



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FARKLI KONSANTRASYONLARDA ORTAMA EKLENEN  
SPERMİNİN DONDURULMUŞ BOĞA SPERMASININ  
İN VİTRO KAPASİTASYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Özge SABUNCULAR**

**DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Kemal Tuna OLĞAÇ**

**ANKARA  
2024**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KONSANTRASYONLARDA ORTAMA EKLENEN  
SPERMİNİN DONDURULMUŞ BOĞA SPERMASININ  
İN VİTRO KAPASİTASYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ

Özge SABUNCULAR

DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Kemal Tuna OLĞAÇ

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun  
TDK-2023-2019 kodlu projesi ile desteklenmiştir

ANKARA

2024

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Farklı Konsantrasyonlarda Ortama Eklenen Sperminin Dondurulmuş Boğa Spermasının İn Vitro Kapasitasyonu Üzerine Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Özge SABUNCULAR

Tarih: 14.06.2024

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında  
Özge SABUNCULAR tarafından hazırlanan  
“Farklı Konsantrasyonlarda Ortama Eklenen Sperminin Dondurulmuş Boğa Spermasının İn Vitro Kapasitasyonu Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından  
DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:14/06/2024

İmza

Prof.Dr. ONGUN UYSAL

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof.Dr. İLKER YAVAŞ

Mustafa Kemal Üniversitesi

İmza

Doç.Dr. MURAT ONUR YAZLIK

Ankara Üniversitesi

İmza

Doç.Dr. UFUK KAYA

Mustafa Kemal Üniversitesi

RAPORTÖR

İmza

Dr.Öğr. Üyesi KEMAL TUNA OLĞAÇ

Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof.Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### Farklı Konsantrasyonlarda Ortama Eklenen Sperminin Dondurulmuş Boğa Spermasının İn Vitro Kapasitasyonu Üzerine Etkisi

Poliaminler, memeli fizyolojisinde çok sayıda temel rol oynayan, vücudun her bölgesinde görev alan küçük temel moleküllerdir. Memelilerde spermin, spermidin, putresin ve kadaverin olmak üzere dört tip poliamin bulunmaktadır. Poliaminler hücre proliferasyonunda önemli roller üstlenir. Hücre büyümesi ve farklılaşmasında görevlidir. Poliamin sentezinin gerçekleştiği bölgelerden olan testiste germinal hücrelerin farklılaşmasında görev aldığı bildirilmiştir. Poliaminlerin spermatozoon içinde bulunduğu keşfedilmiş; motilite, kapasitasyon, DNA'nın korunması ve in vitro fertilizasyonu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Çalışmada 30 baş Holstein ırkı boğaya ait ticari dondurulmuş sperma örnekleri çözdürüldükten sonra in vitro fertilizasyon tekniğiyle hazırlandı. Ardından 0 mM (kontrol), 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM ve 1 mM spermin eklenen beş deney grubu oluşturularak 0, 1 ve 4 saat 38,5 °C'de inkübasyona bırakıldı. Kontrol ve deney grubu boğa spermaları inkübasyon süreleri sonunda motilite, progresif motilite, spermatozoon hareket özellikleri (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF ve Hiperaktivite), plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI), mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ve kapasitasyon indeksi (Ci) parametreleri açısından muayene edildi. Motilite genel ortalaması (P=0,04) ve progresif motilite 4. saat kontrolleri (p<0,001) değerlendirildiğinde 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM dozları kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Diğer gruplarda zamana göre istatistiksel olarak anlamlı düşme görülürken 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM deney grupları progresif motiliteyi korumada daha etkili oldu (p<0,001). VAP ve VSL parametreleri 4. saat kontrolünde en yüksek değer 0,01 mM spermin eklenen, en düşük değer 1 mM spermin eklenen grupta belirlendi ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,001). Diğer hareket parametrelerinde ise sonuçların istatistiksel olarak kontrol grubuyla benzer olduğu belirlendi. Plazma membran bütünlüğü ve akrozom sağlamlığı, yüksek mitokondriyal membran potansiyeli ve kapasitasyon indeksi parametrelerinde deney gruplarıyla kontrol gurubu arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak benzer bulundu ancak bahsedilen parametrelerin genel ortalama değişimleri zaman ilişkisi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,001). Buna göre plazma membran bütünlüğü, akrozom sağlamlığı ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeli parametreleri zamana göre anlamlı düşüş gösterirken (P<0,001) kapasitasyon indeksinin zamana göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi (p<0,001). Sonuç olarak farklı spermin dozlarının spermatozoa motilite yeteneğini artırdığı ancak mitokondriyal membran potansiyeli, plazma membranı ve akrozom bütünlüğü, kapasitasyon indeksini etkilemediği görüldü. Kapasitasyon medyumuna eklenen sperminin boğa spermatozoon parametreleri üzerine etkisinin ortaya konulması ilk kez yapılan tez çalışması ile gerçekleştirildi. Sperminin boğa spermatozoon parametreleri üzerine etkilerinin farklı çalışmalarla da ortaya konması, in vitro fertilizasyonda kullanılabilirliği konusunda araştırmaların, daha yüksek spermin dozları kullanılarak geliştirilmesi önerilmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Boğa Sperması, İn Vitro Fertilizasyon, İnkübasyon, Kapasitasyon, Spermin

## SUMMARY

### **The Effect of Spermine Added to the Medium at Different Concentrations on the In Vitro Capacitation of Frozen Bull Semen**

Polyamines are small, basic molecules that play many essential roles in mammalian physiology and are involved in every part of the body. In mammals, there are four types of polyamine molecules: spermine, spermidine, putrescine, and cadaverine. Polyamines play important roles in cell proliferation. They are involved in cell growth and differentiation. The testis, another location where polyamine synthesis occurs, has been reported to be involved in the differentiation of germinal cells. It has been discovered that polyamines are present in spermatozoon; It has been shown to positively affect motility, capacitation, DNA protection and in vitro fertilization. In the study, commercial frozen semen samples from 30 Holstein bulls were thawed and prepared using the in vitro fertilization technique. Then, a control and five experimental groups to which 0 mM (control); 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM; and 1 mM spermine were added, were incubated at 38.5 °C for 0, 1, and 4 hours. At the end of the incubation periods, control and experimental group bull semen was evaluated for motility, progressive motility, spermatozoon movement characteristics (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF and Hyperactivity), plasma membrane and acrosome integrity (PMAI), mitochondrial membrane potential (MMP), and capacitation index (Ci) parameters. The average motility ( $P=0,04$ ) and progressive motility at the 4th hour ( $P<0,001$ ) were found to be higher for the doses of 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM compared to the control group. Although a statistically significant decrease over time was observed in other groups, the 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM experimental groups were more effective in maintaining progressive motility ( $P<0,001$ ). VAP and VSL parameters had the highest values in the group with 0,01 mM spermine added at the 4th hour control, and the lowest in the group with 1 mM spermine added, with the difference found to be statistically significant ( $p<0,001$ ). In other movement parameters, the results were determined to be statistically similar to the control group. Differences between the experimental groups and the control group in terms of plasma membrane integrity, acrosome integrity, high mitochondrial membrane potential, and capacitation index were found to be statistically similar. However, the overall average changes of the mentioned parameters were found to be statistically significant in terms of the time relationship ( $p<0,001$ ). Accordingly, while the parameters of plasma membrane integrity, acrosome integrity, and high mitochondrial membrane potential showed a significant decrease over time ( $P<0,001$ ), the capacitation index was determined to show a significant increase over time ( $p<0,001$ ). As a result, it was observed that different spermine doses increased the spermatozoon motility ability but did not affect the mitochondrial membrane potential, plasma membrane and acrosome integrity, and capacitation index. This is the first study to reveal the effect of sperm added to capacitation medium on bull spermatozoon parameters. It is recommended that the effects of spermine on bull spermatozoon parameters be demonstrated in different studies and that research on its usability in in vitro fertilization should be developed using higher spermine doses.

**Keywords:** Bull Semen, Capacitation, In Vitro Fertilization, Incubation, Spermine

# İÇİNDEKİLER

|  |           |
|--|-----------|
| Etik Beyan   | ii        |
| Kabul ve Onay  | iii       |
| Özet   | iv        |
| Summary  | v         |
| İçindekiler  | vi        |
| Önsöz  | vii       |
| Simgeler ve Kısaltmalar  | ix        |
| Şekiller   | xii       |
| Çizelgeler   | xiii      |
| <b>1. GİRİŞ</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Boğalarda Reprodüktif Anatomi                                 | 4         |
| 1.2. Boğalarda Reprodüktif Fizyoloji                               | 6         |
| 1.3. Sığırlarda İn Vitro Fertilizasyon (IVF)                       | 9         |
| 1.4. İn Vitro Ortamda Spermatozoanın Hazırlanması ve Kapasitasyonu | 10        |
| 1.5. Spermin   | 12        |
| 1.5.1. Sperminin Reprodüksiyon Alanındaki Görev ve Etkileri        | 14        |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>  | <b>18</b> |
| 2.1. Materyal  | 18        |
| 2.2. Spermatozoon Seçilimi ve Kapasitasyon Medyumuna Aktarılması   | 18        |
| 2.3. Sperma Örneklerinin Gruplandırılması                          | 18        |
| 2.4. İnkübasyon Sonu Spermatolojik Analizler                       | 19        |
| 2.4.1. Spermatozoon Hareket Özellikleri                            | 19        |
| 2.4.2. Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğü                         | 20        |
| 2.4.3. Kapasitasyon İndeksi  | 21        |
| 2.4.4. Mitokondriyal Aktivite                                      | 22        |
| 2.5. İstatistiksel Analiz  | 23        |
| <b>3. BULGULAR</b>   | <b>24</b> |
| <b>4. TARTIŞMA</b>   | <b>31</b> |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>  | <b>41</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>   | <b>43</b> |

