muhafazası, Hacim ve Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	13
2.5. Motilite Muayenesi	14
2.6. Ölü Canlı Muayenesi.....	14
2.7. Morfolojik Muayene	15
2.8. Spermatozoonların Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi	16
2.9. Spermatozoonlarda Akrozom Reaksiyonunun Uyarılması.....	18
2.10. Spermatozoonlarda DNA Hasarlarının Belirlenmesi.....	19

2.11. İstatistik Analiz.....	22
3. BULGULAR.....	23
3.1. Aylık Verilerin Ortalamaları.....	23
3.2. Sonuçlar.....	26
4. TARTIŞMA.....	30
5. SONUÇ.....	33
ÖZET.....	34
SUMMARY.....	35
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ.....	42
TEŞEKKÜR.....	43

KISALTMALAR VE SİMGELER

ACTH:	Adrenokortikotropik Hormon
DAPI:	40,6-Diamidino-2-Phenyindole, Dilactate
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA:	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
H ₂ O ₂ :	Hidrojen Peroksit
HCL:	Hidroklorik Asit
HSP:	Sıcak Şoku Proteini (Heat Shock Protein)
KH ₂ PO ₄ :	Potasyum Hidrojen Fosfat
L:	Litre
LH:	Luteinleştirici Hormon
LMA:	Low Melting Agar
LPC:	Lysophosphatidylcholine
M:	Molar
µl:	Mikrolitre
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik Asit
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O:	Di-Sodyum Hidrojen Fosfat Di-Hidrat
Na ₂ HPO ₄ :	Sodyum Hidrojen Fosfat
NaCL:	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄ :	Sodyum Di-Hidrojen Fosfat

NMA:	Normal Melting Agar
NO [•] :	Nitrik Oksit
O ₂ ^{•-} :	Süper-Oksit Anyon
OH [•] :	Hidroksil
P:	Olasılık Değer
RNA:	Ribonükleik Asit
ROS:	Reaktif Oksijen Türevleri (Reactive Oxygen Species)
RT-PCR:	Real Time Polymerase Chain Reaction
°C:	Santigrad Derece
SEM:	Ortalamanın Standart Hatası (Standart Error of Mean)
TCG:	Tris Sitrik Asit Glikoz (Tris Citric acid Glucose)
v/v:	Hacim/Hacim (Volume/Volume)
w/v:	Ağırlık/Hacim (Weight/Volume)
%:	Yüzde Değer

RESİMLER

	SAYFA NO
Resim 2.1. Çalışmada kullanılan koçlar ve barınak.	11
Resim 2.2. Proje süresince koçlardan sperma almak için kullanılan elektro-ejakülatör.	13
Resim 2.3. Işık mikroskobu altında eosin-nigrosin boyama yöntemiyle canlı (a) ve ölü (b) spermatozoonların görünümü.	14
Resim 2.4. Diferansiyel interferans contrast mikroskobu altında spermatozoonlarda görülen bazı morfolojik bozuklukların görünümü.	16
Resim 2.5. Işık mikroskobu altında HE-test sonrası farklı tiplerdeki spermatozoonların görünümü.	17
Resim 2.6. Işık mikroskobu altında a) Akrozom reaksiyonu geçirmiş ve b) Akrozom reaksiyonu geçirmemiş spermatozoonların görünümü.	19
Resim 2.7. Elektroforez işleminde kullanılan elektroforez sistemi.	20
Resim 2.8. DNA hasarlı spermatoozonların a) Floresan mikroskopta b) Image J software 32 bit çözünürlükte c) Image J software 5 aşamalı görüntüleme sistemindeki görüntüleri. DNA hasarı olmayan spermatozoonların d) Floresan mikroskopta e) Image J software 32 bit çözünürlükte f) Image J software 5 aşamalı görüntüleme sistemindeki görünümü.	21

ŞEKİLLER

SAYFA NO

Şekil 3.1. Koçlara ait bazı spermatolojik parametrelerin yıl boyu aylık değişimleri (mean±SEM).	23
Şekil 3.2. Koçlara ait bazı spermatolojik parametrelerin ve hissedilen sıcaklık değerlerinin yıl boyu aylık ortalamaları (mean±SEM).	24
Şekil 3.3. Koçlara ait örneklerde akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranlarının yıl boyu aylık ortalamaları (mean±SEM).	25
Şekil 3.4. Kontrol ve sıcak stresi dönemlerinde sperma hacimlerinin karşılaştırılması ($P>0,05$).	26
Şekil 3.5. Kontrol ve sıcak stresi dönemlerinde spermatozoon yoğunluklarının karşılaştırılması. * $P<0,05$	26
Şekil 3.6. Bazı spermatolojik parametreler yönünden sıcak stresi ve kontrol dönemlerinin karşılaştırılması. * $P<0,05$.	28
Şekil 3.7. Taze spermada kendiliğinden, TCG solüsyonu içerisinde 1 saat inkubasyon sonrası 0. dakikada, inkubasyon sonrası akrozom reaksiyonunu uyarmak için LPC molekülünün ilavesi sonrası 20, 40 ve 60. dakikada akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları ($P>0,05$).	29

1. GİRİŞ

Stres bir canlının çevre koşulları ile baş edebilme kabiliyetini yitirmesi olarak tanımlanabilir (Dobson ve Smith 2000). Canlılar çok farklı stres etkenlerine maruz kalabilirler. Bu etkenler, fiziksel (egzersiz, transport), immünolojik (hastalık, toksin uygulamaları), psikolojik (izolasyon, insan-hayvan etkileşimleri) ve çevresel (sıcak, soğuk) şeklinde sınıflandırılabilir. Farklı stres etkenleri farklı etkiler oluşturabilir. Stresin canlıda oluşturduğu etki, stresin süresine göre farklılıklar gösterir. Strese verilen cevap türler arasında farklılık gösterdiği gibi farklı cinsiyetlerin de strese verdiği cevap farklı olabilmektedir (Tilbrook ve ark 2000).

Birçok türde stres, glikokortikoid bir hormon olan kortizolün salınımını uyarmaktadır. Stres hipotalamo-hipofizer-adrenal aksı uyarak, kortikotropin salgılatıcı hormon salgılanmasına neden olur. Buna bağlı olarak ön hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgısı uyarılır (Engler ve ark 1989). ACTH adrenal bezden glikokortikoidlerin salgısını uyarır. Stresle salınan katekolaminler ve glikokortikoidler stresin etkilerini hafifletmeye çalışırlar. Kronik veya uzun süreli stres gonadotropin salgısını baskılayarak, üremeyi kısıtlar. Geçici ve kısa süreli stresin üreme üzerine etkisi çok belirgin değildir (Tilbrook ve ark 2000).

1.1. Sıcak Stresi ve Üreme

Bir canlının, kendisi için fizyolojik olan değerlerin üzerinde sıcaklığa maruz kalması sonucu o canlıda şekillenen stres reaksiyonlarının tamamına sıcak stresi denir. Sıcak stresinin canlıların yaşam kalitesini düşürmekten başlayarak ölüme kadar varabilen çok geniş sonuçları olabilmektedir. Sıcak stresinin fertilite üzerine olan etkileri insan (Mieusset ve ark 1987), fare (Jannes ve ark 1998), rat (Setchell ve ark 1988), boğa (Karabinus ve ark 1997) ve koçlarda (Al-Ghetaa 2012) rapor edilmiştir. Genel hatlarıyla sıcak stresi dişilerde LH ve östrojen salgısını düşürebilir, foliküler sıvıdaki östrojen miktarını ve folliküldeki LH reseptör sayısını azaltabilir. Bu duruma bağlı olarak dişilerde oosit ve folikülün gelişimi ve fonksiyonu bozulabilir, ovulasyonda gecikmeler şekillenebilir (Hansen 2009). Sıcak stresinin boğalarda, LH salgısında geçici bir düşüşe neden olurken testosteron salgısında değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir (Minton ve ark 1981). Erkeklerde sıcak stresinin

asıl etkisini testis içerisinde spermatogeneziste aksamalara yol açarak oluşturduğu düşünülmektedir (Hansen 2009).

1.1.1. Sıcak Stresinin Uyarılması

Sıcak stresinin testisler üzerindeki etkilerini incelemek için araştırmacılar çok farklı teknikler kullanmışlardır. Bu teknikler şu şekilde sıralanabilir: 1) Canlının bulunduğu ortamın sıcaklığının arttırılmasıyla canlının devamlı veya aralıklı olarak sıcak stresine maruz bırakılması (Meyerhoefer ve ark 1985, Nichi ve ark 2006), 2) Testislerin izolasyon malzemeleri ile sarılmasıyla ya da testislerin sıcak su banyosunda tutulmasıyla bölgesel olarak sıcak stresinin uyarılması (Banks ve ark 2005, Arman ve ark 2006), 3) Cerrahi yöntemle tek veya her iki testisin vücut içerisine alınması (indüklenmiş kriptorşidizm) ile sıcak stresinin uyarılması (Yin ve ark 1997, Zhang ve ark 2002), 4) Testislerin mikro dalga radyasyonuna maruz bırakılması ile sıcak stresinin uyarılmasıdır (Sounders ve Kowalczyk 1981, Kowalczyk ve ark 1983). Ancak, bahsedilen son yöntemde skrotal deride hasar olduğu ve etkinin sadece testis sıcaklığının artmasına bağlı olmayabileceği, hasarlanan skrotal derinin testisleri soğuk tutma fonksiyonunu yitirmesinin de etkisi olabileceği düşünülmektedir (Setchell 2006).

1.1.2. Sıcak Stresinin Erkeklerdeki Etki Mekanizması

Memelilerde, testisler genel olarak vücut sıcaklığından 2-8 derece daha düşük sıcaklıkta muhafaza edilirler ve bu durum spermatogenezis için gereklidir (Banks ve ark 2005). Yüksek çevre sıcaklığında testis dokusunda hipoksik bir ortam oluşur (Barth ve Bowman 1994). Yüksek çevre sıcaklığına bağlı olarak testis dokusunun sıcaklığı, metabolik aktivitesi ve oksijen ihtiyacı artar. Bölgeye bu ihtiyacı karşılamaya yeterli kan dolaşımı sağlanamadığı için testis dokusu hipoksik bir hal alır (Waites ve Setchell 1964).

Hipoksi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde genel bir artışa yol açar (Zini ve ark 1998, Filho ve ark 2004). Reaktif oksijen türleri serbest oksijen radikalleridir. Buna örnek olarak bir veya daha fazla serbest elektron içeren atom ve moleküller gösterilebilir (Halliwell 1991). Reaktif oksijen türlerinin en önemlileri hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$), süper-oksit anyon ($\text{O}_2^\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksittir ($\text{NO}^\cdot$). Öncü olarak kabul edilenler süper oksit anyon ve hidrojen peroksittir. Diğer moleküller reaktif oksijen

türlerinin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyon formlarıdır (Halliwell ve Guttridge 1989).

Reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması oksidatif stresin başlıca nedenidir. Oksidatif stres; DNA, proteinler, yağlar, karbonhidratlar ve biyomoleküller üzerinde yapısal hasara yol açar. Bunun sonucunda testis dokusu ve spermatozoonlar hasar görür, spermatogeneziste aksamalar oluşur. İnsanlarda ve hayvanlarda reaktif oksijen türleri, gerek yaşlanma olgusu ve gerekse kanser etiyolojisine girmek dışında önemli bir infertilite sebebi olarak da belirlenmiştir (Iwasaki ve Gagnon 1992, Pasqualotto ve ark 2001).

Reaktif oksijen türlerinin düşük ve kontrol edilebilir miktarlarının spermatozoon fizyolojisinde önemli rol oynadığı; ancak, bu radikallerin yüksek miktarlarının spermatozoonlara zarar verebildiği ve fertilite problemlerine yol açabildiği bilinmektedir (Lamirande ve ark 1997).

Reaktif oksijen türlerinin artışıyla kendini gösteren oksidatif stres spermatogenezis sürecindeki hücreleri etkileyen, apoptozise ve DNA kırıklarına yol açan ana sebeptir (Hansen 2009). Ayrıca, sıcak stresini takiben, epididimisin spermatozoonları canlılıklarını sürdürecektir şekilde saklama yeteneğini kaybettiği ve en çok etkilenen kısmının kauda epididimis olduğu bildirilmiştir (Bedford 1991). Aynı zamanda, bazı çalışmalar sıcak stresinin sertoli hücrelerine (Zhang ve ark 2002) ve seminifer tubullerin etrafını dolduran dokuya zarar verdiğine işaret etmektedir (Kanwar ve ark 1974).

Sıcak stresine en duyarlı hücrelerin spermatositler ve erken spermatidler olduğu (Setchell 2006), sıcak stresi ortadan kalktıktan sonra testis dokusunun fonksiyonlarının kademeli olarak bir veya iki spermatogenezis siklusu geçtikten sonra normale döndüğü bilinmektedir.

1.1.3. Sıcak Stresinin Spermatozoon Hacmi, Yoğunluğu, Motilitesi ve Anormal Spermatozoon Oranları Üzerine Etkileri

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, sıcak stresi uygulamasından 3 hafta sonra kontrol ve sıcak stresi grupları arasında vücut ağırlığı açısından herhangi bir fark oluşmaksızın sıcak stresi uygulanan farelerin testis ağırlığının, spermatozoon

yoğunluğunun ve motilitesinin düştüğü belirlenmiştir. Bu düşüşe sıcak stresine bağlı olarak spermatogenezde şekillenen aksamaların neden olduğu bildirilmiştir (Jannes ve ark 1998).