## ÖNSÖZ

Türk kültür tarihinin izi sürülmek istendiğinde tarım ve hayvancılığın tarihte önemli yeri olduğu görülmektedir. Hayvancılık bir yandan ekonomik olarak sürdürülürken diğer yandan hayvanlardan besin kaynağı ve iş gücü olarak yararlanılmıştır. Göbekli Tepe Höyüğü'nde sığır tasvirlerinin bulunması, yabani sığırların en az on iki bin yıl önce Anadolu'da yaşadığını göstermektedir. Göçerevli hayat tarzında yaşayış şekli hayvanlara göre ayarlanırken sonralarda yerleşik hayat ve tarıma geçişin başlamasıyla yabani sığırlar evcilleştirilmeye başlanmıştır. Mevcut kanıtlara göre sığırların evcilleştirilmesinin M.Ö 10.000 yıllarında neolitik dönemde başladığı söylenebilir. Bundan sonra sığır sadece gıda kaynağı olmaktan çıkarak toprağın sürülmesinde esas faktör olmuştur. Böylece yerleşik yaşamda hayvancılık Türk tarihindeki önemini korumaya devam etmiştir. Sığırların Türk mitolojisinde, efsanelerinde ve masallarında geniş yer bulması; Oğuz Kağan, Dede Korkut Boyları, Manas, Er Töştük ve Maaday Kara Destanlarına konu olması da bu türün tarihte ne kadar önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Sığırların evcilleştirilmesiyle tarımda gücünden, et, süt ve deri veriminden yararlanılabilmesi insanlık için büyük faydalar sağlamıştır. Bu süreçte sığırlar morfoloji, fizyoloji ve davranış olarak insan yaşamına uyum sağlamıştır. Döl verimi ve diğer verim özelliklerini iyileştirmek için insanlar tarafından uygulanan yapay seleksiyonlara tabi tutulmuştur. Sonuç olarak, dünyada farklı özelliklere sahip 900'den fazla sığır ırkı meydana gelmiştir. Günümüzde seleksiyon gerçekleştirmek için yöntem olarak yardımcı üreme teknikleri kullanılmaktadır.

Suni tohumlama, çiftlik hayvanlarının ıslahında en yaygın kullanılan ve en etkili yöntem olmasına rağmen embriyonun daha fazla üretilmesi ve embriyo üretimiminin daha ekonomik olması gibi avantajları sebebiyle in vitro fertilizasyon tekniğinin kullanımı tercih edilebilmektedir. Ancak İn vitro fertilizasyon-Embriyo transferi (IVF-ET) teknolojisinde büyük gelişmeler olduğu halde gebe kalma ve doğum oranlarının hala düşük kaldığı görülmektedir. İn vitro fertilizasyon yoluyla başarılı bir fertilizasyon elde etmek için iyi kaliteye sahip spermlerin kullanımı oldukça önemlidir

Poliaminlerin farklı türlerde sperma viabilitesi, motilitesi, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu üzerine pozitif etkilerini bildiren bazı çalışmalar yapılmıştır. Poliaminlerin bu etkileri göz önüne alınarak in vitro fertilizasyon uygulamalarında sperma inkübasyonuna katkı sağlayacağı, özellikle kapasitasyon indeksini artırabileceği öngörülmüştür. Tez çalışmasında in vitro fertilizasyon uygulamalarına göre hazırlanmış boğa spermasının kapasitasyon medyumuna spermin eklenmiştir. Diğer spermatolojik parametreler korunduğu halde kapasitasyon kontrollü olarak indüklenerek sperm motilite ve spermatozoon kinetik parametreleri (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF ve Hiperaktivite), sperm plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI), mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ve kapasitasyon indeksi ortaya konmuştur. Bu çalışma, boğa spermasının in vitro kapasitasyonu aşamasında spermin etkisinin incelendiği ilk çalışmadır.

Bu araştırma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun "Farklı Konsantrasyonlarda Ortama Eklenen Sperminin Dondurulmuş Boğa Spermasının İn Vitro Kapasitasyonu Üzerine Etkisi" başlıklı ve TDK-2023-2919 kodlu projesi ile desteklenmiştir.

Doktora tezimin başlangıcından tamamlanmasına kadar geçen süreç boyunca çalışmalarımda tüm samimiyeti bilgi, ilgi ve tecrübesiyle benden desteğini esirgemeyen danışmanım sayın Dr. Öğretim Üyesi Kemal Tuna OLĞAÇ'a; emeklerini ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Araş. Gör. Beste ÇİL'e; Anabilim Dalı doktora öğrencileri Mert GÖÇER, Elif Bersu GÜL, Hatice Kübra Nur BORAN ve yüksek lisans öğrencisi Amila Dilan GİRİŞ'e; Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nın tüm akademik ve idari personeline; her zaman yanımda hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| %                             | Yüzde   |
| (M x D)ij                     | Madde ve doz etkileşimi                       |
| <                             | Küçüktür                                      |
| >                             | Büyüktür                                      |
| 10 <sup>6</sup>               | Milyon  |
| ABP                           | Androjen Bağlayıcı Protein                    |
| AcCoA                         | Asetil Koenzim A                              |
| AcSPD                         | N1-asetilspermidin                            |
| AcSPM                         | N1-asetilspermin                              |
| AdoMetDC                      | Adenozilmetionin Dekarboksilaz                |
| ALH                           | Yalpalama büyüklüğü                           |
| APAO                          | N1-asetilpoliamin oksidaz                     |
| ATP                           | Adenozin Trifosfat                            |
| β                             | Beta  |
| BCF                           | Kesişim frekansı                              |
| BO                            | Brackett-Oliphant Medyum                      |
| BSA                           | Sığır Serum Albumini                          |
| BWW                           | Biggers-Whitten-Whittingham Medyum            |
| C                             | Santigrat                                     |
| cAMP                          | Siklik Adenozin Monofostaf                    |
| CASA                          | Bilgisayar destekli sperma analizi            |
| cm                            | Santimetre                                    |
| CO <sub>2</sub>               | Karbondioksit                                 |
| Dj                            | Doz etkisi                                    |
| DNA                           | Deoksiribonükleik Asit                        |
| eijk                          | Hata terimi                                   |
| FITC-PI-                      | Plazma ve akrozomal membran bütünlüğü korunan |
| FITC-PNA                      | fluorescein isothiocyanate peanut agglutinin  |
| FSH                           | Folikül Stimüle Edici Hormon                  |
| μ                             | Genel ortalama                                |
| g                             | Gravite                                       |
| GAG                           | Glikozaminoglikanlar                          |
| GnRH                          | Gonadotropin Salgılatıcı Hormon               |
| GTP                           | Guanozin Trifosfat                            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen peroksit                             |

|         |   |
|---------|---|
| HMMP    | Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli    |
| IVF     | In Vitro Fertilizasyon                      |
| IVF-ET  | In Vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferi |
| KRB     | Krebs Ringer Bikarbonat Medyum              |
| LH      | Lüteinleştirici Hormon                      |
| LIN     | Çizgisellik                                 |
| m       | Metre                                       |
| Mi      | Madde etkisi                                |
| µl      | Mikrolitre                                  |
| ml      | Mililitre                                   |
| mm      | Milimetre                                   |
| mDM     | Modify Defined Medyum                       |
| µM      | Mikromolar                                  |
| mM      | Milimolar                                   |
| M.Ö.    | Milattan önce                               |
| mM      | Milimolar                                   |
| MMP     | Mitokondriyal membran potansiyeli           |
| mRNA    | Mesajcı Ribonükleik Asit                    |
| °       | Derece                                      |
| ODC     | Ornitin Dekarboksilaz                       |
| ORN     | Ornitin                                     |
| PA      | Poliamin                                    |
| PBS     | Fosfatlı tampon solüsyon                    |
| pH      | Hidrojen gücü                               |
| PI      | Propidium Iodide                            |
| PMAI    | Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğü         |
| PMOT    | Progresif motilite                          |
| PUT     | Putresin                                    |
| RNA     | Ribonükleik Asit                            |
| s       | Saniye                                      |
| SCA®    | Sperm Class Analyzer                        |
| SMO     | Spermin Oksidaz                             |
| SMS     | Spermin Sentaz                              |
| Sp TALP | Sperm Tyrode'nin Albumin Laktat Piruvat     |
| SPD     | Spermidin                                   |
| SPDS    | Spermidin Sentaz                            |
| SPM     | Spermin                                     |
| STR     | Doğrusallık                                 |
| SSAT    | Spermidin/Spermin N1-Asetiltransferazın     |

|      |                                   |
|------|-----------------------------------|
| TALP | Tyrode'nin Albumin Laktat Piruvat |
| TMOT | Total motilite                    |
| VAP  | Ortalama yol hızı                 |
| VCL  | Eğri-izgisel hız                 |
| VSL  | Doğru-izgisel hız                |
| WHO  | Dünya Sağlık Örgütü               |
| WOB  | Yalpalama                         |
| Yijk | Bağımlı değişken                  |