Brezilya’da yapılan bir araştırmada yaz aylarında boğa ejakülatlarındaki anormal spermatozoon oranının kış aylarına oranla daha yüksek olmasına rağmen motilite yönünden yaz ve kış ayları arasında belirgin bir fark olmadığı belirtilmiştir (Nichi ve ark 2006). On beş gün süreyle 35°C de tutulan boğaların motil ve canlı spermatozoon oranlarının kontrol grubu boğalarına göre daha düşük olduğu ancak spermatozoon yoğunluğu ve hacmi yönünden bir fark oluşmadığı bildirilmiştir (Minton ve ark 1981).

Boğaların 8 hafta boyunca günde 8 saat süresince 35°C de ve 16 saat süresince 31°C de barındırıldığı bir çalışmada uygulamanın ilk 6 haftasında sperma hacminin düştüğü, sıcak stresine 2 hafta maruz kaldıktan sonra, motil spermatozoon oranının da düşme eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Motil spermatazoon oranının iki hafta geç düşmesinin spermatozoonların epididimiste taşınmasının yaklaşık 2 hafta sürmesinden ve bu süre zarfında epididimiste bulunan spermatozoonların sıcak stresinden etkilenmemesinden kaynaklanabileceği ya da epididimal ortamın değişmesi için daha uzun süre sıcak stresi uygulamasının gerekli olabileceği ifade edilmiştir. Aynı çalışmada sıcak stresi uygulanan grubun ejakülatlarında anormal spermatozoon oranlarının daha yüksek olduğu, sıcak stresi uygulamasına son verildikten 8 hafta sonra boğaların sıcak stresi uygulamasından önceki spermatolojik değerlerine döndükleri ifade edilmiştir (Meyerhoefer ve ark 1985).

Koçların testislerine bölgesel olarak sıcak stresinin uygulandığı bir çalışmada (günde 16 saat 21 gün boyunca) sıcak stresi grubunun kontrol grubuna göre daha düşük motiliteye sahip olduğu ancak spermatozoon yoğunluğu yönünden istatistiksel bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (Arman ve ark 2006). Hem koçların testislerine bölgesel olarak sıcak stresinin uygulandığı, hem de koçların bulunduğu ortamın ısıtıldığı grupları içinde barındıran bir çalışmada ise, kontrol grubu ile sıcak stresi uygulanan gruplar arasında spermatozoon hacmi ve motilite yönünden bir fark oluşmazken, sıcak stresi uygulanan gruplarda spermatozoon yoğunluğunun düştüğü ve anormal spermatozoon oranının arttığı bildirilmiştir (Saab ve ark 2011). Yazların oldukça sıcak geçtiği bir bölgede yapılan bir

çalışmada, yaz aylarında sıcak stresine bağlı olarak koçlarda ölü ve anormal spermatozoon oranlarının arttığı belirtilmiştir (Al- Ghetaa 2012).

1.1.4. Sıcak Stresinin Spermatozoonların DNA Bütünlüğü Üzerine Etkileri

Spermatogenezis, spermatogonialardan olgun spermatozoon oluşumuna kadar içerisinde çoğalma ve farklılaşma basamaklarını barındıran karmaşık çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreçte DNA “somatik hücre-histon kompleksi” halinden sıkıca paketlenmiş “sperm-protamin kompleksi” haline geçer. Olgun spermatozoonların amacı erkek genetik materyalini dişi üreme hücresine taşımaktır. Bu yüzden spermatozoon DNA’sının bütünlüğü bozulmadan dişi üreme hücresine ulaştırılması oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar sıcak stresinin spermatozoon DNA bütünlüğünü bozabileceğini göstermiştir (Banks ve ark 2005, Paul ve ark 2008, Perez-Crespo ve ark 2008).

Banks ve ark (2005)’nın farelerin testislerini 42°C deki su banyosunda 30 dakika süreyle ısıttıkları çalışmalarında, sıcak stresinin testiste henüz gelişmekte olan germ hücrelerinin ve epididimiste bulunan olgun spermatozoonların DNA bütünlüğü üzerine etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Bu doğrultuda sıcak stresine maruz bıraktıkları farelerden sıcak stresi uygulamasından sonraki 1-24. saatler arasında ve 7-32. günler arasında aldıkları spermatozoonların DNA bütünlüklerini comet ve sperm chromatin structure assay (SCSA) yöntemlerini kullanarak değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar sıcak stresi uygulandığı anda epididimiste bulunan olgun spermatozoonların DNA bütünlüğünün bozulduğunu ve testiste bulunan gelişmekte olan germ hücrelerinin bazılarının apoptozis yolu ile elimine edildiğini, bazılarının ise DNA hasarlı motil spermatozoonlar olarak gelişimlerini tamamladıklarını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, hücrede DNA hasarının sıcak stresi uygulandığı anda şekillendiği ve spermatogenezis boyunca düzeltilemediği, sıcak stresine bağlı olarak testis fizyolojisinin bozulduğu ve germ hücre gelişimi için gerekli olan uygun koşulların sağlanamadığı ve bunun sonucunda DNA bütünlüğü kaybolmuş spermatozoonların üretildiği epididimisin olgun spermatozoonların DNA bütünlüğünü koruyamadığı ve bunda muhtemelen bozulan epididimis koşullarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Banks ve ark 2005).

Paul ve ark (2008) yaptıkları çalışmada benzer sıcaklıklarda benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Ancak 38°C de 30 dakika sıcak stresi uygulanan grupta istatistiksel bir fark oluşturacak kadar DNA hasarı şekillenmediğini bildirmişlerdir.

1.1.5. Sıcak Stresinin Spermatozoonların Fertilizasyon Kabiliyeti ve Bu Spermatozoonlardan Elde Edilen Embriyolar Üzerine Etkileri

Spermatozoonların fertilizasyon kabiliyeti birçok farklı spermatolojik parametre tarafından belirlenmektedir. Progresif motiliteye sahip, morfolojik bir bozukluğu olmayan, membran bütünlüğü olan ve doğru zamanda akrozom reaksiyonuna girebilen spermatozoonların fertilizasyon kabiliyetinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Esas görevi erkek genetik materyalini dışı üreme hücresine taşımak olan spermatozoonun taşıdığı genetik materyalin bütünlüğü de gebeliğin oluşmasında ve devamında kritik öneme sahiptir.

Jannes ve ark (1998) erkek fareleri 42°C de 20 dakika süresince sıcak stresine maruz bıraktıkları çalışmada, stres uygulamasından 3 hafta sonra erkek farelerle sağlıklı dişi fareleri çiftleştirerek sıcak stresinin gebelik oranı ve embriyo gelişimi üzerine etkilerini in vivo olarak değerlendirmişlerdir. Deneyin ikinci aşamasında ise, sıcak stresi uygulamasından 28 gün sonra erkek fareleri öldürerek bu farelerin testis ağırlıklarını, spermatozoon yoğunluklarını, motilitelerini ve in-vitro fertilizasyon yöntemini kullanarak bu farelerden aldıkları spermatozoonların fertilizasyon kabiliyetlerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda sıcak stresi uygulanan farelerin testis ağırlıklarının, spermatozoon yoğunluklarının ve motilitelerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bu düşüşün spermatogeneziste oluşan aksaklıklar ve düşen spermatozoon yoğunluğuna bağlı şekillendiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca, sıcak stresi uygulanan farelerden elde edilen spermatozoonların in vitro fertilizasyon yeteneklerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, sıcak stresine maruz bırakılan grubun gebelik oranının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, rezorpsiyon yönünden iki grup arasında belirgin bir farka rastlanmadığı ve sıcak stresine maruz bırakılan erkeklerle elde edilen gebeliklerin 14. gününde embriyo ağırlığının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmada in vitro fertilizasyon ve in vivo gebelik oranlarındaki düşüklüğün sebebi olarak sıcak stresi nedeniyle kalitesi düşen spermatozoonlar gösterilmektedir. Sıcak stresine bağlı olarak germ hücrelerinde DNA sentezinin bozulmasının yanı sıra protamin paketlenmesindeki hataların fertilizasyon aşamasında protaminlerin yeniden yapılandırılmasında hatalara yol açabileceği, bu durumun fertilizasyondan sonra embriyonik gelişmedeki gecikmelerin ve düşük embriyo ağırlığının nedeni olabileceği belirtilmiştir.

Zhu ve ark (2004) yürüttükleri bir çalışmada erkek fareleri 36°C de 24 saat boyunca tutarak sıcak stresine maruz bıraktıktan sonra, bu fareleri 7, 21 ve 35 gün sonra dişi farelerle çiftleştirmişlerdir. Çiftleşen dişilerden embriyoları 14-16. 34-39. veya 61-65. saatlerde oviduktdan ya da 85-90. saatlerde uterustan toplamışlar ve embriyoların gelişimlerini morfolojik olarak değerlendirmişlerdir. Çiftleşmeden 7 gün önce sıcak stresi uygulanan grup ile kontrol grubu arasında, çiftleşme sonrası 14-16. ve 34-39. saatlerde zigot ve iki hücreli embriyo aşamasına ulaşma oranlarında herhangi bir farklılığa rastlamamışlardır. Bununla birlikte, 61-65. saatlerde toplanan embriyolarda sıcak stresi uygulanan grupta 4 hücreli, morula aşamasına ulaşan ve 85-90. saatlerde de zona pellucida'dan çıkabilen blastosist evresindeki embriyo sayısında belirgin bir düşme belirlemişlerdir. Ayrıca, çalışmada çiftleşmeden 21 gün önce uygulanan paternal sıcak stresinin 2-hücreli, 4-hücreli ve morula aşamasına ulaşan embriyo oranını düşürdüğü ve embriyoların blastosist aşamasına ulaşmasının engellendiği, zigot aşamasında embriyo sayısının ve anormal embriyo sayısının arttığı ifade edilmiştir. Embriyonik gelişme dışında, çiftleşmeden 7 gün önce paternal sıcak stresi uygulamasının blastosistlerdeki trophoctoderm ve inner cell mass hücre sayısını düşürdüğü ve bu düşüşün embriyonun uterusu implantasyonunda sorunlar yaratabileceği öne sürülmüştür. Çiftleşmeden 7 gün önce paternal sıcak stresinin, embriyo gelişiminde gecikmelere neden olması dolayısıyla sıcak stresi anında epididimiste bulunan spermatozoonların da sıcak stresinden etkilendiği kanısı vurgulanmaktadır.

Sonuç olarak; araştırmacılar sıcak stresinin testis ve epididimisteki spermatozoonları etkilediğini ve spermatositlerin bu etkiye en duyarlı germ hücreleri olduğunu, sıcak stresine bağlı olarak düşen spermatozoon kalitesinin spermatozoonların fertilizasyon kabiliyetini ve embriyo gelişimini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Embriyo gelişimindeki bu gecikmelere sebep olarak da sıcak stresine bağlı olarak hasar gören paternal genetik materyalini göstermişlerdir.

1.1.6. Sıcak Stresinin Apoptozis ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Apoptozis programlanmış hücre ölümüdür. Hücre DNA'sı düzeltilemeyecek oranda hasarlandığında hücre kendi kendine ölüm emrini verir. Çevresel etkenler apoptozise neden olabildiği gibi bazı genlerin ekspresyon değerlerini arttırabilir veya azaltabilirler.

Rockett ve ark (2001) erkek farelere 43°C de 20 dakika sıcak stresi uyguladıkları çalışmada sıcak stresinin testis dokusundaki hücresel ve moleküler mekanizmalar üzerine etkisini incelemişlerdir. Sıcak uygulanmasından 8 saat sonra, testis dokusundan hazırlanan preparatları hemotoksilen/eosin boyama yöntemiyle boyayarak yaptıkları morfolojik incelemede seminifer tubuluslarda bir çok vakuol olduğunu, bir çok germ hücresinin piknotik nukleusa sahip olduğunu, bazı hücrelerin nukleuslarının parçalandığını ve apoptotik şekilde görüldüğünü, 16 saat sonraki incelemede ise, tubullerde özellikle spermatositlerden oluşan dev dejenere hücreler bulunduğunu ve tubul lümeninde anormal sitoplazmik birikim olduğunu, spermatid bulunmadığını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada sıcak stresi sonrasında spermatositlerin apoptotik hale geçişinin morfolojik olarak değerlendirilmesini desteklemek ve DNA parçalanmasını belirlemek amacıyla TUNEL tekniği kullanılmıştır. Spermatogeneziste aksaklıkların şekillenmesi ve seminifer tubullardaki hasar oluşmasına eş zamanlı olarak TUNEL pozitif hücrelerin sayısının arttığı belirlenmiştir. Uygulamadan 24 saat sonra tubullerde çok sayıda apoptozise uğramış spermatositlerin oluşturduğu TUNEL pozitif hücreler gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada testis dokusuna 43°C ısı uygulanmasından 4 saat sonra sıcak şoku proteinlerinin (Hsp70-1, Hsp70-3) ekspreslenen mRNA'larını RT-PCR yöntemiyle belirlemişlerdir. Aynı şekilde spermatogenezisteki bozulmayla eş zamanlı olarak sıcak şoku proteinleri ekspresyonunun stres uygulamasından 16 saat sonra pik yaptığı ve 48 saat içerisinde seminifer tubullerdeki iyileşme süreciyle eş zamanlı olarak sıcak şoku proteinlerinin ekspresyon seviyesinin kontrol grubu seviyesine düştüğü belirlenmiştir. Sıcak şoku proteinleri ile birlikte testis dokusunda 27 adet genin ekspresyon modlarının arttığı, 151 adet genin ekspresyonunun düştüğü belirlenmiştir. Sıcak stresinin etkisiyle düşük ekspres edilen genlerin içinde 10 adet DNA onarımı ve rekombinasyon geninin, 9 adet protein sentezi ile ilişkili genin, 9 adet hücre siklusu ile ilişkili genin, 5 adet apoptozis ile ilişkili genin ve 4 adet glutatyon metabolizması ile ilgili genin yer aldığı belirlenmiştir. Bu genlerin ekspresyon değerlerindeki düşüş ile sıcak stresi ile artan apoptozis ve DNA hasarlı motil spermatozoon sayısı arasında bir bağlantı olması muhtemel görülmektedir.

Maymunlarda yapılan benzer bir çalışmada sıcak stresine bağlı olarak epididimise özgü 16 adet genin ekspresyon değerlerinin düştüğü belirlenmiştir (Li ve ark 2008). Bu genlerin ekspresyon değerlerinin düşmesi ile sıcak stresine bağlı olarak bozulan epididimis fonksiyon ve koşulları arasında bir bağlantı olması kuvvetli bir ihtimaldir.

1.1.7. Sıcak Stresine Karşı Savunma Sistemleri

Memelilerde testisler genel olarak skrotum içerisinde vücut sıcaklığından 2-8°C daha düşük sıcaklıkta muhafaza edilirler (Banks ve ark 2005). Koçlarda tunica dartos kası soğuk koşullarda testisleri vücuda yakınlaştırır ve sıcaklık arttığında ise testisleri vücuttan uzaklaştırarak testis ısını dengelemeye çalışır (Setchell ve Breed 2006). Oldukça yoğun bir şekilde ter bezleri ile kaplı olan skrotum derisi testiste oluşan ısıyı çevreye aktarabilecek yapıdadır (Setchell ve Breed 2006). Diğer scrotal testisli hayvanlarda olduğu gibi boğalarda arterial ve venöz kanın karşı akımları ile bu iki dolaşım arasında ısı değişimi oluşturulur (Brito ve ark 2004). Tüm bu anatomik yapılar testis ısını belirli bir aralıkta tutmak için önemlidir.

Testis ısını optimum seviyede tutmaya yarayan bu anatomik yapıların yanı sıra sıcak stresine karşı hücreleri korumaya çalışan hücresel savunma sistemleri de mevcuttur. Çeşitli antioksidanlar sıcak stresine bağlı olarak artabilen reaktif oksijen türlerinin oluşturacakları olumsuz etkilerin sınırlandırılması için çeşitli fonksiyonlar üstlenirler. İnsan spermasında çeşitli antioksidan enzimleri (süperoksit dismutaz – SOD, glutatyon peroksidaz/redüktaz ve katalaz) ve maddeleri (albumin, glutatyon, pirüvat, taurin, hipotaurin, E ve C vitaminleri) tespit edilmiştir (Lamirande ve ark 1997). Bununla birlikte spermatozoonlar oksidatif strese karşı çok duyarlıdır. Antioksidan savunma sistemi daha çok seminal plazma kaynaklıdır. Spermatozoonların oksidatif strese olan duyarlılığının spermatozoon sitoplazmasının yetersiz antioksidan içeriği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Vernet ve ark 2004). Diğer önemli bir faktör ise, fertilizasyon sırasında ovum membranına bağlanmada ve füzyon olaylarında gerekli olan membran akışkanlığını sağlamak için spermatozoon membranının yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi içermesidir (Agarwal ve ark 2003). Bu nedenle de spermatozoonlar serbest radikallerin saldırısına ve lipid peroksidasyonuna duyarlı bir konumdadır (Vernet ve ark 2004). Nitekim yapılan bir çalışmada sıcak stresine bağlı olarak antioksidan aktivitesinin arttığı, ancak artan bu aktivitenin spermatozoonlarda oluşan hasarı engellemek için yeterli olmadığı belirlenmiştir (Nichi ve ark 2006).

Sıcak şoku proteinleri fizyolojik koşullarda düşük seviyelerde ekspres edilir fakat sıcak gibi stres etkenleriyle birlikte ekspresyon seviyelerinin arttığı bilinmektedir. Sıcak şoku proteinlerinin fonksiyonu proteinlerin yapılandırılmasına, kümelenmelerinin

engellenmesine ve yanlış yapılanmış proteinlerin parçalanmasına yardımcı olmaktadır. Sıcak şoku proteinleri yanlış yapılanmış proteinlerin kümeleşmesini azaltarak onları yeniden yapılandırır. Sıcak şoku proteinlerinin apoptozis mekanizması ile bağlantılı olabilecekleri düşünülmektedir. Sıcak şoku proteinleri moleköl ağırlıklarına göre sınıflandırılır. Bunlar küçük sıcak şoku proteini (Hsp40), mitokondri sıcak şoku proteinleri (Hsp60, Hsp70 ve Hsp90) ve büyük sıcak şoku proteini (Hsp110) dir. Sıcak şoku proteinleri oksidatif strese bağı proteinlerde oluşan hasarı engellemeye çalışırlar (Kalmar ve Greensmith 2009). Sıcak stresinden sonra testislerde Hsp70-1 ve Hsp70-3 ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir (Rockett ve ark 2001).

Yapılan çalışmaları, tüm bu savunma mekanizmalarına rağmen, sıcak stresinin erkeklerin üreme yeteneklerini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Bu bilgiler ışığında bu proje çevresel sıcak stresinin koçlarda in-vitro spermatolojik parametreler üzerine etkilerini incelemek amacıyla planlanmış ve yapılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışmaya başlamadan önce Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 28.08.2012 tarih ve B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2012/044 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Bu doktora tez çalışmasında yaşları 14-18 ay, canlı ağırlıkları 48-56 kg arasında değişen 6 baş kıvrıkcık ırkı koç kullanılmıştır (Resim 2.1.). Koçlar 15 ay süresince Haziran 2013-Eylül 2014 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalına ait hayvan bölümünde barındırılmıştır. Koçlar proje süresince günlük olarak yarım balya yonca kuru otu ve 5-6 kg toklu beslenmesi için üretilmiş konsantre yemle beslenmiştir.



Resim 2.1. Çalışmada kullanılan koçlar ve barınak.

2.2. Çevresel Sıcaklık ve Nem Değerlerine Göre Sıcak Stresi ve Kontrol Dönemlerinin Belirlenmesi

Koç barınağının sıcaklık ve nemi proje süresince barınağın içerisine yerleştirilmiş olan sıcaklık ve nemölçer termometreden her gün kontrol edilerek kaydedilmiştir. Türkiye Cumhuriyeti Orman ve Su İşleri Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü web sayfasında (<http://www.mgm.gov.tr/genel/ssss.aspx?s=hissedilensicaklik>) yayımlanan nem değerlerine göre hissedilen sıcaklığın hesaplandığı tablo yardımıyla günlük hissedilen sıcaklık değerleri hesaplanmış ve aylık hissedilen sıcaklık ortalamaları tez çalışmasında kullanılmıştır. En yüksek hissedilen sıcaklık ortalamalarına sahip 6 ay (Mayıs-Ekim) sıcak stresi dönemi diğer 6 ay (Kasım-Nisan) ise kontrol dönemi olarak kabul edilmiştir. Ancak sıcaklık seviyelerinin benzer seyrettiği Nisan (18,55°C) ve Ekim (18,19°C) aylarından, sıcak stresinin olası etkilerinin hemen kaybolmayacağı (Meyerhoefer ve ark 1985) ve bölgemizde günlerin kısalması ve sıcaklıkların düşmesi ile başlayan ve sonbahar aylarınca süren üreme mevsiminin iki dönem arasında eşit paylaşılmasıyla üreme sezonunun sonuçlar üzerine olası etkilerini engellemek için Ekim ayı sperma örnekleri sıcak stresi dönemi içerisinde değerlendirilmiştir. Bu sayede üreme sezonun ilk yarısı Eylül ve Ekim ayları sıcak stresi dönemi içerisinde yer alırken ikinci yarısı Kasım ve Aralık ayları kontrol döneminde yer almıştır.

2.3. Spermanın Alınması

Çalışma süresince koçlardan sperma elektro-ejakülasyon yöntemi kullanılarak alınmıştır. Sperma alma işleminde Minitube marka elektro-ejakülatör (Resim 2.2.) otomatik modda kullanılmış olup 0,5 volt akımdan başlayarak saniyede 0,5 volt artan bir düzen çerçevesinde ejakülasyon tamamlanıncaya kadar koçlara elektrik akımı uygulanmıştır. Çalışma süresince koçlardan ayda iki defa sperma alınmıştır. İlk 3 ay antrenman ve koçların yeni barınağa ve yemleme sistemine alışma periyodu olarak kabul edilmiş alınan spermalar tez içerisinde kullanılacak bazı metodların ön çalışmasında koçların spermatozoon kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Ayda iki defa olacak şekilde tez süresince (Eylül 2013- Ağustos 2014) alınan sperma örneklerinin bir tanesi tez çalışmasında kullanılmıştır. Toplamda 6 baş koçtan her ay 6 örnek olmak üzere 72 adet sperma örneği bu tezde kullanılmıştır.



Resim 2.2. Proje süresince koçlardan sperma almak için kullanılan elektro-ejakülatör.

2.4. Spermaların Muhafazası, Hacim ve Yoğunluğunun Belirlenmesi

Her bir koçtan alınan sperma örnekleri en kısa süre içerisinde 37°C deki su banyosu içerisinde gerekli muayeneler yapılncaya kadar ayrı ayrı muhafaza edilmiştir. Sperma hacimleri mikropipet kullanılarak, yoğunluğu ise hemositometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem için 4990 µl su içerisine 10 µl sperma ilave edilip karıştırılmıştır. 1/500 oranında sulandırılmış olan sperma Thoma laminının iki tarafındaki bölmelere konulup daha sonra her iki taraftan 5 büyük kare içerisindeki spermatozoonlar faz kontrast mikroskop kullanılarak sayılmıştır. Daha sonra aşağıdaki formül uygulanarak 1 ml sperma içerisindeki spermatozoon sayısı belirlenmiştir (Tekin 1994).

$$X = \frac{\text{Saydığımız spermatozoon sayısı}}{\text{Saydığımız büyük kare hacmi } \left(\frac{1}{250}\right) \times \text{Saydığımız büyük kare sayısı (10) \times \text{Sulandırma oranı } \left(\frac{1}{500}\right)} \times 1000$$

2.5. Motilite Muayenesi

Her bir koça ait ejakülatlardan alınan 100 µl sperma daha önceden hazırlanmış 300 mM Tris, 28 mM Glikoz, 95 mM Sitrik asit içeren (TCG) sulandırıcısı ile 5 kat sulandırılmıştır. Her koça ait sulandırılmış sperma örneklerinden 10 µl alınarak daha önceden ısısı 37°C ye ayarlanan ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop üzerindeki lama konulmuş ve üzeri lamel ile kapatılarak en az 5 farklı alan değerlendirilerek motil olan spermatozoonların oranı belirlenmiştir.

2.6. Ölü Canlı Muayenesi

Ölü-canlı spermatozoon oranı supravital boyama tekniğiyle belirlenmiştir. Daha önceden hazırlanmış, içerisinde % 3 sodyum sitrat, % 3 nigrosin ve % 1 eosin içeren solüsyondan lam üzerine 1 damla damlatılmış ve 1 damla sperma ile dikkatlice karıştırılmıştır. Daha sonra lamel yardımıyla froti çekilerek preparatlar hazırlanmıştır. Bu işlem her bir koç için ayrı ayrı yapılmıştır. Işık mikroskobu altında değerlendirilen her bir preparatta toplamda 200 spermatozoon olacak şekilde boya alan ölü ve boya almayan canlı spermatozoonlar (Resim 2.3.) sayılarak her bir koça ait canlı spermatozoon oranı bulunmuştur.



Resim 2.3. Işık mikroskobu altında eosin-nigrosin boyama yöntemiyle canlı (a) ve ölü (b) spermatozoonların görünümü.

2.7. Morfolojik Muayene

Anormal spermatozoon oranı sıvı fikzasyon yöntemiyle belirlenmiştir. Aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanan Hancock solüsyonundan (Hancock 1952) 1 ml alınarak eppendorf tüpü içerisine konulmuştur. Üzerine 10 µl sperma ilave edilerek spermatozoonlar solüsyon içerisinde fikze edilmiştir. Bu işlem her koç için ayrı ayrı uygulanmıştır. Her bir koça ait sperma-Hancock solüsyonu karışımından 10 µl alınarak lam lamel arasına konulmuş ve faz kontrast mikroskop altında her koç için toplamda 200 spermatozoonun morfolojik bozukluklar (Resim 2.4.) yönünden incelenmesiyle (akrozom, baş, orta kısım, ve kuyruk anomalileri) her bir koça ait anormal spermatozoon oranı belirlenmiştir.