## ŞEKİLLER

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 1.1.</b> Sığırdan elde edilen yan ürünlerin kullanım alanları  | 2  |
| <b>Şekil 1.2.</b> Testisin katmanları: Vt-Tunika vaginalis viseralis, Pt-Tunika vaginalis parietalis, Vc-Vajinal kavite, Sc-Spermatik kord, Sr-Skrotum  | 4  |
| <b>Şekil 1.3.</b> Boğa testis germinal epitelinin şematik gösterimi. (a): mayoz I sırasında birincil spermatositlerin çok aktif bir şekilde ikincil spermatositlere dönüşmesi ve mayoz II'nin mayotik bölünmesinin tamamlanması ve spermatidlerin oluşumu. (b): farklılaşmaya uğramış spermatidlerden ortaya çıkan serbest spermatozoa  | 8  |
| <b>Şekil 1.4.</b> Poliamin metabolik yolağındaki hedefler. Poliamin metabolizmasının enzim ağıını, substratlar arası dönüşümü ve inhibitör hedeflerini gösteren PA metabolizmasının şematik gösterimi   | 14 |
| <b>Şekil 2.1.</b> Çözüm sonu spermatozoa motilite, progresif motilite ve spermatozoon kinetik parametrelerinin belirlenmesi   | 19 |
| <b>Şekil 2.2.</b> Spermtozoa plazma membran ve akrozom bütünlüğünün flow sitometri ile belirlenmesi (FITC-PI+, plazma membran bütünlüğü bozulmuş akrozom bütünlüğünü koruyan hücre; FITC-PI-, plazma membran ve akrozom bütünlüğünü koruyan hücre; FITC+PI-, plazma membran bütünlüğünü koruyan akrozom bütünlüğü bozulmuş hücre; FITC+PI+, plazma membran ve akrozom bütünlüğü bozulmuş hücre) | 20 |
| <b>Şekil 2.3.</b> Spermatozoa kapasitasyon indeksinin flow sitometri ile belirlenmesi (Fluo +, Fluo 4 boyasını almış, kapasite olmuş spermatozoa; Fluo -, Fluo 4 boyasını almamış, kapasite olmayan spermatozoa)  | 21 |
| <b>Şekil 2.4.</b> Spermatozoa mitokondriyal membran potansiyelinin flow sitometri ile belirlenmesi (HMMP, yüksek mitokondriyal membran potansiyeli; LMMP, düşük mitokondriyal membran potansiyeli)  | 22 |

## ÇİZELGELER

|   |    |
|---|----|
| <b>Çizelge 1.1.</b> 1930-2000 Yılları arasında Türkiye’de bulunan toplam sığır varlığı (Baş)  | 3  |
| <b>Çizelge 1.2.</b> Yıllara Göre Türkiye’deki Kültür, Melez, Yerli Sığır Varlığı (Baş)  | 3  |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Çözüm sonu motilite, progresif motilite ve spermatozoon kinetik parametreleri   | 25 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> İnkübasyon sonucu kontrol ve deney gruplarına ait motilite, progresif motilite, VCL, VAP, VSL parametreleri                                     | 26 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> İnkübasyon sonucu STR, LIN, WOB, ALH, BCF ve Hiperaktivite parametreleri  | 27 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> İnkübasyon sonucu kontrol ve deney gruplarına ait plazma membran ve akrozomal membran bütünlüğünü koruyan sperma oranları                       | 28 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> Spermatozoon kapasitasyon medyumuna alındıktan 0, 1 ve 4 saat sonra plazma ve akrozomal membran bütünlüğünü koruyan spermatozoon oranı          | 28 |
| <b>Çizelge 3.6.</b> İnkübasyon sonucu kontrol ve deney gruplarına ait kapasitasyon ve yüksek mitokondrial membran potansiyeli ortalamaları                          | 29 |
| <b>Çizelge 3.7.</b> Spermatozoon kapasitasyon medyumuna alındıktan 0, 1 ve 4 saat sonra yüksek mitokondriyal membran potansiyeli (HMMP) gösteren spermatozoon oranı | 30 |
| <b>Çizelge 3.8.</b> Spermatozoon kapasitasyon medyumuna alındıktan 0, 1 ve 4 saat sonra kapasitasyonu gerçekleştiren spermatozoon oranı                             | 30 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Tez çalışması ile farklı çalışmaların spermatozoa kapasitasyon oranlarının karşılaştırması  | 39 |

# 1. GİRİŞ

Sığır, yetiştiriciliği yaygın olan ve tüm dünyada kullanılan bir hayvan türüdür. (Karayel, 2018). Canlılar alemindeki yeri şu şekildedir:

|             |   |
|-------------|---|
| Alem        | : Hayvanlar (Animale)                       |
| Şube        | : Kordalılar (Chordata)                     |
| Alt şube    | : Omurgalılar (Vertebrata)                  |
| Sınıf       | : Memeliler (Mammalia)                      |
| Alt sınıf   | : Plasentalılar (Placentalia)               |
| Takım       | : Tırnaklılar (Ungulata)                    |
| Alt takım   | : Çift tırnaklılar (Artiodactyles)          |
| Grup        | : Geviş getirenler (Ruminantia)             |
| Familya     | : Boş boynuzlular (Bovidae)                 |
| Alt familya | : Bovinae (Sığır benzerleri)                |
| Cins        | : Bos (Geniş anlamda sığırlar)              |
| Alt cins:   |   |
|             | 1. Bubalina (Mandalar)                      |
|             | 2. Bisontina (Bizonlar)                     |
|             | 3. Bibovina (Bibos sığırları)               |
|             | 4. Taurina (Gerçek sığırlar)                |
| Tür         | : Bos taurus (Evcil sığır) (Erenler, 2016). |

Sığır, büyükbaş evcil ruminantların genel adıdır. Kelimenin kökü, sağ fiiliyle ilişkili olup süt sağımıyla ilgili olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (Koç, 2016). Mevcut kanıtlar sığırların evcilleştirilmesinin M.Ö 10.000 yıllarında neolitik dönemde başladığını göstermektedir. Evcilleşmeyle birlikte sığırlar morfoloji, fizyoloji ve davranış olarak insan yaşamına uyum sağlamıştır. Tarımda iş gücü olarak kullanılması; et, süt ve deri veriminden yararlanılması insanlık için büyük faydalar sağlamıştır (Qanbari vd., 2014).

Nüfusun ve gıdaya olan talebin her geçen gün hızla arttığı dünyada hayvancılık, insanların dengeli ve sağlıklı beslenmesi açısından oldukça önemlidir (Çalışkan, 2021; Ergün ve Bayram, 2021). Türkiye’de hayvansal protein ihtiyacını karşılamak için çokça tüketilen kırmızı et; kaynak olarak sığır, manda, koyun ve keçiden elde edilmektedir. Kişi başına

tüketilen sığır eti ortalama 10,7 kg iken koyun eti 1,5 kg olarak belirlenmiştir. Bununla ilişkili olarak sığırlardan elde edilen kırmızı et üretimi diğer kaynaklara oranlandığında %90'dan fazladır (Konyalı ve İnan, 2018; Köseoğlu ve Güner, 2021). Sığır türünün önemli verim özelliklerinden olan süt ve süt ürünleri de temel protein kaynaklarından biridir. Üretimi gerçekleşen toplam sütün %52,8'i süt ürünlerinde kullanılmak üzere sanayide işlenmektedir. İşlenen süttten yaygın olarak sırasıyla peynir, tereyağı ve sütozu üretimi gerçekleştirilmektedir (Terin, 2014).

Sığırlar, et ve süt verimlerinin yanı sıra elde edilen yan ürünlerle ekonominin önemli bir kolu olmuştur. Sanayiye hammadde temininde büyük payı bulunan önemli bir kaynaktır. Hayvansal yan ürünler gıda, boya ve kimya sanayide geniş kullanım alanı bulmaktadır. Kullanıldığı alanların bazıları yem maddesi üretimi, sabun üretimi, enerji üretimi, gübre ve toprak düzenleyicilerin üretimi, biyogaz dönüşümü, jelatin ve kolajen üretimi, tekstil ürünleri üretimi olarak sayılabilir. Hayvansal ürünlerden bazıları Şekil 1.1.'de gösterilmiştir (Çalışkan, 2021; Ergün ve Bayram, 2021; Resmi Gazete, 2011; Tarımorman, 2014). Bahsedilen faydaları sebebiyle özellikle sığır yetiştiriciliği, dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça önemli bir yere sahiptir (Konyalı ve İnan, 2018; Köseoğlu ve Güner, 2021).



Şekil 1.1. Sığırdan elde edilen yan ürünlerin kullanım alanları

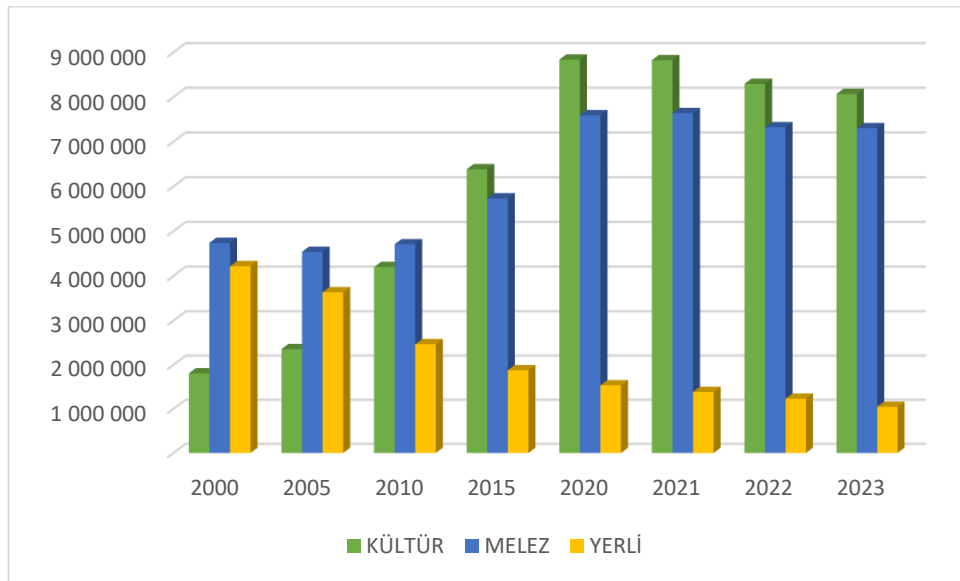
Osmanlı Devleti'nde çiftçilikte kullanılmak üzere büyükbaş hayvan yetiştiriciliği yapılmıştır. O dönemlerde büyükbaş hayvanlar tarlaların ekime hazırlanması işinde kullanılmış ve gücünden yararlanılmıştır. Hayvanlardan elde edilen ürünleri çiftçilerin kendi ihtiyaçları için kullanılmıştır (Göktepe, 2018).