Hancock solüsyonunun hazırlanışı:

1.Solüsyon:

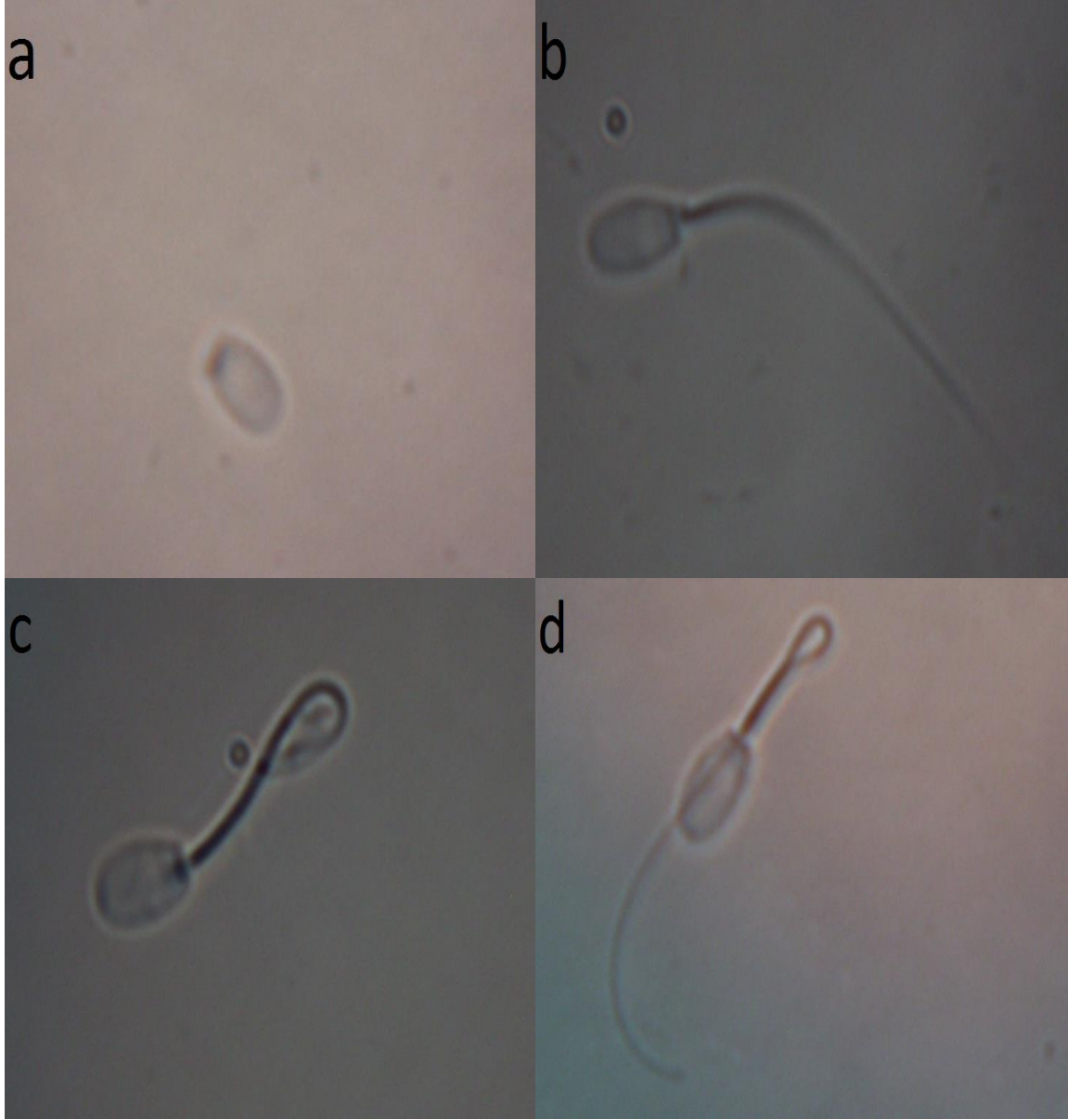
1.13 gram NaCL 62,5 ml bidistile su içinde çözündürülür.

2.Solüsyon:

a) 2,71 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 62,5 ml bidistile su içinde çözündürülür.

b) 2,78 gram KH_2PO_4 62,5 ml bidistile su içinde çözündürülür. 25 ml a solüsyonu ile 10 ml b solüsyonu karıştırılır.

1.solüsyondan 18,75 ml, 2.solüsyondan 12,50 ml, 81 ml formalin ve 62,5 ml bidistile su karıştırılarak Hancock solüsyonu hazırlanır (İleri ve ark 2002).



Resim 2.4. Diferansiyel interferans contrast mikroskobu altında spermatozoonlarda görülen bazı morfolojik bozuklukların görünümü a) Kopuk baş b) Kuyruk baş bağlantısı hatalı spermatozoon c) Baş ve kuyruk bozukluğu d) Kuyruğu üzerine kıvrılmış spermatozoon.

2.8. Spermatozoonların Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi

Spermatozoonların membran bütünlüğünü değerlendirmek için eosin nigrosin boyama tekniğiyle kombine edilen hypoosmotic swelling test (HE-test) kullanılmıştır (Ducci ve ark 2002, Aksoy ve ark 2008). Bu amaçla her koça ait 25 μ l sperma örneği osmotik basıncı 100 mOsm/L ye ayarlanmış 475 μ l früktoz solüsyonu içinde 37°C de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası koçlara ait örneklerle eosin nigrosin boyaması

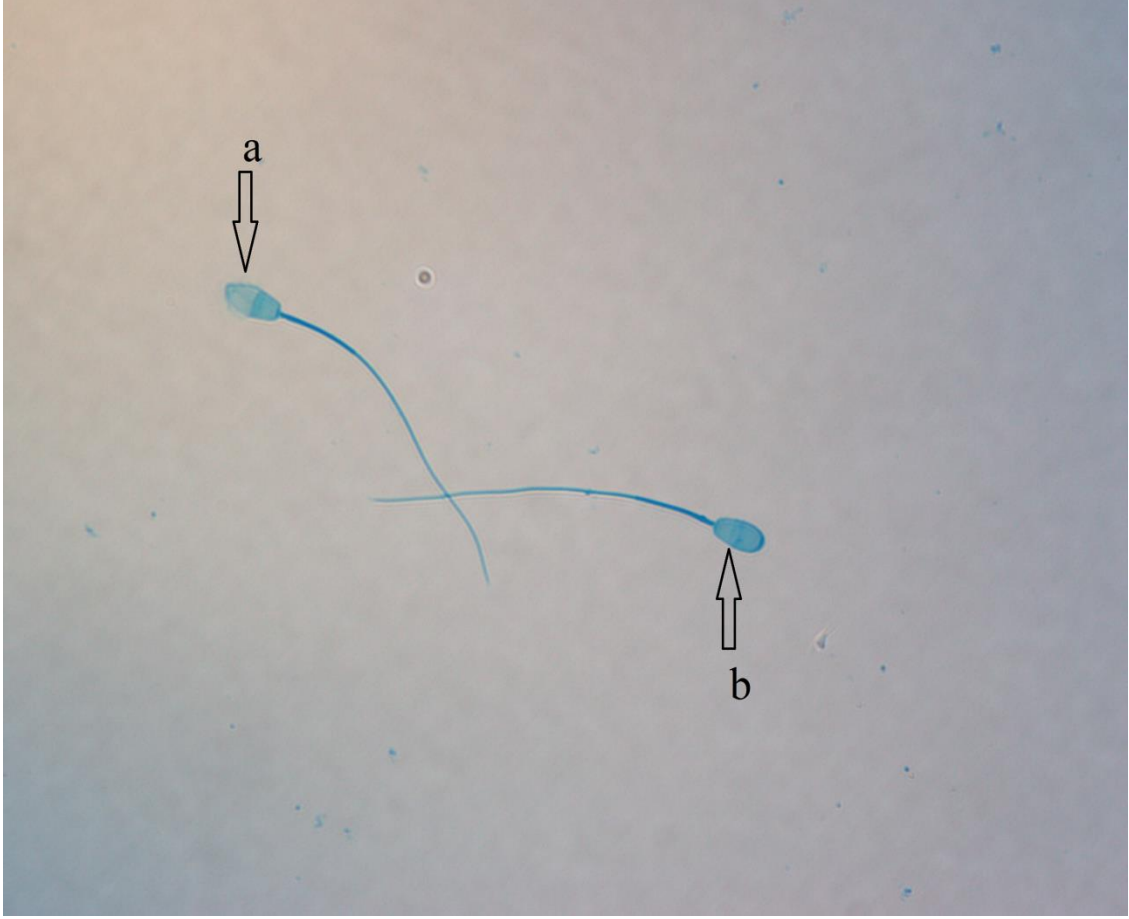
yapılarak preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir preparatta 200 spermatozoon membran bütünlüğü ve canlılığı yönünden değerlendirilmiştir. Bu amaçla spermatozoonlar 4 farklı tipte ele alınmıştır (Resim 2.5.). **Tip 1** boya almamış ve kıvrık kuyruklu spermatozoonların oluşturduğu canlı ve test sonrası membran bütünlüğü korunmuş spermatozoonlar. **Tip 2** boya almamış ve düz kuyruklu spermatozoonların oluşturduğu canlı ve test sonrası membran bütünlüğünü koruyamamış spermatozoonlar. **Tip 3** boya almış ve kıvrık kuyruklu spermatozoonların oluşturduğu ölü ve membran bütünlüğü korunmuş spermatozoonlar. **Tip 4** boya almış ve düz kuyruklu spermatozoonların oluşturduğu ölü ve test sonrası membran bütünlüğünü kaybetmiş spermatozoonlar. Bu değerlendirme sonrasında canlı ve membran bütünlüğü korunmuş hücreler ile ölü ve membran bütünlüğü korunmuş hücrelerin oranı toplam membran bütünlüğü korunmuş hücre oranı olarak kullanılmıştır.



Resim 2.5. Işık mikroskobu altında HE-test sonrası farklı tiplerdeki spermatozoonların görünümü. Tip 1: Canlı ve test sonrası membran bütünlüğünü korumuş spermatozoon. Tip 2: Canlı ve test sonrası membran bütünlüğü bozulmuş spermatozoon. Tip 3: Ölü ve test sonrası membran bütünlüğü bozulmamış spermatozoon. Tip 4: Ölü ve test sonrası membran bütünlüğü bozulmuş spermatozoon.

2.9. Spermatozoonlarda Akrozom Reaksiyonunun Uyarılması

Taze spermada spontan olarak şekillenmiş (premature), seminal plazmanın ayrılmasından sonra TCG solüsyonu içerisinde 1 saat inkübasyonu takiben (0. dakika) ve akrozom reaksiyonunu indükleyen lysophosphatidylcholine (LPC) ilavesinden sonraki 20, 40 ve 60. dakikada akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranları belirlenmiştir. Bu amaçla, tüm koçlara ait taze sperma örneklerinden 15 µl alınarak Coomassie Blue G-250 boyama işlemi için 985 µl fikzasyon solüsyonu içinde fikze edilmiştir. Her koça ait yine taze sperma örneklerinden ayrı ayrı 200 µl taze sperma TCG solüsyonu ile 10 kat sulandırılarak 3000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 defa yapıldıktan sonra spermatozoonlar seminal plazmadan ayrılmıştır. Yıkama işlemi sonrası kalan spermatozoon peletleri 1ml TCG solüsyonu ile sulandırılarak spermatozoonların kapasite olması için 1 saat süresince 35°C de muhafaza edilmiştir. Daha sonra tüm koçlara ait kapasite olmuş 980 µl hacimdeki örneklerin üzerine, 1ml TCG solüsyonu içerisinde 10 mg LPC olacak şekilde hazırlanan stok solüsyondan 20 µl LPC (200 µg/ml final dozunda) akrozom reaksiyonunu uyarmak için ilave edilmiştir. Kapasitasyon işlemi sonrası 0. dakikada, LPC ilavesi sonrası 20, 40 ve 60. dakikada alınan örnekler akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoonları belirlemede kullanılan Larson ve Miller (1999) tarafından tanımlanmış Coomassie Blue G-250 boyama prosedürüne tabi tutulmuştur. Bu amaçla 0, 20, 40 ve 60. dakikada alınan 300 µl sperma daha önceden hazırlanmış 110 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM NaH₂PO₄ ve % 4 w/v paraformaldehid (pH 7,4) içeren 700 µl fikzasyon solüsyonu ile 10 dakika süresince fikze edilmiştir. Bu örnekler daha önceden fikze edilen taze sperma örnekleriyle birlikte santrifüj edilerek 700 µl 100 mM amonyum asetat ile iki defa yıkanmıştır. En son sperm peletleri 500 µl amonyum asetat ile tekrar sulandırıldıktan sonra her örnekten 10 µl alınarak froti çekilmiş ve preparatlar hazırlanmıştır. Preparatlar kuruduktan sonra % 0.22 (w/v) Coomassie Blue G-250, % 50 methanol, %10 glacial asetik asit ve % 40 distile su içeren boya solüsyonunda 45 dakika bekletilerek boyanmıştır. Hazırlanan her bir preparatta akrozom reaksiyonu geçirmiş (akrozomu boya almayan) ve akrozom reaksiyonu geçirmemiş (akrozomu boya alan) toplam 200 spermatozoon ışık mikroskobu altında sayılarak (Resim 2.6.) akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranları belirlenmiştir (Ahmad ve ark 2013).



Resim 2.6. Işık mikroskobu altında a) Akrozom reaksiyonu geçirmiş ve b) Akrozom reaksiyonu geçirmemiş spermatozoonların görünümü.

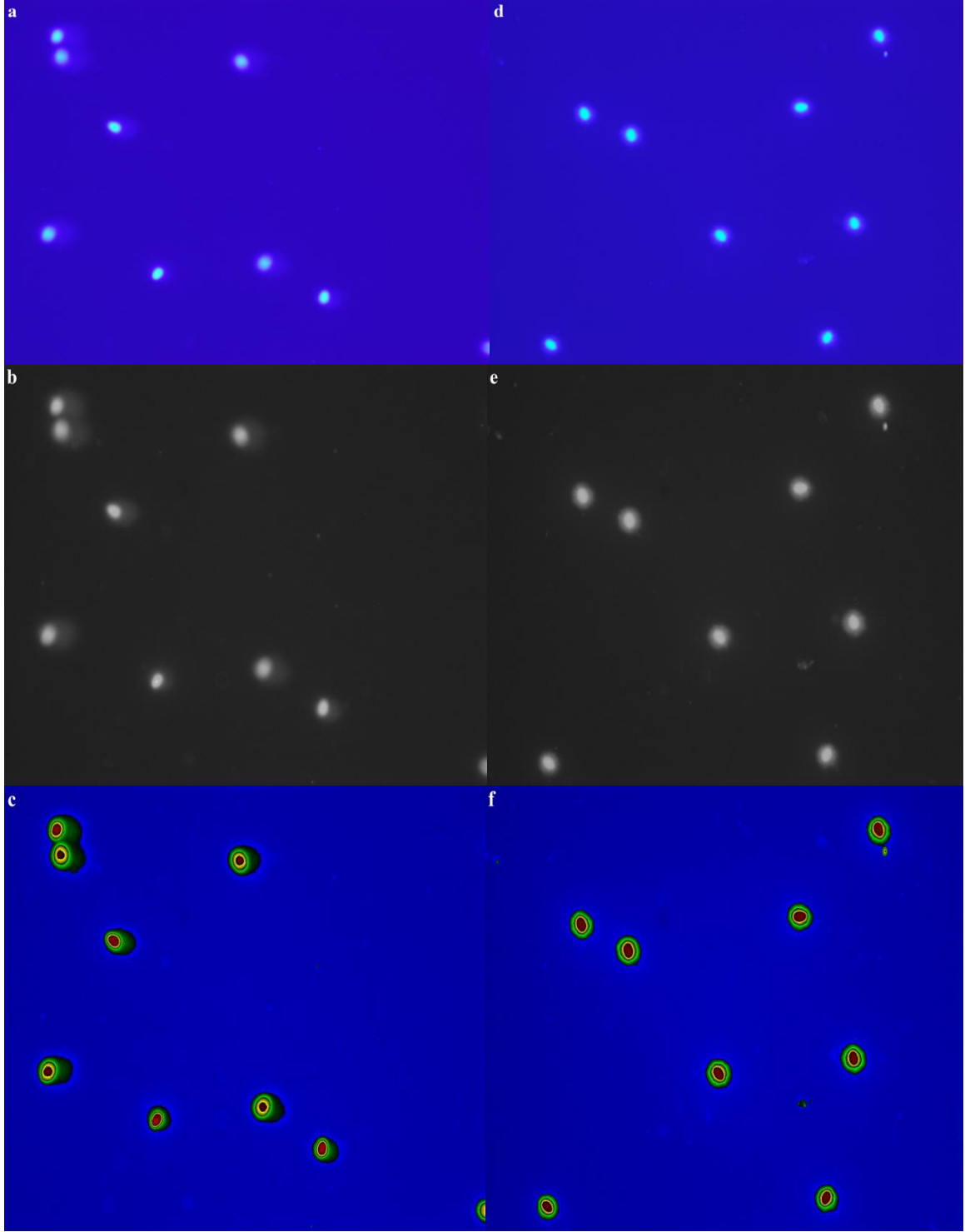
2.10. Spermatozoonlarda DNA Hasarlarının Belirlenmesi

DNA hasarlı spermatozoonların belirlenmesi amacıyla alkali comet assay yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla her koçtan alınan sperma örnekleri 2×10^6 sperm/ml olacak şekilde TCG solüsyonu ile sulandırılmıştır. Daha önceden PBS içerisinde çözündürülerek hazırlanan % 0,75 (w/v) low melting agar (LMA)' dan 190 μ l alınarak üzerine sulandırılmış örneklerden 10 ar μ l ilave edilmiştir. Daha önceden üzerleri PBS içerisinde çözündürülmüş % 1 (w/v) normal melting agar (NMA) ile kaplanmış lam üzerine 200 μ l sperma LMA karışımı yayıldıktan sonra üzerine lam kapatılarak 4°C de 5 dakika katılaşmaya bırakılmıştır. Daha sonra üstteki lam dikkatlice çekilerek ayrılmıştır. Bu şekilde her koç için hazırlanan preparatlar gece boyunca içerisinde 1% N-lauroylsarcosine, 1 M Tris-HCl, 0,5 M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ve 0,3 M mercaptoethanol bulunan (sodyum hidroksit peletleri kullanılarak pH >10 ayarlanmış) lizis solüsyonu

içerisinde bekletilmiştir (Chen ve ark 2002). Lizis solüsyonundan çıkarılan preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra, elektroforez tankına yerleştirilip 300 mM sodyum hidroksit ve 1 mM EDTA bulunan elektroforez solüsyonu (Hughes ve ark 1996) içerisinde 4°C de 20 dakika inkube edildikten sonra 40 dakika süresince 50 volt elektrik akımına maruz bırakılmıştır (Resim 2.7.). Elektroforez işleminden sonra preparatlar sırasıyla 0.4 M tris (pH=7) içeren nötralizasyon solüsyonundan ve %50, %70 ve %90 methanol içeren solüsyonlardan geçirilerek fikze edilmiştir. Preparatlar kuruduktan sonra, 70 µl DAPI (40,6-diamidino-2-phenyindole-dilactate) ile boyanıp üzerlerine lamel kapatılmıştır. Preparatlardan floresan mikroskop kullanılarak en az 100 hücre içeren Quickcam-Pro kamera yardımıyla rastgele çekilen resimler değerlendirme için kaydedilmiştir. Kayıt edilen resimlerdeki spermatozoonlar DNA'ları hasarlı (kırık DNA parçalarının elektrik akımı yönünde sürüklenmesine bağlı olarak önde asıl DNA yuvarlağı ile arkada DNA serpintilerinin oluşturduğu kuyruk nedeniyle oluşan kuyruklu yıldız görüntüsü) veya DNA hasarı bulunmayan (asıl DNA'nın bir bütün şekilde görüldüğü) hücreler belirlenerek DNA hasarlı spermatozoon oranları belirlenmiştir (Resim 2.8.). Görüntülerin değerlendirilmesinde “Image J” software (version 1.47v; NIH. USA) programından faydalanılmıştır (Küçük ve ark 2014).



Resim 2.7. Elektroforez işleminde kullanılan elektroforez sistemi.



Resim 2.8. DNA hasarlı spermatoozonların a) Floresan mikroskopta b) Image J software 32 bit çözünürlükte c) Image J software 5 aşamalı görüntüleme sistemindeki görüntüleri. DNA hasarı olmayan spermatozoonların d) Floresan mikroskopta e) Image J software 32 bit çözünürlükte f) Image J software 5 aşamalı görüntüleme sistemindeki görünümü.

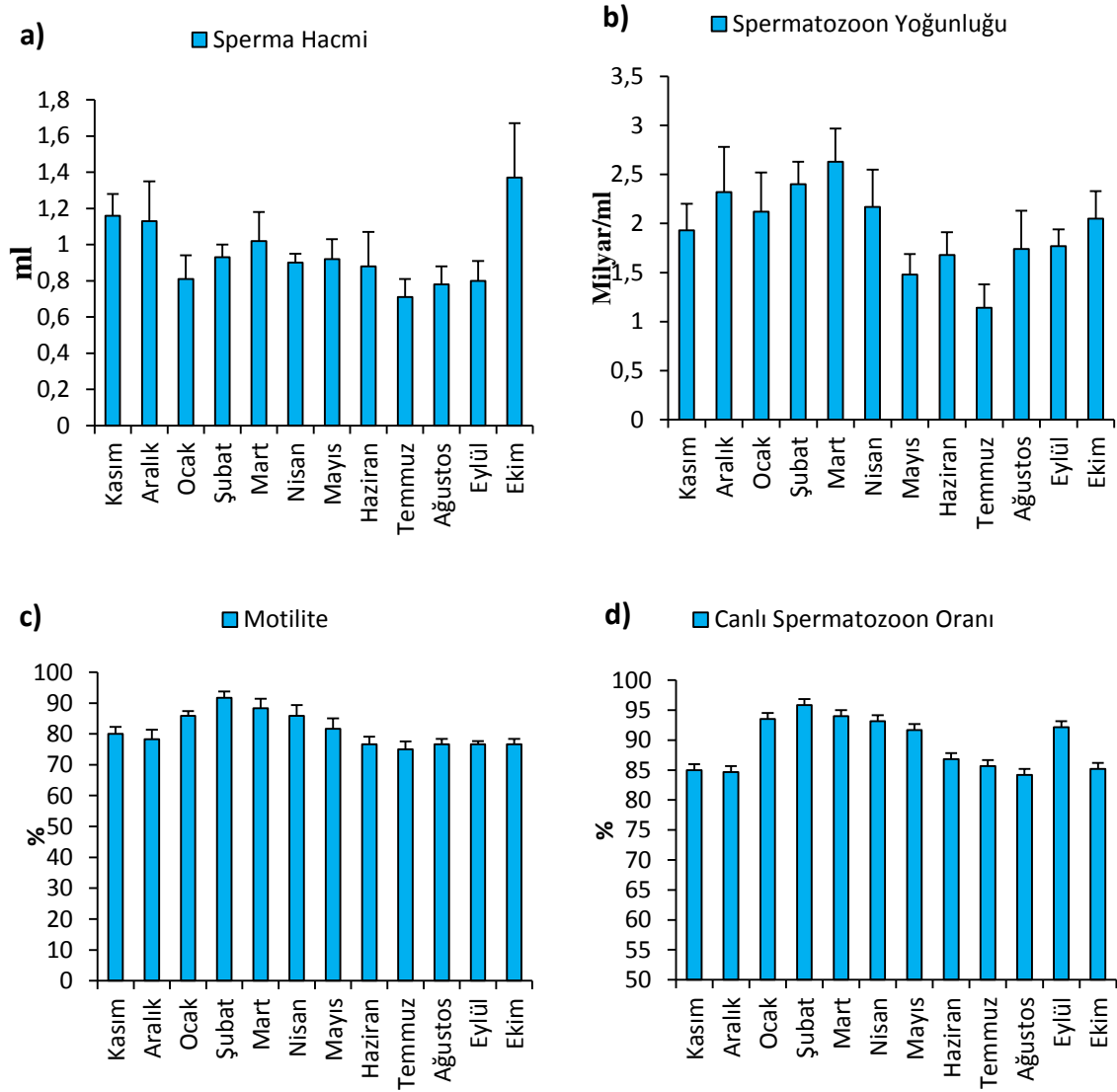
2.11. İstatistik Analiz

Yıl boyunca aylık olarak ejakülatları toplanan 6 baş koça ait spermatolojik parametrelerin ve hissedilen sıcaklık değerlerinin aylık ortalamaları Minitab 17 istatistik programında “Descriptive Tests” kullanılarak Mean $\pm$ SEM şeklinde hesaplanmıştır. 12 ay süresince 6 baş koçtan toplanan sperma örnekleri (n=72) sıcaklıkların en yüksek olduğu 6 ay (Mayıs-Ekim) sıcak stresi dönemi (n=36) ve sıcaklıkların daha düşük olduğu 6 ay (Kasım-Nisan) kontrol dönemi (n=36) olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Kontrol ve sıcak stresi dönemlerine ait sonuçlar yine Minitab 17 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Her iki döneme ait spermatolojik parametreler arasında istatistiksel bir fark ($P<0,05$) olup olmadığı “Two-Samples T-Test” kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar şekiller üzerinde Mean $\pm$ SEM şeklinde sunulmuştur.