Cumhuriyet döneminde hayvancılığın geliştirilmesi yönünde bazı adımlar atılmıştır. Bu dönemde verim değeri yüksek olan Montofon ırkı boğa ve inekler ithal edilmiştir. Sığır varlığı 1930-1980 yılları arasında sürekli artış gösterirken 1980'dan 2000 yılına kadar azalma göstermiştir. Sonrasında sığır yetiştiriciliğinin desteklenmesi yönündeki politikalar eşliğinde ülkedeki sığır varlığına kültür ve kültür melezi ırklar dahil olmuş, 2021 yılına kadar bu ırkların sayısı artış göstermiştir (Çalışkan, 2021). 2021 sonrasında kültür ve kültür melezi sığır varlığında azalma dikkati çekmektedir. Yerli sığır varlığına bakıldığında 2000 yılından günümüze kadar devamlı düşüş gösterdiği görülmektedir (Tüik, 2023). Yıllara göre Türkiye'de bulunan sığır varlığı Çizelge 1.1. ve Çizelge 1.2.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.** 1930-2000 Yılları arasında Türkiye'de bulunan toplam sığır varlığı (Baş)

| YIL          | 1930     | 1940     | 1950      | 1960      | 1970      | 1980      | 1990      | 2000      |
|--------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SIĞIR SAYISI | 4,735,00 | 9,759,28 | 10,123,18 | 12,435,00 | 12,756,00 | 15,894,00 | 11,377,00 | 10,761,00 |

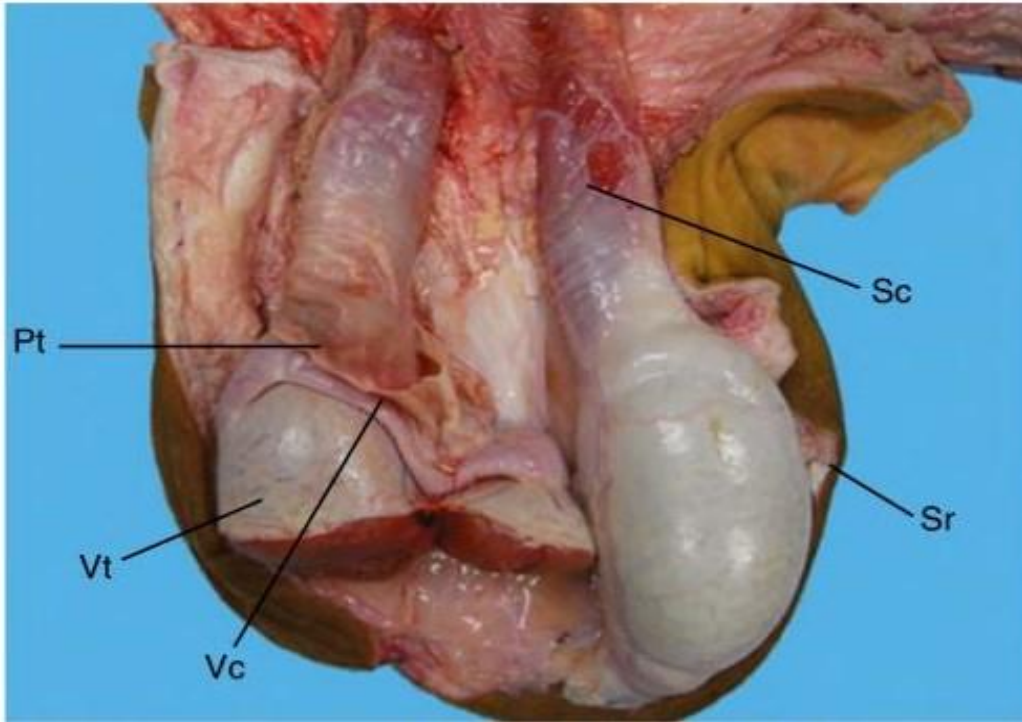
**Çizelge 1.2.** Yıllara Göre Türkiye'deki Kültür, Melez, Yerli Sığır Varlığı (Baş)



Günümüzde hayvansal üretim, hayvan başına görülen üretim miktarı ve hayvan sayısı temel alınarak değerlendirilmektedir. Hayvanın tanınması ve potansiyelinin bilinmesi ekonomik olarak yüksek verimli hayvanlar yetiştirebilmek için önemli bir husustur. İlişkili olarak hayvanlara ait yeterli bilgiye sahip olmak gerekmektedir (Varışlı ve Akyol, 2018).

### 1.1. Boğalarda Reprodüktif Anatomi

Testisler skrotum ile çevrilmiştir. Skrotum inguinal bölgede femurlar arasında asılı olup eksternal ve internal katmanlardan oluşmaktadır. Eksternal kat deri, tunika dartos, fascia perinealis superficialis, fascia spermatika eksterna, kremaster, fascia spermatika interna ve tunika vaginalis parietalisten oluşur. İçerde ise testis tunica vaginalis viseralis ve tunika albuginea katmanlarınca sarılıdır (Şekil 1.2.). Testis tunika dartos ve musculus cremaster aracılığıyla vücuda yaklaşıp uzaklaşmakta, böylece testisin ısı kontrolü sağlanmaktadır. Tunika dartosun uzantısı scrotumu bölerek 2 kese oluşturmaktadır. Termal reseptörler ve sinir lifleri ile büyük ter ve yağ bezleri içeren oldukça damarlı bir yapıdır. Bu yapılar kasılıp gevşeme yoluyla veya terleme yoluyla skrotal yüzeyin soğumasında görev alarak testis termoregülasyonu ve fonksiyonunun korunmasında önemli rol oynar.



**Şekil 1.2.** Testisin katmanları: Vt-Tunica vaginalis viseralis, Pt-Tunica vaginalis parietalis, Vc-Vajinal kavite, Sc-Spermatik kord, Sr-Skrotum (Hopper, 2021)

Boğalarda testisler ortalama olarak 8-16 cm uzunluğunda ve 5-10 cm çapındadır. Spermatozoon üretimi hakkında fikir verdiğinden testis ölçüleri oldukça önemlidir. Spermatogenezis ve steroid hormonların üretimi testis paraneşiminde gerçekleşmektedir. Paraneşim dokuda sertoli hücreleri ve spermatogonyumları bulunduran seminifer tübüller, seminifer tübüller arasına yerleşmiş Leydig hücreleri bulunmaktadır. Seminifer tübüller, spermatozoonun epididimise transportunu sağlayan rete testise açılmaktadır (Fayrer-Hosken, 1997; Hopper, 2021).

Testisteki spermatozoon seminifer tübüller, rete testis, duktus efferentes, epididimis, duktus deferens ve uretra sisteminden taşınır. Spermatozoonun olgunlaşması ve depolanması, spermatozoon motilite yeteneği kazandıracak sıvıların üretimi bu sistem boyunca sağlanmaktadır. Efferent kanallar testisin dışında epididimisle devam etmektedir. Epididimis rete testis ve vas deferens birleştiren çok kıvrımlı bir kanaldır. Testis fibröz bağ dokusuna birleşik bulunur (Fayrer-Hosken, 1997). Kranialde kaput, orta bölümde corpus ve kaudalde cauda olmak üzere üç bölümdür. Kauda epididimis duktus deferens olarak devam etmekte ve sonunda ampulla adında bir genişleme yaparak uretraya bağlanmaktadır (Fayrer-Hosken, 1997; Hopper, 2021).

Spermatik kord; duktus deferens, vasküler ve lenfatik damarlar ile testis ve epididimis sinirlerini kapsamaktadır. Karın boşluğu içindeki vajinal katmandan testislere kadar uzanmakta ve tunika vajinalis içindeki dokulardan oluşmaktadır. Testisleri vücuda bağlamakta ve testisleri destekleyen vasküler, nöral ve lenfatik sistemler için vücut boşluğuna geçiş sağlamaktadır. Spermatik kord, testisleri destekleyen birincil kas olan kremaster kasını, testiküler bir damar sarmalı olan ve ters akımlı bir sistemle sıcaklık değişimini sağlayan pampiniform pleksusu içermektedir (Hopper, 2021). Bu sistemler testis ortamının ısısının düzenlenmesinde ve testis paraneşiminin sıcaklığını vücut sıcaklığından 4-5°C düşük tutmada oldukça önemlidir (Fayrer-Hosken, 1997).