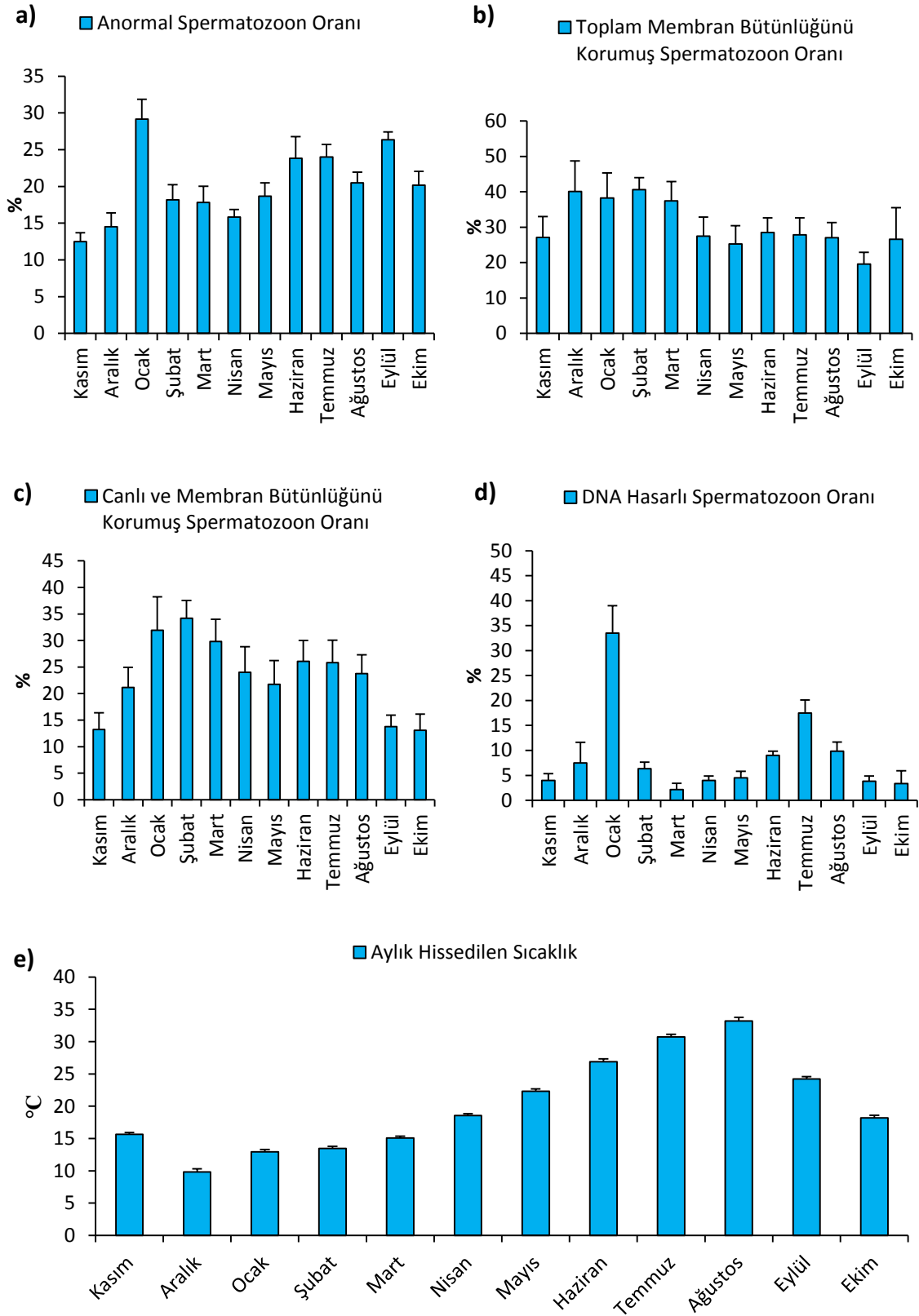
3. BULGULAR

3.1. Aylık Verilerin Ortalamaları

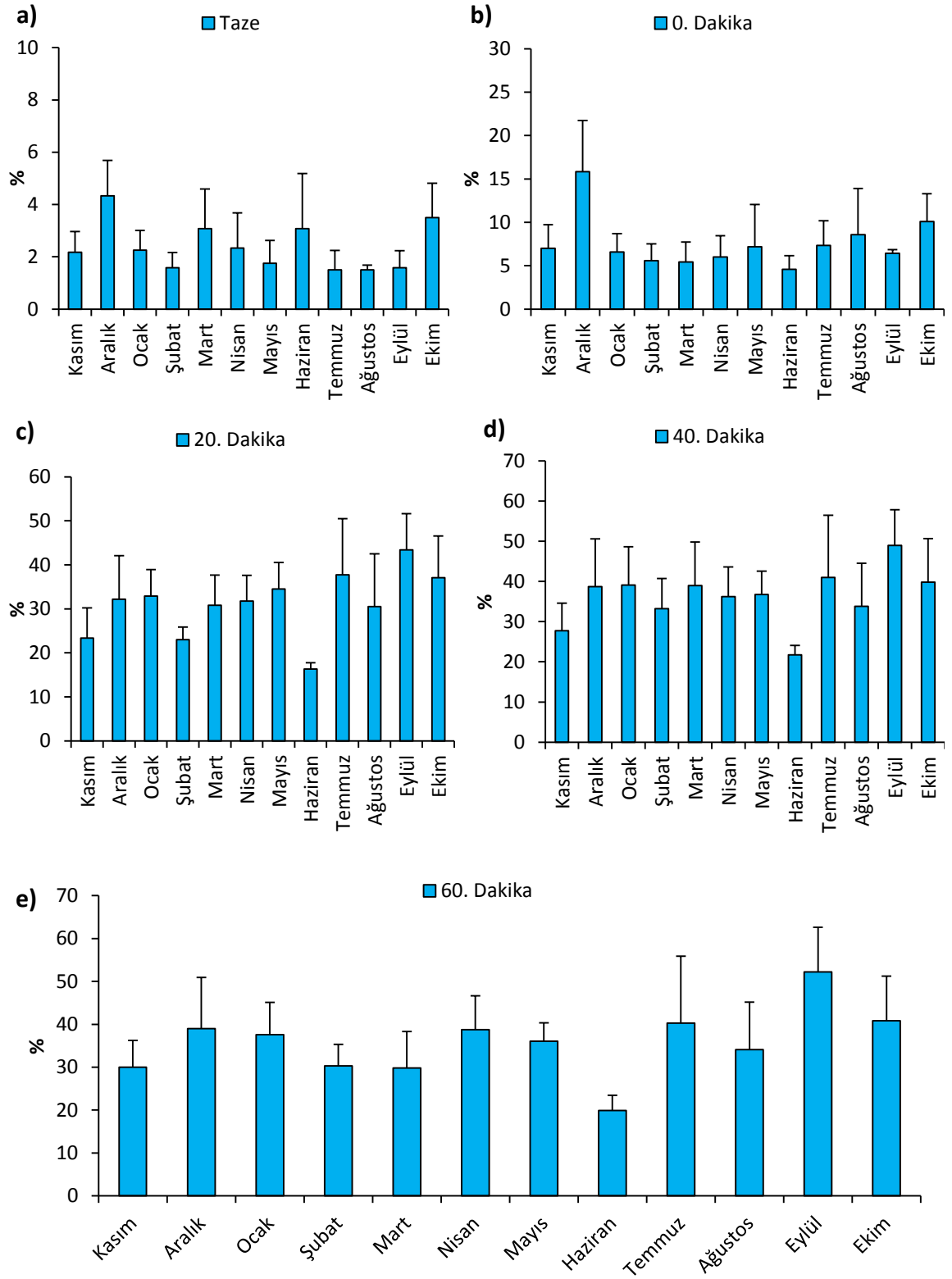
Yıl boyunca aylık olarak ejakülatları toplanan 6 baş koça ait spermatolojik parametrelerin ve hissedilen sıcaklık değerlerinin aylık ortalamaları aşağıdaki şekillerde sunulmuştur (Şekil 3.1., Şekil 3.2., ve Şekil 3.3.).



Şekil 3.1. Koçlara ait bazı spermatolojik parametrelerin yıl boyu aylık değişimleri (mean±SEM).



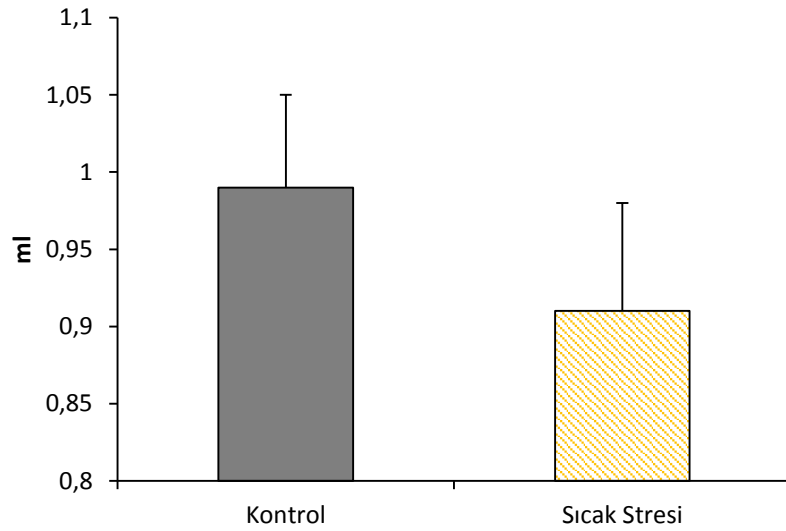
Şekil 3.2. Koçlara ait bazı spermatolojik parametrelerin ve hissedilen sıcaklık değerlerinin yıl boyu aylık ortalamaları (mean±SEM).



Şekil 3.3. Koçlara ait örneklerde akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranlarının yıl boyu aylık ortalamaları (mean±SEM). a) Taze spermada b) 1 saat inkübasyon sonrası 0. dakikada c) LPC ilavesi sonrası 20. dakikada d) 40. dakikada ve e) 60. dakikada.

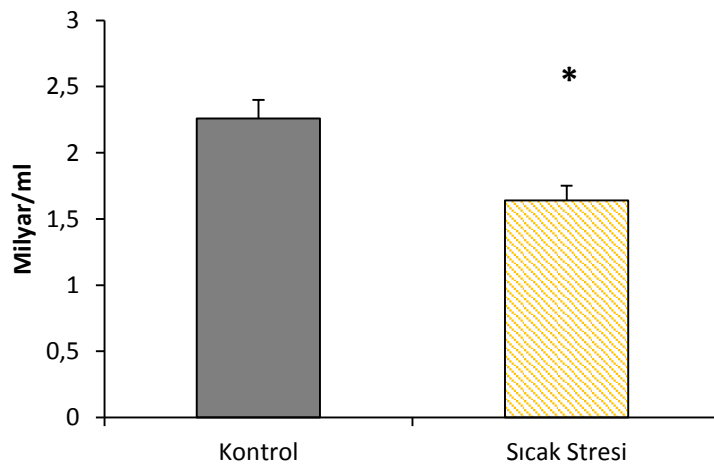
3.2. Sonuçlar

Sperma hacimleri yönünden kontrol dönemi ($0,9\pm0,06\text{ml}$) ile sıcak stresi dönemi ($0,9\pm0,07\text{ml}$) arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Kontrol ve sıcak stresi dönemlerinde sperma hacimlerinin karşılaştırılması ($P>0,05$).

Sıcak stresi döneminde ($1,6\pm0,11\times10^9\text{spermatozoon/ml}$) spermatozoon yoğunluğunun kontrol döneminde ($2,3\pm0,14\times10^9\text{spermatozoon/ml}$) göre daha düşük olduğu ($P<0,05$) belirlenmiştir (Şekil 3.5.).



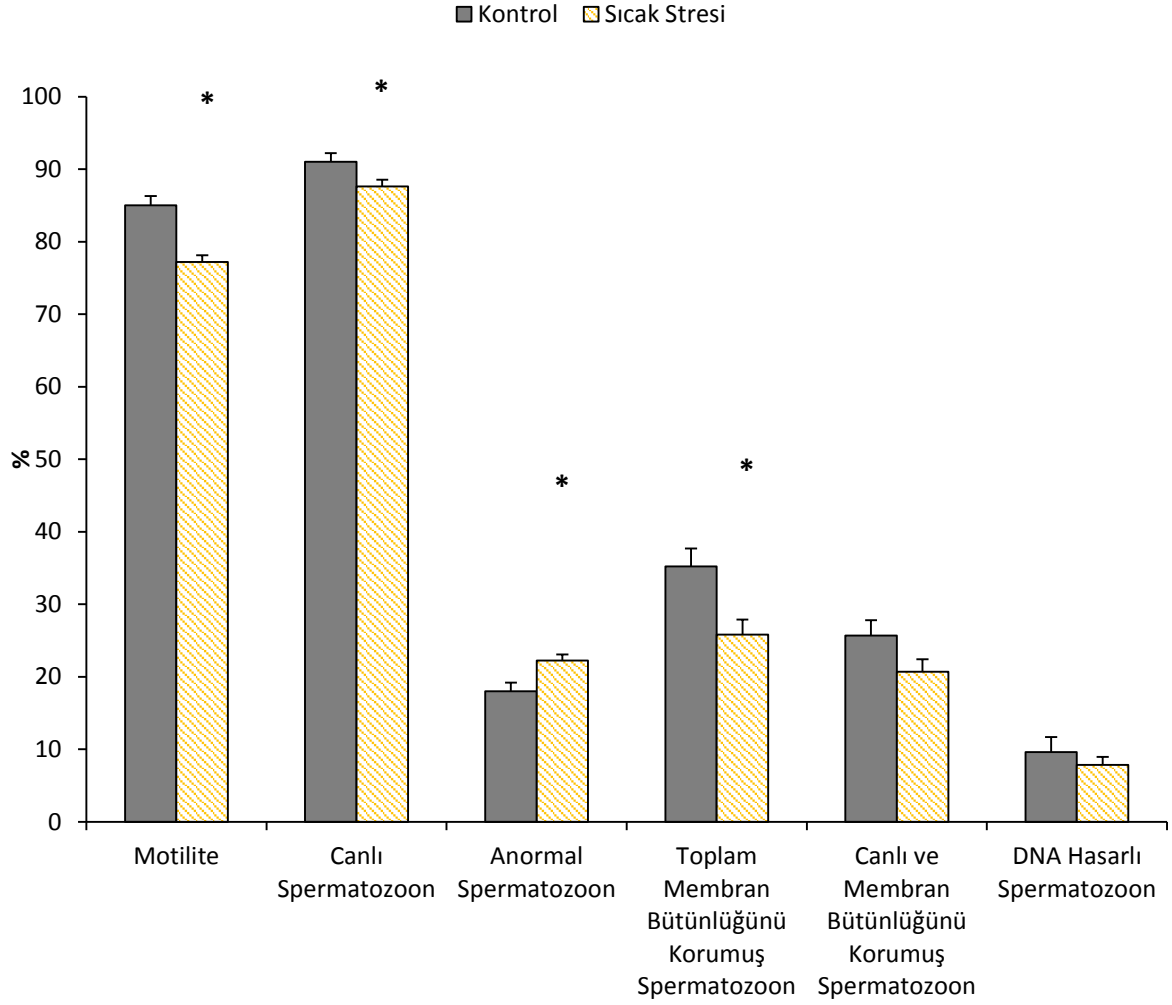
Şekil 3.5. Kontrol ve sıcak stresi dönemlerinde spermatozoon yoğunluklarının karşılaştırılması. * $P<0,05$

Sıcak stresi döneminde motil spermatozoon oranı ($77,2 \pm 0,92$) kontrol dönemindeki motil spermatozoon oranından ($85,0 \pm 1,30$) daha düşük bulunmuştur ($P < 0,05$). Benzer şekilde canlı spermatozoon oranlarının sıcak stresi döneminde ($87,6 \pm 0,96$) kontrol döneminden ($91,0 \pm 1,20$) daha düşük olduğu ($P < 0,05$) belirlenmiştir (Şekil 3.6.).

Sıcak stresinin sperm morfolojisi üzerine de olumsuz etkilerinin olduğu, sıcak stresi döneminde anormal spermatozoon oranının ($22,3 \pm 0,85$) kontrol döneminden ($18,0 \pm 1,2$) daha yüksek olduğu ($P < 0,05$) belirlenmiştir (Şekil 3.6.).