Boğalarda skrotumun kaudodorsalinde yer alan ve fibroelastik yapıda olan penis; penis kökü, korpus penis ve glans penis şeklinde adlandırılan üç kısımdan oluşur. Erektile doku ve penis kasları penis kökünden orjin almaktadır (Fayrer-Hosken, 1997; Hopper, 2021). Penis kökü kurura penis (corpus cavernosum) ve bulbustan (corpus spongiosum) oluşur. Penis kökünün kaudalinde ereksiyonda görevli ischiocavernosus, bulbospongiosus ve retraktör penis adlı kaslar bulunur. Penis gövdesi "S" şeklinde kıvrımlı olup bu kıvrım flexura sigmoidea olarak adlandırılır. Flexura sigmoidea boğalarda 3 aylıkken gelişmeye başlar. Pubertasa

eriştiğinde bu yapı penis boyunun beş kat artmasını sağlamaktadır Glans penis ise penisin serbest ucundaki küçük bir bölgedir. Prepisyum; ventral abdomene yapışık kıllı deriden oluşan eksternal lamina ile eksternal laminayı penis epiteline bağlayan internal laminadan oluşmaktadır. Tüm bölümleriyle penis uzunluğu Holstein ırkı erişkin bir boğada 95-106 cm kadardır (Hopper, 2021).

Veziküla seminalis, duktus deferensin ampulla kısmı, prostat ve glandula bulboüretalis sığırlardaki yardımcı eklenti bezleridir. Veziküla seminalis en büyük bez olup ejakulattaki salgısı hacimce diğer bezlerden fazladır. Lobüler yapılıdır. Anatomik olarak ampulla duktus deferens ve uretranın lateralinde, idrar kesesinin dorsalinde bulunmaktadır. Prostat bezi uretranın dorsalinde veziküler bezlerin arasında ve kaudalinde bulunur. Veziküla seminalis ve prostat bezleri transrektal olarak palpe edilebilir. Ampulla, veziküler bezler ve prostat içeriklerini uretraya boşaltmakadır. Bilateral bulboüretal bezler uretranın dorsalinde orta hattın her iki tarafta yer almaktadır. Çoğunlukla bulbospongiyöz kaslarca sarılmış olup içeriğini kör bir kese olan uretral girintiye bırakır (Fayrer-Hosken, 1997; Hopper, 2021).

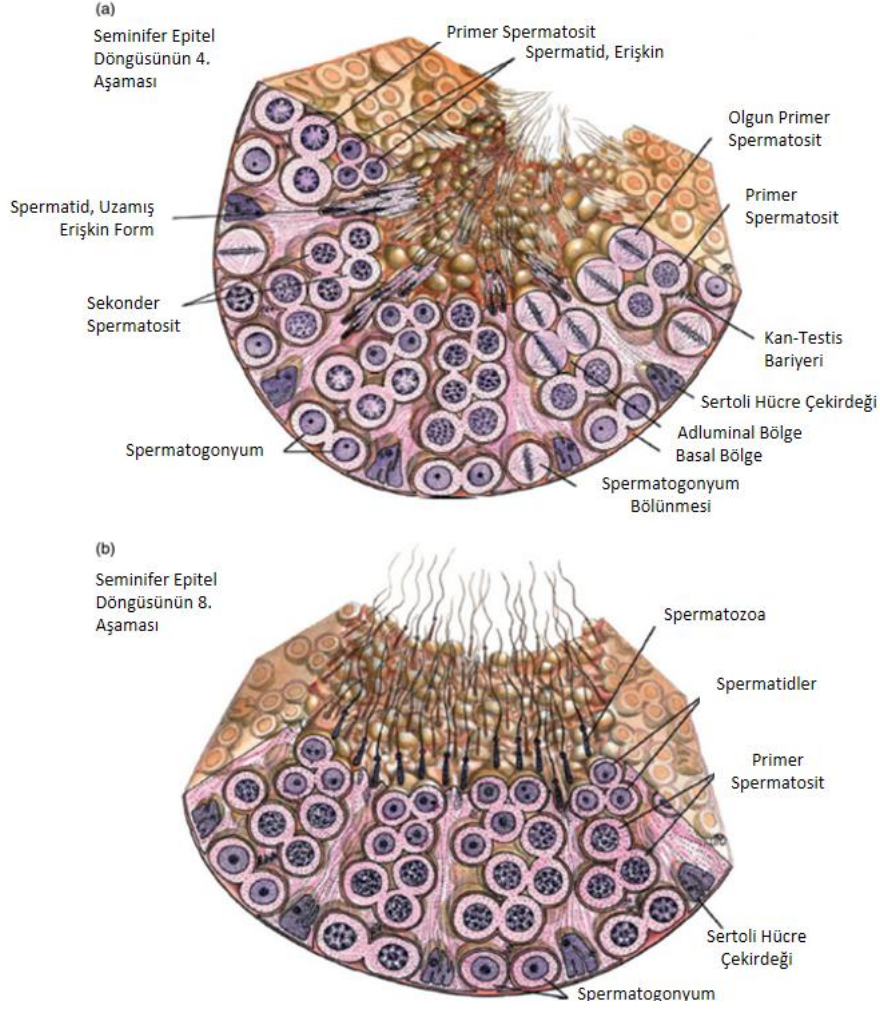
## **1.2. Boğalarda Reprodüktif Fizyoloji**

Boğalar 8-12 aylık olduklarında pubertasa erişmektedir ancak damızlıkta kullanım için 15-24 aylık olmaları istenmektedir (Ertuğrul, 2019; Varışlı, 2021). Evcil sığırlarda seksüel aktivite yıl boyu devam etmektedir. Bununla birlikte bahar aylarından sonra havanın ılımasıyla gonadotropin ve testosteron salınımının artış gösterdiği de bildirilmiştir.

Boğalarda endokrin kontrol spesifik olarak ortaya konmamıştır ve diğer türlerle benzer fonksiyon yürüttüğü düşünülmektedir. Bu bağlamda testisin hormonal mekanizması LH, FSH ve prolaktin gibi gonadotropinler ve Leydig hücrelerince salgılanan steroid hormonlarca yürütülür. Gonadotropin salgılatıcı horman (GnRH) hipotalamus ön lobundan salgılanarak hipofizden FSH ve LH'nın sentez ve salınımını düzenler. LH'nın birincil görevi Leydig hücrelerinden testosteron sentezlenmesini ve salgılanmasını uyarmaktır. Testosteron; spermatogenez, ABP üretimi ve sertoli hücre sıvısının salgılanmasını sürdürmektedir. Testosteron ABP ile bağlanarak kompleks bir yapı oluşturur. Bu yapının epididimise birlikte taşınması epididimis epitel doku fonksiyonunu yürütülmesinde gereklidir. Testosteron, GnRH ve LH salgılanması üzerinde negatif feedback etki oluştururken hem testosterondan dönüştürülen hem de Leydig hücrelerinde direkt salgılanabilen östradiol 17-β da

spermatogenezin fonksiyonel yürütülmesinde görev almaktadır. FSH prepubertal boğalarda testis gelişimini sağlarken erişkinlerde spermatogenezi başlatmaktadır. Ayrıca sertoli hücrelerinin çoğalmasını, androjen binding protein (ABP) ve inhibin sentezlenmesini sağlayarak sertoli sekresyon mekanizmasını kontrol altında tutar. Bu mekanizmaya feedback mekanizması denilmektedir. İnhibinin FSH sentezini baskılama görevi üstlenmesi FSH kontrol mekanizmasındaki negatif feedback etkiye örnek olarak gösterilebilir. Prolaktin hormonu ise LH'nın spermatogenezis üzerindeki fonksiyonuna destek görevi yapmakta olup LH varlığında testosteron üretimi ve üremenin kontrolünde önemli rol üstlenmektedir (Fayrer-Hosken, 1997; Hopper, 2021).

Spermatogonyumdan başlayarak bir dizi fizyolojik olaylar sonucu spermatozoonun oluşması spermatogenesis olarak adlandırılır. Seminifer tübüllerde bulunan spermatogonyumlar mitoz bölünmeler geçirir. Bu hücrelerin bir kısmı bulunduğu yerde kaynak olarak kalırken diğer kısmı testiküler lümene doğru ilerlemektedir. Mitoz bölünme sonucu oluşan primer spermatositler mayoz bölünme geçirmektedir. Mayoz bölünmenin 1'inci ve 2'inci evresi sonucunda sırasıyla sekonder spermatositler ve spermatidler oluşmaktadır. Sonrasında metamorfoz geçirerek spermatozoona dönüşen hücreler sertoli hücrelerince lümene salınır (Hopper, 2021). Spermatogenezisde spermatogonyumdan spermatozoon oluşumuna kadar gerçekleşen aşamalar şematik olarak Şekil 1.3.'te gösterilmiştir.



**Şekil 1.3.** Boğa testis germinal epitelinin şematik gösterimi. (a): mayoz I sırasında birincil spermatositlerin çok aktif bir şekilde ikincil spermatositlere dönüşmesi ve mayoz II'nin mayotik bölünmesinin tamamlanması ve spermatidlerin oluşumu. (b): farklılaşmaya uğramış spermatidlerden ortaya çıkan serbest spermatozoa (Hopper, 2021)

Sperma, spermatozoa ve aksesör bezlerin salgılarından oluşmaktadır. Boğalarda yaş, ırk ve genetik faktörlere göre 1-15 ml arasında değişiklik göstermekle beraber ortalama olarak 4 ml ejakulat görülür. Ejakulat yoğunluğu ise ortalama  $1200 \times 10^6$  dır. Penisin ereksiyonu parasempatik innervasyon uyarımıyla gerçekleşmektedir. İnternal ve eksternal pudental damarlardan gelen kan akımı ve basıncının etkisiyle penis erekte olmakta, flexura sigmoidea açılarak penis doğrusal hale geçmektedir. Penis, ereksiyonun etkisiyle prepisyumdan dışarı aktarıldıktan sonra duyuşal sinirler yardımıyla vajinayı bulmaktadır. Ejakulasyon sempatik sinir sistemi kontrolünde vajinaya girdikten sonraki 1-2 saniye içinde gerçekleşmektedir (Fayrer-Hosken, 1997).

Doğal aşımda dişi genital kanalına aktarılan spermatozoa, bazı savunma mekanizmalarından geçmekte ve fertilizasyon özelliğine sahip spermatozoonun fertilizasyon bölgesine ulaşması sağlanmaktadır (Alemdar, 2016). İn vivo üremede karmaşık biyolojik adımlar sonucunda gerçekteşen erkek gamet seçimi mevcut IVF prosedürlerinde in vitro olarak kısmen gerçekteştirilmektedir (Talevi ve Gualtieri, 2004).

### **1.3. Sığırlarda İn Vitro Fertilizasyon (IVF)**

Yardımcı üreme tekniklerinden biri olan in vitro fertilizasyon (IVF) dişiden alınan oositin fertilizasyonunun in vitro ortamda sağlanmasıdır. Bu konuda ilk çalışmalar tavşan türünde yapılmış olup çalışma sonuçları Pincus (1930) tarafından yayınlanmıştır. 1930'lu yıllar ve sonrasında çalışmalara devam edilmiş, insanlarda yapılan deneylerde ilk bebek 1978 yılında dünyaya gelmiştir (Sağırkaya, 2009). Son yarım yüzyılda biyoteknoloji alanında önemli ilerlemeler yaşanmıştır (Akyol, 2005). Sığır türüne baktığımızda son otuz yılda in vitro embriyo üretiminde ileri düzeyde gelişmeler görölmüştür. Gamet hücrelerinin gelişimi ve fizyolojileri anlaşıldıkça reprodüktüf teknoloji alanındaki gelişmeler hız kazanmaktadır. Reprodüktif fizyolojinin ve fertilizasyonun daha net anlaşılabilmesi için in vitro koşullarda yapılan çalışmaların yeri oldukça önemlidir. Bu amaçla araştırmacılar in vitro embriyo üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. Bununla ilişkili olarak fareler ve çiftlik hayvanlarında, çoğunlukla da sığırlar üzerinde çalışmalar gerçekteştirilmiştir (Çevik, 2020).

İN vitro fertilizasyon ve embriyo üretimi teknolojisinin hayvancılık için sağladığı yararlar; genetik değeri yüksek donörlerden çok sayıda embriyo üretilmesiyle genetik ilerlemenin desteklenmesi ve verim kabiliyetlerinin iyileştirilmesi, cinsiyeti belirlenmiş embriyoların üretilmesi, her iki ovaryumdaki hücrelerin kullanılabilmesi, suni tohumlamada dondurulmuş sperma tekniğinin pahalı olması ve uzun süre dondurulmuş olan değeri erkek damızlık spermalarından istenilen oranda yararlanılamaması, ihracatta embriyo transplantasyon tekniklerinin daha çok talep ediliyor olması, preovaryan adezyonlar gibi sonradan infertil kalmış üstün nitelikli dişilerden yavru elde edilebilmesi, değeri dişilerin embriyolarının ölümlerinden sonra kullanılabilmesi olarak sayılabilir. Faydaları değeriendirildiğinde bu teknolojilerin kullanımı tercih edilebilmektedir (Çevik, 2020; Gündoğan, 1998).

2016 yılında, Kuzey Amerika'da 400.000, Güney Amerika'da 350.000 ve Avrupa'da 150.000 olmak üzere dünya çapında yaklaşık 1 milyon in vitro üretilmiş embriyonun transferi gerçekleşmiştir. Embriyoların transferi yoluyla gerçekleştirilen üretim dünya üretimini etkilemiştir ve bu eğilimin devam edeceği öngörülmektedir. Sığır embriyosu insanlarda infertilitenin anlaşılması için iyi bir modeldir. Sığır ve insan embriyosunun in vitro üretiminde pek çok ortak nokta bulunmaktadır. Geçmişte insanlarda uygulanan yardımcı üreme teknikleri sığırlarda yapılan çalışmalar temel alınarak geliştirilmiştir (Ealy vd., 2019). İn vitro sığır embriyosu elde edilmesi üzerinde çalışmalar yıllardır sürdürülmektedir ancak in vitro fertilizasyon-embriyo transferi (IVF-ET) teknolojisinde büyük gelişmeler olduğu halde embriyoların canlılığı, gelişim oranları ve gebelik başarısı in vivo üretimden düşük kalmıştır ve beklenenden çok uzaktır (Akyol, 2005; Çevik, 2020; Ealy vd., 2019).

İN vitro embriyo transferi gerçekleşen sığırların %27,1'inde gebeliğin sürdürülebildiği bildirilmiştir (Ealy vd., 2019). İnsanlarda ise yaklaşık güncel oranlar Avrupa'da %20-29, Amerika'da %32-39 olarak bildirilmiştir (Huang vd., 2017). İn vitro embriyo üretiminde oosit maturasyonu ile spermatozoa kapasitasyonu gerçekleşmesi gerekli olan iki önemli basamaktır (Çevik, 2020). Farklı boğa spermalarının kullanıldığı in vitro fertilizasyon çalışmalarında çok farklı fertilizasyon oranlarının elde edilmesi, in vitro fertilizasyon başarısı için spermatozoonun önemli bir indikatör olduğunu gösterir niteliktedir (Akyol, 2005, Çevik, 2020). Bu bağlamda spermatozoonun kapasitasyon ve dölleme kabiliyetlerinin ayrıntılı olarak ortaya konulması gerekmektedir (Akyol, 2005).

#### **1.4. İn Vitro Ortamda Spermatozoanın Hazırlanması ve Kapasitasyonu**

İN vitro fertilizasyon döngülerinde başarısız fertilizasyon genellikle erkek faktöründen kaynaklanmaktadır. Başarılı bir fertilizasyon elde etmek için iyi kaliteye sahip spermatozoon kullanımı oldukça önemlidir (Lavelle vd., 2022; Lee vd., 2009; Yağcı, 2013). Ancak spermatozoon, dondurma ve çözündürme işlemine yaşanan hızlı sıcaklık değişimlerinden etkilenmektedir. Bu da membran bütünlüğünde bozulmalara ve nano düzeyde yapısal deformasyonlara sebep olmaktadır (Bag vd., 2004). Spermatozoonun fertilizasyon potansiyelini anlayabilmek temel olarak in vitro ortamda değerlendirilmesiyle mümkün olmaktadır (Serin ve Tekin, 2003).

İN vitro fertilizasyonda spermatozoonun fertilizasyon yeteneği; morfoloji ve motiliteyi içine alan spermatolojik özelliklerle yakından ilişkilendirilmiştir. Bu parametreler başarılı bir

fertilizasyonun potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilmiştir (Marchetti vd., 2011). Çoğu infertilite kliniğinde spermatozoon fonksiyonelliğini değerlendirme; konsantrasyon, motilite ve morfolojisinin göz önünde bulundurulduğu klasik sperma analizine dayanmaktadır. Buna rağmen bu değerlendirmenin tanısal duyarlılığı düşüktür ve sadece bu parametrelerin değerlendirilmesi, infertilitede erkek faktörü taranmasında yetersiz kalmaktadır (Pregl Breznik vd., 2013). Doğal koşullarda spermatozoonun kapasitasyona uğrayarak olgunlaşmayı tamamlaması gerekmekte olup kapasitasyon in vitro fertilizasyon başarısı için en önemli etkenlerden biridir (Barakat vd., 2015; Gündoğan, 1998; Tekin vd., 2000; Yılmaz, 2020).

Kapasitasyon, spermatozoonun ovuma girebilmesi için geçirdiği değişimlerin adıdır. Bu değişimler fizyolojik ve biyokimyasal değişimler olup gerçekleşmesi sonucunda spermatozoon akrozom reaksiyonuna hazır hale gelmektedir (Akyol, 2005; Çevik, 2020). Kapasitasyonun gerçekleştiği bölge hayvan türüne göre farklılık göstermektedir. Bununla birlikte asıl gerçekleşme yeri oviduktal istmusun distal bölgesi olarak kabul edilmektedir (Akyol, 2005). Spermatozoon plazma membranında erkek genital kanalları ve seminal plazma kaynaklı bulunan bazı maddelerin spermatozoon yüzeyi ve akrozomdan ayrılması kapasitasyonun en önemli aşamasıdır (Serin ve Tekin, 2003). Bu komponentlerin uzaklaştırılması ve plazma membranında meydana gelen değişimler dişi genital kanalında bulunan glikozaminoglikanlar (GAG), kondroitin sülfatlar ve heparin benzeri maddeler aracılığıyla sağlanmaktadır (Akyol, 2005; Serin ve Tekin, 2003). Fertilizasyonda gerçekleşen akrozom reaksiyonu, kapasitasyonunu tamamlamış spermatozoada görülen bir olgudur. Kapasitasyon, fertilizasyon olgusunun gerçekleşmesi için gerekli bir ön adım olduğuna göre kapasitasyon başarısının in vitro değerlendirilmesi, spermatozoanın fertilizasyonda kullanılabilirlik açısından kalitesini değerlendirmede önemli olacaktır (Serin ve Tekin, 2003).