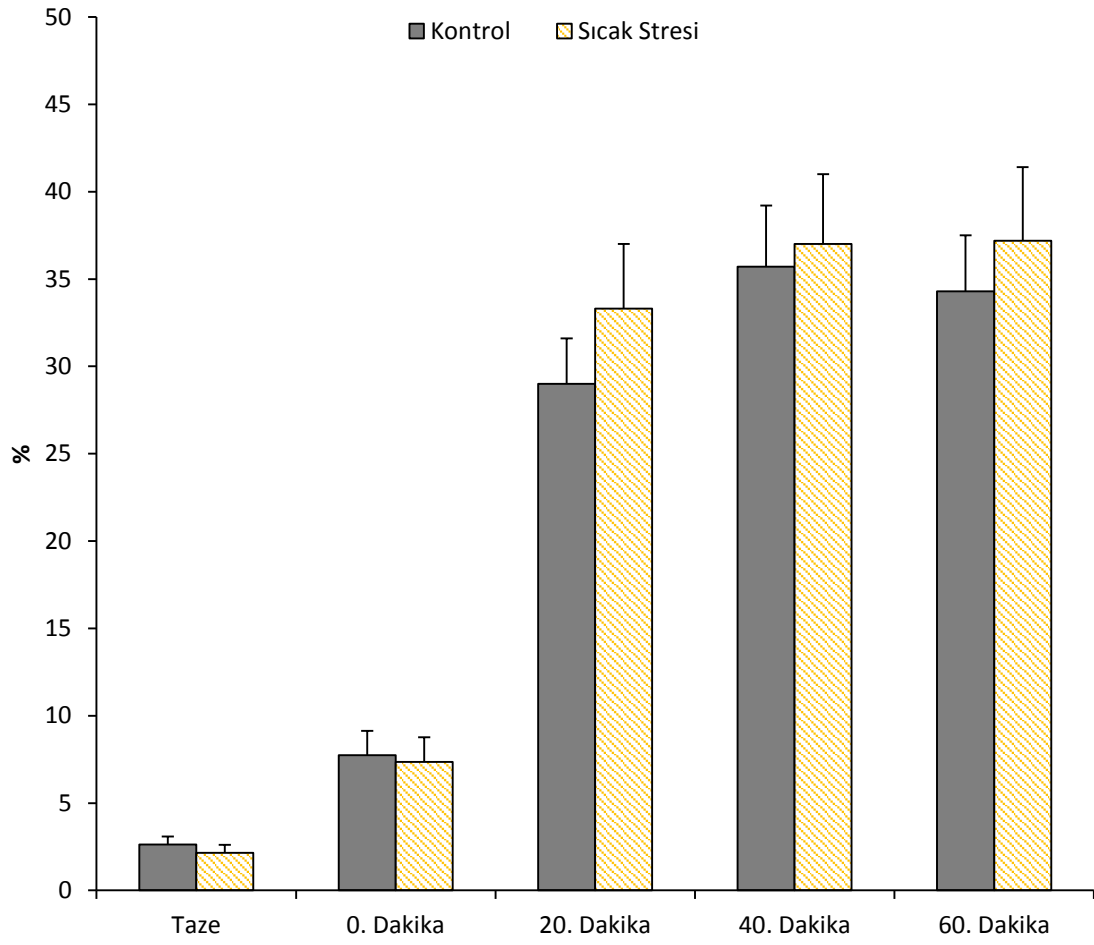
Spermatozoon membranının sıcak stresine duyarlı olduğu ve sıcak stresi döneminde HE-test sonrasında toplam (canlı ve ölü) membran bütünlüğünü korumuş spermatozoon oranının ($25,8 \pm 2,10$) kontrol döneminden ($35,2 \pm 2,50$) daha düşük olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). HE-test sonrasında canlı ve membran bütünlüğünü korumuş spermatozoon oranları yönünden kontrol dönemi ($25,7 \pm 2,10$) ile sıcak stresi dönemi ($20,7 \pm 1,70$) arasında istatistiksel bir fark belirlenmemiştir. Ancak, sıcak stresi dönemine ait örneklerin canlı ve membran bütünlüğünü korumuş spermatozoon oranlarının ($P = 0,061$) daha düşük olma eğiliminde olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.6.).

DNA hasarlı spermatozoon oranları yönünden ise sıcak stresi dönemi ($7,9 \pm 1,10$) ile kontrol dönemi ($9,6 \pm 2,10$) arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Bazı spermatolojik parametreler yönünden sıcak stresi ve kontrol dönemlerinin karşılaştırılması. * $P < 0,05$.

Taze spermada kendiliğinden (premature) akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranları yönünden sıcak stresi dönemi ($2,2 \pm 0,46$) ile kontrol dönemi ($2,6 \pm 0,45$) arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Spermatozoonların 1 saat süresince TCG solüsyonu içerisinde inkübasyonu sonrası 0. dakikada akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranları yönünden sıcak stresi dönemi ($7,4 \pm 1,40$) ile kontrol dönemi ($7,7 \pm 1,40$) arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Benzer olarak, inkübasyon sonrası LPC molekülü ile akrozom reaksiyonuna girmeleri sağlanan spermatozoonlarda LPC ilavesi sonrası sırasıyla 20, 40 ve 60. dakikada akrozom reaksiyonu geçiren spermatozoon oranları yönünden sıcak stresi dönemi ($33,3 \pm 3,70$; $37,0 \pm 4,00$ ve $37,2 \pm 4,20$) ve kontrol dönemi ($29,0 \pm 2,60$; $35,7 \pm 3,50$ ve $34,3 \pm 3,20$) arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Taze spermada kendiliğinden, TCG solüsyonu içerisinde 1 saat inkübasyon sonrası 0. dakikada, inkübasyon sonrası akrozom reaksiyonunu uyarmak için LPC molekülünün ilavesi sonrası 20, 40 ve 60. dakikada akrozom reaksiyonuna giren spermatozoon oranları ($P>0,05$).

4. TARTIŞMA

Küresel ısınma olgusuyla birlikte, bilim insanlarının ilgisi, bu olgunun önlenmesine ve sıcak stresinin canlılar üzerinde oluşturacağı etkilerin belirlenmesine yönelmiştir. Bu doğrultuda, bilim insanları sıcak stresinin erkek fertilitesi üzerine olan olumsuz etkilerini belirlemek amacıyla, laboratuvar hayvanlarında veya evcil hayvanlarda gerek çevresel sıcaklığın artırılmasına gerek de testis dokusunun bölgesel ve suni olarak ısıtılmasına dayanan birçok çalışma tasarlamışlardır. Ancak çevresel sıcak stresine maruz bırakılan evcil hayvanların kullanıldığı çalışma sayısı (Minton ve ark 1981, Meyerhoefer ve ark 1985, Nichi ve ark 2006, Al- Ghetaa 2012), sıcak stresinin testis dokusuna suni ve bölgesel olarak uygulandığı ve laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı çalışmalara oranla çok daha azdır (Kowalczyk ve ark 1983, Setchell ve ark 1988, Yin ve ark 1997, Jannes ve ark 1998, Rockett ve ark 2001, Zhang ve ark 2002, Banks ve ark 2005, Paul ve ark 2008, Perez-Crespo ve ark 2008, Li ve ark 2008). Oysaki çevresel sıcak stresi küresel ısınmanın sonuçlarını değerlendirmek için daha uygun bir çalışma yöntemidir. Ayrıca, evcil hayvanların özellikle de koçların kullanıldığı sıcak stresi ile ilgili çalışmaların sayıca az olmasının yanı sıra, kapsam ve değerlendirilen parametreler laboratuvar hayvanlarındakilere oranla yetersizdir (Arman ve ark 2006, Saab ve ark 2011, Al- Ghetaa 2012). Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında koçların doğal ortamlarında maruz kaldıkları çevresel sıcak stresi faktörleri kullanılarak birçok spermatolojik parametrenin bir arada değerlendirilmesiyle çevresel sıcak stresinin koç spermatozoonları üzerine olası etkileri geniş bir perspektif içerisinde ele alınmıştır.

Çalışmada sıcak stresi dönemi ile kontrol dönemi arasında sperma hacimleri yönünden istatistiksel bir fark bulunmazken ($P>0,05$) sıcak stresi grubunun spermatozoon yoğunluğu daha düşük bulunmuştur ($P<0,05$). Elde edilen sonuçlar, Saab ve ark (2011)'nın yaptıkları çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir. Sıcak stresi döneminde spermatozoon yoğunluğunun düşüşü sıcak stresine bağlı olarak spermatogenezis işlemindeki aksamalara (Jannes ve ark 1998) ve testis dokusundaki hasarlanmaya bağlı olarak germ hücrelerinin özellikle sıcak stresine en duyarlı olan spermatosit ve spermatidlerin apoptozis ile elemine edilmesine bağlı olabilir (Rockett ve ark 2001).

Sıcak stresi döneminde canlı ve motil spermatozoon oranlarının daha düşük olduğu anormal spermatozoon oranının ise kontrol dönemine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir

($P<0,05$). Motil spermatozoon oranındaki bu düşüş Minton ve ark (1981)'nin elde ettikleri sonuçları desteklemektedir. Sıcak stresi döneminde motilite değerindeki düşüş artan anormal ve ölü spermatozoon oranlarına bağlı olabilir. Canlı spermatozoon oranındaki düşüş ve anormal spermatozoon oranındaki artış ise sıcak stresine bağlı olarak germ hücrelerinde şekillenen hasarlar (Rockett ve ark 2001) ve bu hasarların spermatogenezis süresince düzeltilmemesi ve/veya sıcak stresine bağlı olarak bozulan testis ve epididimis ortamında spermatozoonların uygun şekilde muhafaza edilememesine bağlı olabilir (Bedford 1991, Zhang ve ark 2002, Banks ve ark 2005, Li ve ark 2008).

Sıcak stresinin koçlarda spermatozoon membran bütünlüğü, DNA bütünlüğü, akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranları üzerine etkisi ilk defa bu tez çalışmasında ele alınmıştır. Sıcak stresi döneminde toplam (canlı ve ölü) membran bütünlüğünü korumuş spermatozoon oranı kontrol döneminden daha düşük bulunmuştur ($P<0,05$). Canlı ve membran bütünlüğünü korumuş spermatozoon oranının ise sıcak stresi döneminde kontrol dönemine göre düşük olma eğiliminde olduğu belirlenmiştir ($P=0,061$). Koçlarda spermatozoon membranı yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi içermektedir (Darin-Bennett and White 1977) ve bu durum spermatozoon membranını serbest radikallerin saldırısına ve lipid peroksidasyonuna duyarlı hale getirmektedir (Vernet ve ark 2004). Sıcak stresi nedeniyle artan serbest radikallerin (Nichi ve ark 2006) spermatozoon membranlarındaki hasarların sebebi olması oldukça muhtemeldir ve sıcak stresi dönemindeki düşük membran bütünlüğüne sahip spermatozoon oranı bu şekilde açıklanabilir.

Farelerde testislerinin bölgesel ve suni olarak ısıtılmasıyla sıcak stresi uygulanan çalışmalarda DNA hasarlı spermatozoon oranlarının arttığı rapor edilmiştir (Banks ve ark 2005, Paul ve ark 2008). Ancak, bu tez çalışmasında DNA hasarlı spermatozoon oranları yönünden sıcak stresi dönemi ile kontrol dönemi arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Bu durum çevresel sıcaklığının spermatozoonlarda DNA hasarını istatistiksel bir fark oluşturacak seviyede uyuracak kadar yükselmemiş olması ile açıklanabilir. Yapılan bir çalışmada fare testislerine bölgesel olarak uygulanan 38°C de 30 dakika sıcak stresinin istatistiksel bir fark oluşturacak kadar DNA hasarına neden olmadığı ancak daha yüksek sıcaklıkların istatistiksel fark oluşturduğu belirtilmiştir (Paul ve ark 2008). Ayrıca, koç spermatozoon DNA'sının farklı tipte protamin (sadece tip 1) içermesi nedeniyle fare spermatozoon DNA'sından daha dayanıklı ve korunaklı olduğu bilinmektedir (Balhorn

1982, Pirhonen ve ark 1994, Motoishi ve ark 1996). Bu tez çalışması sırasında Ocak ayında spermatozoonlardaki DNA hasarında dramatik bir artış olduğu fark edilmiştir. Ocak ayının üreme sezonunun sonuna rast gelmesi ve 21 Aralık gün dönümünün ardından bu durumun gözlenmesi oldukça ilginçtir. Gen ekspresyon değerlerinin çevresel etkiler tarafından değiştiği düşünülürse DNA hasarlı spermatozoon oranındaki bu artışa gün ışığı süresinin değişimiyle ekspresyonları değişen bazı genlerin sebep olduğu düşünülebilir. Ancak bu durumu izah etmek için daha ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Taze spermada kendiliğinden, seminal plazmanın uzaklaştırılmasından sonra kapasitasyonun gerçekleşmesi için 1 saat inkübasyon işlemi sonrasında, akrozom reaksiyonunu uyarmak için LPC molekülünün ilavesinden sonraki 20, 40 ve 60. dakikada akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranları açısından sıcak stresi dönemi ile kontrol dönemi arasında istatistiksel bir fark belirlenmemiştir ($P>0,05$). Ancak, dönemsel gruplandırma yapılmadan aylık ortalamalar göz önünde bulundurulduğunda özellikle Haziran ayında spermatozoonların LPC varlığında akrozom reaksiyonuna girme yeteneklerinin tüm yıl boyunca tespit edilen en düşük düzeye ulaştığı belirlenmiştir. Bu durumun, Haziran ayının (21 Haziran kuzey yarım küre için) gün dönümüne rastlaması ve yıl boyunca gün içinde en uzun süre ışık alma sürelerinin bu ay içinde yaşanması ile ilişkili olabileceği sanılmaktadır.