İn vitro fertilizasyonda hem taze hem de dondurulmuş sperma kullanılabilir. Bununla birlikte dondurulmuş sperma kullanımında daha yüksek kapasitasyon oranları elde edildiğinden dondurulmuş sperma kullanımı daha yaygındır. İn vitro fertilizasyona hazırlanan sperma, santrifüjlenerek yıkama aşamasından geçirilmektedir. Böylece spermatozoon, dondurulma öncesinde spermaya eklenmiş, kapasitasyonu engelleyebilecek kriyoprotektanlardan ve diğer maddelerden arındırılmaktadır (Sarıözkan, 2004). Bu aşamada yıkama yöntemi, swim up (yüzdürme), dansite gradient gibi yıkama yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (Bulgurcuoğlu Kuran, 2020).

Yıkama işlemi tamamlanan spermatozoon, kapasitasyonu indüklemek amacıyla kısa süreli hipertonic uygulamaların ardından heparin içeren medyumlara alınabilir. Kalsiyum iyonofor sistemler de bu amaçla kullanılabilir. Percoll yöntemiyle spermatozoon yıkanması durumunda hipotaurin veya kafeinli ortamda inkubasyon taze spermatozoonu yeterli düzeyde kapasite edebilmektedir (Akyol, 2005). Bununla birlikte Modify Defined medyum (mDM), Brackett-Oliphant medyum (BO), Biggers-Whitten-Whittingham medyum (BWW), Krebs Ringer bikarbonat medyum (KRB) gibi kapasitasyon ve fertilizasyon ortamları sıklıkla kullanılmaktadır (Tekin vd., 2000). Ayrıca kalsiyum içermeyen Tyrode'nin Albumin Laktat Piruvat medyumunu (TALP) kullanılabilir (Akyol, 2005; Çevik, 2020). Son zamanlarda, birçok çalışmada boğa spermasının in vitro kapasitasyonu için TALP medyumunu kullandığı bilinmektedir (Çevik, 2020). Uygun medyum ve uygun inkubasyon şartları olan maksimum nem, %5 CO<sub>2</sub>, 7,3-7,4 pH ve 38,5 °C sıcaklık ortamında kapasitasyonu gerçekleşen spermatozoonda motilite artışı görülmektedir (Gündoğan, 1998).

Bir poliamin olan sperminin çeşitli inkubasyon medyumlarına eklenmesi sonucunda spermatozoon kalitesi ve kapasitasyon üzerine olumlu etkilerinin görüldüğü çalışmalar mevcuttur. Tez çalışmasında Sp-TALP medyumuna eklenen farklı dozlardaki sperminin boğalarda spermatolojik parametreler üzerine etkisi incelenmiştir.

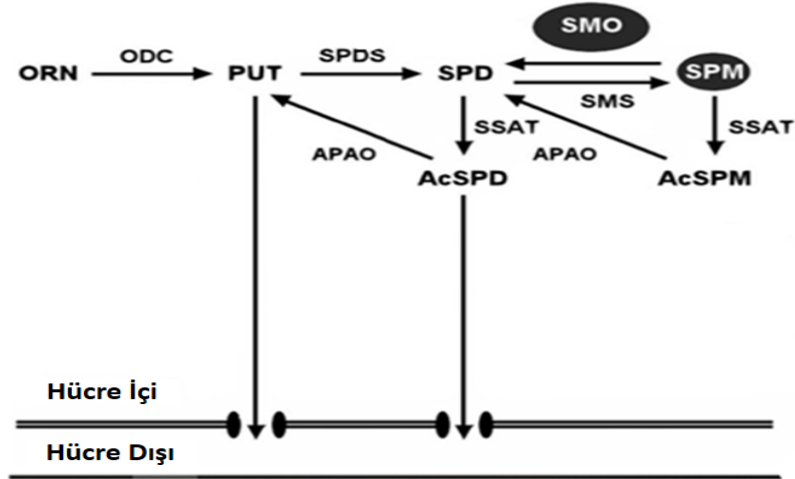
## 1.5. Spermin

Poliaminler, iki veya daha fazla birincil amino grubu ile değişken uzunluktaki karbon zincirlerinden oluşan düşük moleküler ağırlıklı alifatik bileşiklerdir. Suda çözünebilirler, fizyolojik pH'da tüm amino grupları pozitif yüklüdür. Putresin (PUT), spermidin (SPD) ve spermin (SPM), ökaryotik hücrelerde bulunan doğal poliaminlerdir (Amendola vd., 2009; Bardocz ve White, 1999; Lefevre vd., 2011). Sentezlenme yeteneği açısından putresin ve spermidinin her hücre modelinde sentezlenebildiği görülürken spermin sadece ökaryotik hücrelerce sentezlenebilmektedir (Bardocz ve White, 1999; Lefevre vd., 2011).

Yaşayan her canlı hücrede bulunan poliaminler birçok fizyolojik olgunun gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Genel olarak spermin, spermidin ve bunların öncüsü maddesi olan putresin ile anılan poliaminler hücre büyümesi, farklılaşması ve replikasyon faaliyetlerinin düzenli yürütülebilmesi için vazgeçilmez olup hücrede yeterli seviyede bulunması gerekmektedir. Spermin protein transkripsiyon ve translasyon aşamalarında etkilidir ve RNA'nın sentezlenmesinde görev almaktadır. Nükleik asitlere bağlanarak

kromatin konformasyonu, gen ekspresyonu, proteinler ve membran fosfolipidlerine müdahale etmektedir. Böylece iyon kanalının modülasyonu ve stabilizasyonunda görev almaktadır. Membran stabilizasyonunu sağlamakla birlikte hücre içi serbest kalsiyum seviyesini değiştirerek hücre içi iletimine de katkı sağlamaktadır. Ayrıca organizmanın serbest oksijen radikallerine karşı korunmasında önemli roller üstlenmektedir (Amendola vd., 2009; Bardocz ve White, 1999; Lefevre vd., 2011; Lockwood ve ark, 1971; Olğaç ve Akçay, 2021; Soda, 2019).

Poliamin sentezindeki ilk yapıtaşları mitokondriyal L-arjinin veya tüketilen diyetten üretilen L-ornitin ve L-metiyonin aminoasitleridir (Janne vd., 2004). Poliaminlerin biyosentezi 2 enzim basamağı etkisinde gerçekleşmektedir. Başlangıçta, piridoksal fosfata bağımlı ornitin dekarboksilaz enzimi (ODC), ornitin dekarboksilasyonu ile PUT üretir. Piruvoyil içeren S-adenozilmetionin dekarboksilaz enziminin (AdoMetDC) aminopropil üretmesi biyosentezin 2. aşamasını oluşturmaktadır. İki spesifik aminopropil transferaz, Spermidin sentaz (SPDS) ve Spermin sentaz (SMS), sırasıyla putresin ve spermidinin aminopropil grubuna ekleyerek spermidin ve spermini sentezler. Poliamin katabolizması, indüklenbilir enzim spermidin/spermin N1-asetiltransferazın (SSAT) aktivitesine bağlıdır. SSAT asetil koenzim A'nın (AcCoA) asetil grubunu hem SPD hem de SPM'nin N1 konumuna aktarmaktadır. N1-asetilspermidin (AcSPD) ve N1-asetilspermin (AcSPM) daha sonra sırasıyla SPD ve SPM, 3-aseto-aminopropanal ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) üretmek üzere N1-asetilpoliamin oksidaz (APAO) enzimi tarafından oksitlenir. Asetilleyici SSAT aktivitesine paralel olarak SPM, spermin oksidaz enzimi (SMO) tarafından doğrudan oksitlenir. Spermin oksidaz enzimi; SPD, 3-aminopropanal ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmek için spermini spesifik olarak substrat olarak tanımaktadır. Poliamin metabolizmasının şematik gösterimi Şekil 1.4.'te gösterilmiştir (Amendola vd., 2009).



**Şekil 1.4.** Poliamin metabolik yolağındaki hedefler. Poliamin metabolizmasının enzim ağını, substratlar arası dönüşümü ve inhibitör hedeflerini gösteren PA metabolizmasının şematik gösterimi (Amendola vd., 2009). AcSPD, N1-asetilspermidin; AcSPM, N1-asetilspermin; APAO, N1-asetilpoliamin oksidaz; ODC, Ornitin Dekarboksilaz; ORN, Ornitin; PUT, Putresin; SMO, Spermin Oksidaz; SMS, Spermin Sentaz; SPD, Spermidin; SPDS, Spermidin Sentaz; SPM, Spermin; SSAT, Spermidin/Spermin N1-Asetiltransferaz

### 1.5.1. Sperminin Reprodüksiyon Alanındaki Görev ve Etkileri

Spermin erkek reproduktif fizyolojisinde önemli roller üstlenmekte olup reprodüksiyon başarısı için önemlidir. İnsan sperması spermin yönünden zengindir ve 5-15 mM spermin içerdiği bilinmektedir. Benzer şekilde birçok memeli türünde prostat bezi poliaminler yönünden zengin olup seminal plazma ve prostat bezinde bulunan spermin miktarı diğer vücut dokularından fazladır. Örneğin domuzlarda seminal plazmada ortalama olarak 90 µM kadar spermin bulunurken plazmada bulunan miktarı 3-5 µM kadardır. Boğa ve köpek seminal plazmasının ise poliamin yönünden diğer türlere göre yoksun olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte Boğa seminal plazmasında bulunan sperminin erken kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu önleyebileceği düşünülmektedir. Seminal plazmadaki görevleri tam olarak bilinmemektedir ancak bugün poliaminler hakkında bilinenlerin büyük çoğunluğu prostat üzerine yapılan çalışmalarla açığa çıkarılmıştır. Bunun yanısıra araştırmacılar poliamin salgılanmasının tüm türlerde tamamen işlevsel prostat bezinin bir özelliği olmadığını düşünmektedir (Bardocz ve White, 1999; Lefevre vd., 2011; Pegg vd., 1970; Williams-Ashman ve Lockwood, 1970; Wu G 2018).