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular ışığında, çevresel sıcak stresinin koçlarda bazı spermatolojik parametreler üzerine olumsuz etkisinin olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Bu tez çalışması bizlere çevresel sıcak stresinin spermatozoon yoğunluğunu düşürdüğünü, spermadaki ölü ve anormal spermatozoon oranını arttırdığını, motil spermatozoon oranını düşürdüğünü ve spermatozoonların membran bütünlüğüne olumsuz etki yaptığını göstermiştir.

Çevresel sıcak stresinin bu çalışmada izlendiği boyutlarıyla sperma hacmi, DNA hasarlı spermatozoon oranı, kendiliğinden ve/veya akrozom reaksiyonunu uyarmak için kullanılan LPC molekülünün varlığında akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranları üzerine istatistiksel bir fark oluşturacak şekilde bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ancak, bu sonuçlar araştırmanın yapıldığı koşullar için bir gösterge niteliğindedir.

Bundan sonraki çalışmalarda, çevresel sıcak stresine maruz kalmış koçların spermaları kullanılarak yapılacak suni ve doğal tohumlamalardan elde edilecek sonuçlar bizlere sıcak stresinin spermatozoon kalitesini düşüren etkilerinin döl verimine nasıl yansıdığını göstermesi açısından oldukça önemlidir. Ayrıca, sıcak stresine maruz kalmış koç spermatozoonlarının dondurulabilirliğinin araştırılması bize önemli bilgiler sağlayacaktır.

ÖZET

SICAK STRESİNİN KOÇLARDA İN-VİTRO SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

Çevresel veya suni olarak uyarılmış sıcak stresinin üreme üzerine etkileri insan, fare, tavşan, boğa ve koç gibi farklı türlerde çalışılmıştır. Fakat sıcak stresinin koç spermatozoonları üzerine etkileriyle ilgili çalışmaların sayısı yetersizdir. Aynı zamanda bu çalışmalarda sıcak stresinin koçlarda bazı temel spermatolojik parametreler üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışma, çevresel sıcak stresinin koç spermatozoonları üzerine etkisini geniş bir perspektif içerisinde ortaya koymak amacıyla tasarlanmıştır.

Spermalar (n=72) altı baş olgun koçtan elektro-ejakülator yardımı ile aylık olarak yıl boyunca alınmıştır. Yılın en sıcak altı ayına (Mayıs-Ekim) ait spermalar (n=36) sıcak stresi dönemi, yılın diğer altı ayına (Kasım-Nisan) ait spermalar (n=36) ise kontrol dönemi olarak kabul edilmiştir. Bu gruplandırma ile aşım sezonu da her iki döneme eşit biçimde paylaştırılmıştır. Sıcak stresi ve kontrol dönemine ait sperma örnekleri hacim, yoğunluk, motilite, ölü-canlı spermatozoon oranı, anormal spermatozoon oranı, spermatozoon plazma membran ve DNA bütünlüğü, akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoon oranları gibi spermatolojik parametreler yönünden karşılaştırılmıştır. Sıcak stresi spermatozoon yoğunluğunu, motilitesini ve spermatozoon plazma membran bütünlüğünü düşürmüştür ($P<0,05$). Aynı zamanda, ölü ve anormal spermatozoon oranlarını arttırmıştır ($P<0,05$).

Sonuç olarak, çevresel sıcak stresi koçlarda yoğunluk, motilite, spermatozoon plazma membran bütünlüğü, canlı ve morfolojik olarak normal spermatozoon oranları gibi bazı spermatolojik parametreleri olumsuz şekilde etkilemiştir.

Anahtar Kelimeler: Koç, sıcak stresi, spermatozoon, membran bütünlüğü, DNA bütünlüğü.

SUMMARY

EFFECT OF HEAT STRESS ON IN-VITRO SPERM PARAMETERS IN RAMS

Effect of environmental or artificially induced heat stress on reproduction have been studied in different species such as human, mouse, rabbit, bull and ram. However, the number of studies related to the effect of heat stress on ram spermatozoa was not adequate. Also most of these studies have evaluated the effect of heat stress on basic sperm parameters in rams. This study was designed to evaluate the effects of environmental heat stress on ram spermatozoa in a wider perspective.

Semen (n=72) was collected from six mature rams monthly by electro-ejaculator throughout a year. Ejaculates (n=36), which were collected between May and October, were regarded as heat stressed samples and the ejaculates (n=36), which were collected in the remaining six months from November to April, were regarded as the control samples. This way of classification also provided an equal distribution of the breeding season between heat stress and control periods. Sperm samples which represent control and heat stress periods were compared for different sperm parameters such as semen volume, concentration, motility, live-dead sperm rate, abnormal sperm rate, plasma membrane and DNA integrity and percentage of acrosome reacted sperms. Heat stress decreased concentration, motility and plasma membrane integrity of sperm cells ($P<0.05$) along with an increase in the percentage of dead and abnormal sperm rates in rams ($P<0.05$).

In conclusion, environmental heat stress can affect detrimentally some sperm parameters such as concentration, motility, plasma membrane integrity of spermatozoa, along with the percentage of morphologically normal and live sperm rate in rams.

Key Words: Ram, heat stress, spermatozoon, membrane integrity, DNA integrity.

KAYNAKLAR

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 2003;79:829-843.

Ahmad E, Aksoy M, Serin İ, Küçük N, Ceylan A, Uçan U. Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. *Small Ruminant Research* 2013;115:77-81.

Aksoy M, Lehimcioğlu NC, Akman O. Effect of seminal plasma on functional integrity of rabbit sperm membranes during storage at 4°C or freezing, *World Rabbit Science* 2008;16:1-6.

Al-Ghetaa HFK. Effect of environmental high temperature on the reproductive activity of awassi ram lambs. *Iraqi Journal of Veterinary Medicine* 2012;36(2):244-253.

Arman C, Quintana Casares PI, Sanchez Partida LG, Setchell BP. Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. *Asian Journal of Andrology* 2006;8:411-418.

Balhorn R. A Model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology* 1982;93:298-305.

Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005;129:505-514.

Barth AD, Bowman PA. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *Canadian Veterinary Journal* 1994;34:93-102.

Bedford JM. Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: experimental studies. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1991;286:19-32.

Brito LFC, Silva AEDF, Barbosa RT, Kastelic JP. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology* 2004;61:511-528.

- Chen H, Cheung MPL, Chow PH, Cheung ALM, Liu W, O WS. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretion in male hamsters. *Reproduction* 2002;124:491-499.
- Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 1977;14(4):466-470.
- Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science* 2000;60(61):743-752.
- Ducci M, Gazzano A, Villani C, Cela V, Artini PG, Martelli F, Genazzani AR. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2002;102:53-56.
- Engler D, Pham T, Fullerton MJ, Ooi G, Funder JW, Clarke IJ. Studies of the secretion of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin into the hypophysial-portal circulation of the conscious sheep I. Effect of an audiovisual stimulus and insulin-induced hypoglycemia. *Neuroendocrinology* 1989;49:367-381.
- Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular Aspects of Medicine* 2004;25:199-210.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford: Clarendon Press;1989. p. 543.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine* 1991;91:14-22.
- Hancock JL. The morphology of bull spermatozoa. *The Journal of Experimental Biology* 1952;9:445-453.
- Hansen PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2009;364:3341-3350.
- Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular Human Reproduction* 1996;2:613-619.

Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility* 1992;57:409–416.

İleri İK, Ak K, Pabuccuoğlu S, Birler S. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını Ders Notu No:133. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Masaüstü Yayıncılık Ünitesi; 2002. p. 80-84.

Jannes P, Spiessens C, Van der Auwera I, D’Hooghe T, Verhoeven G, Vanderschueren D. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Human Reproduction* 1998;13:372-375.

Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Delivery Drugs Reviews* 2009;61:310-318.

Kanwar KC, Bawa SR, Singal PK. Testicular hyperthermic shocks and the boundary tissue of the semiferous tubules in rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 1974;41:201-204.

Karabinus DS, Vogler CJ, Saacke RG, Evenson DP. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of holstein bulls. *Journal of Andrology* 1997;18(5):549-555.

Kowalczyk CI, Saunders RD, Stapleton HR. Sperm count and sperm abnormality in male mice after exposure to 2.45 GHz microwave radiation. *Mutation Research* 1983;122:155-161.

Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A, Serin İ. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology* 2014;68:327-331.

Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction* 1997;2:48-54.

Larson, JL, Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular Reproduction and Development* 1999;52:445-449.

Li X, Liu Q, Liu S, Zhang X, Liu Y, Zhang Y. The spatiotemporal expression changes of 16 epididymis-specific genes induced by testosterone, heat, and combination treatment in cynomolgus monkey. *Acta Biochimica Biophysica Sinica* 2008;40:721-728.

Meyerhoeffter DC, Wettemann RP, Coleman SW, Wells ME. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. *Journal of Animal Science* 1985;60:352-357.

Mieusset R, Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. Hyperthermia and human spermatogenesis: Enhancement of the inhibitory effect obtained by “artificial cryptorchidism”. *International Journal of Andrology* 1987;10:571-580.

Minton EJ, Wettemann RP, Meyerhoeffter DC, Hintz RL, Turman EJ. Serum luteinizing hormone and testosterone in bulls during exposure to elevated ambient temperature. *Journal of Animal Science* 1981;53:1551-1558.

Motoishi M, Goto K, Tomita K, Ookutsu S, Nakanishi Y. Decondensation of bull and human sperm nuclei by dithiothreitol and/or heparine. *Journal of Reproduction and Development* 1996;42:7-13.

Nichi M, Bols PEJ, Züge RM, Barnabe VH, Goovaerts IGF, Barnabe RC. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* 2006;66:822–828.

Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *Journal of Andrology* 2001;22:316–322.

Paul C, Murray AA, Spears N, Sounders PTK. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction* 2008;136:73-84.

Perez-Crespo M, Pintado B, Guttierrez- Adan A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development* 2008;75(1):40-47.

Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Mäenpää PH. Identification of phosphoserine residues in protamines from mature mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1994;50:981-986.

Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of Reproduction* 2001;65:229–239.

Saab AS, Sleiman FT, Kallassy N, Darweesh WY, Aad PY. Effect of adaptation and heat stress on reproductive performances of fat-tail awassi rams in eastern mediterranean. *Lebanese Science Journal* 2011;12(1):31-44.

Saunders RD, Kowalczyk CI. Effects of 2.45 GHz microwave radiation and heat on mouse spermatogenic epithelium. *International Journal of Radiation Biology* 1981;40:623-632.

Setchell BP, Breed WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: Neill JD (Ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, San Diego, USA: Elsevier; 2006. p. 771-825.

Setchell BP, D'Occhio MJ, Hall MJ, Laurie MS, Tucker MJ, Zupp JL. Is embryonic mortality increased in normal female rats mated to subfertile males? *Journal of Reproduction and Fertility* 1988;82:567-574.

Setchell BP. The effects of heat on the testes of mammals. *Animal Reproduction* 2006;3(2):81-91.

Tekin N. Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. In: Alaçam E. (Eds.) *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'ı Tohumlama Doğum ve İnfertilite*. 1. Baskı. Konya: Dizgievi; 1994. p. 69-79.

Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction* 2000; 5: 105–113.

Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004;216:31–39.

Waites GMH, Setchell BP. Effects of local heating on blood flow and metabolism in the testis of the conscious ram. *Journal of Reproduction and Fertility* 1964;8:339-349.

Yin Y, Hawkins KL, Dewolf WC, Morgentaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *Journal of Andrology* 1997;18:159-165.

Zhang RD, Wen XH, Kong LS, Deng XZ, Peng B, Huang AP, Wan Y, Yang ZW. A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchiopexy on spermatogenesis in adult rabbit testis. *Reproduction* 2002;124:95-105.

Zhu BK, Walker SK, Oakey H, Setchell BP, Maddocks S. Effects of paternal heat stress on the development of in-vitro preimplantation embryos in the mouse. *Andrologia* 2004;36:384-394.

Zini A, Abitbol J, Girardi SK, Schulsinger D, Goldstein M, Schlegel PN. Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression following ischemia-reperfusion injury to testis. *Archives of Andrology* 1998;41:57-65.

ÖZGEÇMİŞ

20.06.1984 tarihinde İzmir ili Ödemiş ilçesi Zeytinlik beldesinde doğdum. İlköğrenimimi Zeytinlik beldesinde orta öğrenimimi Ödemiş ilçesinde tamamladım. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım. 2007 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldum. 2008 yılında yedek subay olarak askerlik görevimi icra ettim. 28.01.2010 tarihinde Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Bir dönem sonra Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bölümünde Doktora öğrenimime başladım. 05.05.2012 tarihinde sevgili eşim Zeynep Küçük ile evlendim. 10.02.2015 tarihinde sevgili kızım Elif Ekin Küçük doğdu. Araştırma Görevlisi olarak çalıştığım süre içerisinde bir tanesinde ilk isim olmak üzere uluslararası dergilerde 3, ulusal dergilerde ise 1 adet makalem yer aldı. İkiisi ilk isim olmak üzere altı adet yurtiçi, iki adet yurtdışı kongrede bildirim yayımlandı. Halen Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalındaki görevimi sürdürmekteyim.

TEŞEKKÜR

Bu zorlu dönemde benden desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim Zeynep KÜÇÜK' e, bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana her zaman yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Melih AKSOY' a, tezin çalışma aşamasında bana yardımcı olan doktora öğrencilerimiz Ejaz AHMAD, Zahid NASEER ve Uğur UÇAN' a, kürsümüzdeki diğer hocalarım Prof. Dr. Ahmet CEYLAN ve Doç. Dr. İlker SERİN' e teşekkürlerimi sunarım.