Spermin sentezinin gerçekleştiği diğer bir bölge testis olarak bildirilmiştir. Spermin miktarı rat, koç ve insan dahil bir çok türün seminal plazmasında diğer vücut sıvılarına veya dokulara oranla fazladır. Bu durum sperminin testis için önemini gösterir niteliktedir. Erkeklerde sertoli ve leydig hücrelerinden sentezlendiği ve depolandığı bilinmektedir. Spermatogonyum farklılaşmasında görev almaktadır. Spermatogenezisin tamamlanması, dolayısıyla fertilité için gereklidir. Farelerde spermin üretiminin aksaması infertil kalınması ile sonuçlanmaktadır. Bunun sebebinin spermatogonyum ve primer spermatositin farklılaşma mekanizmasında meydana gelen aksama ve postmayotik hücre sayısının azalması olduğu düşünülmektedir (Lefevre vd., 2011; Lenis vd., 2017; Rubinstein ve Breitbart, 1991).

Poliamin sentezi testis ve aksesör bezler için farklı olmaksızın hormonların kontrolünde gerçekleşmekte olup androjenler tarafından düzenlenmektedir. Ratlarda prostatta depolanan poliaminlerin, orşidektomi sonrası azaldığı, sadece testosteron tedavisi yapıldığında tekrar eski halini alabildiği görülmüştür (Bardocz ve White, 1999; Lefevre vd., 2011). Destekleyen farklı bir çalışmada orşidektomi uygulanan ratlara 1 hafta testosteron tedavisi uygulandığında seminal veziküldeki poliamin miktarı önemli ölçüde artmıştır (Danzin vd., 1979). Aksine testosteronun sertoli hücrelerindeki ODC sentezini baskıladığı ve ODC m-RNA'sını azalttığı bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Swift ve Dias, 1988; Weiner vd., 1990).

Sperminin spermatozoon yapısında bulunduğu keşfedilmiş, insanlarda infertil ve normospermik bireylerin spermasında bulunan spermin seviyesi karşılaştırıldığında, infertil bireylerde bulunan miktarın belirgin düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir (Shohat vd., 1990). Ayrıca glikojenin parçalanmasında rol oynayarak spermatozoon tarafından glikoz kullanımını artırdığı, fruktoz kullanımını ise azalttığı görülmüştür. Yine in vitro çalışmalarda seminal maltazın aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. İnsan spermasına eklenen fizyolojik miktarlardaki sperminin kapasitasyonu indükleyen 3', 5 siklik adozin monofosfat seviyesini artırdığı görülmüştür (Mendez, 2018). Köpeklerde spermaya spermin katılması spermatozoon membran bütünlüğünü önemli ölçüde artırmıştır. Ayrıca reaktif oksijen üretimini azalttığı, apoptozisi önlediği ve spermatozoon kriyoprezervasyonunun kapasitasyon üzerine olumsuz etkilerini azaltabildiği görülmüştür (Lefevre vd., 2011; Setyawan vd., 2016).

Poliaminlerin spermatozoon motilitesi üzerine belirgin etkileri bulunmaktadır. Koçlarda spermin konsantrasyonuyla spermatozoa motilitesinin pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir (Melendrez vd., 1992). Motilitesi azalmış veya hiç motilitesi olmayan insan spermasına poliaminler veya L-arginin eklenmesi spermatozoon motilitesini doğrudan

artırmıştır (Mendez, 2018; Porat ve Clark, 1990). İdiyopatik veya diyabetik astenozoospermik erkek spermatozoonunun sperminle inkübasyonu sonucunda spermatozoon motilitesininin arttığı görülmüştür (Morales vd., 2003). İnsanlarda yapılan farklı bir çalışmada poliaminlerin spermatozoon adenilat siklaz aktivitesine ve ilişkili olarak motilite üzerine etkisi araştırılmış, cAMP (siklik adenozinmonofosfat) seviyesinin birkaç kat arttığı görülmüştür (Shah vd., 1975). Benzer bir etki boğa sperması için bildirilmiş, kültür ortamına eklenen sperminin boğa spermasında adenilat siklaz aktivitesini artırdığı görülmüştür (Lefevre vd., 2011). Bunun aksine farklı bir çalışmada sığırların plazmasında poliamin oksidazın etkisiyle oluşan oksidasyon ürünlerinin, spermatozoon fruktoz metabolizmasını engelleyerek motiliteyi baskılayabileceği de gösterilmiştir (Bachrach ve Heimer, 2021). Yine Setyawan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada değişik miktarlarda spermin eklendikten sonra dondurulan köpek sperması çözüm sonu incelendiğinde spermatozoon fonksiyonları, apoptozis, ve kapasitasyon üzerine pozitif etkileri görülmüştür. Spermatozoada motilite artışı görülmezken akrozomal bütünlüğü bozulmamış canlı spermatozoa oranının kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir (Setyawan vd., 2016). Bahsedilen çalışmada da görüldüğü gibi spermin etkisinin sadece motilite ile sınırlı olmadığı düşünülmektedir. Farelerde in vitro fertilizasyon için hazırlanan epididimal spermaya preinkübasyon aşamasında spermin eklenmesi IVF başarısını artırmıştır. Buna ek olarak sperminin insan ve farelerde IVF sonrası gebelik oranını artırdığı görülmüştür (Stanger ve Quinn, 1982; Lefevre vd., 2011).

Sığır ve insan embriyosunun in vitro üretiminde pek çok ortak nokta bulunmaktadır. İnsanlarda uygulanan yardımcı üreme teknikleri sığırlarda yapılan çalışmalar temel alınarak geliştirilmiştir. Bununla birlikte in vitro fertilizasyonu gerçekleştiren sığırların %27,1'inde gebeliğin sürdürülebildiği bilinmektedir (Ealy vd., 2019). İn vitro fertilizasyon döngülerinde başarısız fertilizasyonun genellikle erkek faktöründen kaynaklandığı bildirilmiştir (Lavelle vd., 2022; Lee vd., 2009; Yağcı, 2013).

Sperminin erkeklerde kapasitasyonu indükleyen 3', 5 siklik adenozin monofosfat seviyesini artırdığı görülmüştür (Mendez, 2018). Köpek spermasına spermin eklenmesi spermatozoon kapasitasyonunu pozitif etkilemiş ve akrozomal bütünlüğü korumada etkili olmuştur (Setyawan vd., 2016). Farelerde IVF başarısını artırdığı, insan ve farelerde IVF sonrası gebelik oranını artırdığı bildirilmiştir (Stanger ve Quinn, 1982; Lefevre vd., 2011).

Boğa seminal plazmasında bulunan fizyolojik spermin miktarı bilinmemektedir. Köpek spermatozoasında 5mM spermin en iyi çalışan doz olmuştur (Setyawan vd., 2016). Koçlarda

10mM sperminin akrozomal ekzositozu %50 inhibe etmiştir (Rubinstein ve Breitbart, 1991). Aygırlarda 5-10 mM kapasitasyon ve DNA fragmantasyon indeksini korumuştur (Olğaç ve Akçay, 2021). Boğalarda 10 µl akrozom reaksiyonunu indüklemiş, 10 mM inhibe etmiştir (Rubinstein vd., 1995). Boğalarda farklı dokularda bulunan hücrelerin sperminle inkübasyonu incelendiğinde 1 mM sperminin hücre canlılığını artırdığı, 10mM'ın retina epitel hücresi ölümüne sebep olduğu görülmüştür (Kaneko vd., 2007). 2,5 mM sperminin retinal hücrelerin lize olmasına sebep olmuştur. 0,5 mM spermin m-RNA miktarını artırmıştır (Reichhardt vd., 2021).

Bu çalışma sperminin spermatozoon canlılık, motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu üzerine pozitif etkileri temel alınarak, boğa spermasının in vitro kapasitasyonu işlemlerinde spermatolojik parametreleri koruyabileceği ve kapasitasyon indükleyici etkisi ile daha kaliteli bir kapasitasyon oluşturabileceği hipotezinden yola çıkılarak planlanmıştır. Yapılan tez çalışmasında sperminin çözüm sonu boğa sperması üzerindeki etkilerinin araştırılması ve spermatolojik parametreler korunduğu halde maksimum düzeyde kapasitasyon elde edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada kullanılan spermin dozları belirlenirken; boğa seminal plazmasında spermin varlığının diğer türlere oranla düşük olabileceği bildirisi, diğer türlerin spermatozoon çalışmalarında uygulanan spermin dozları, sığır türünde farklı doku çalışmalarında kullanılan spermin doz bilgilerinden yararlanılmıştır.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından alınan 21.02.2023 tarih ve 515 sayılı karar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Çalışmada 30 baş Holstein ırkı boğaya ait ticari dondurulmuş sperma örnekleri kullanıldı. Her bir boğaya ait benzer tarihlerde dondurulmuş, çözüm sonu en az %70 motiliteye ve en az 20 milyon yoğunluğa sahip payetler belirlenerek çalışmaya dahil edildi. Spermalar Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda bulunan dondurulmuş payetlerden elde edildi. Payetler 37 °C'deki sıcak su banyosunda 30 saniyede çözdürüldü. Çözdürülen numunelerin motilite ve spermatozoon kinetik parametreleri belirlendikten sonra in vitro fertilizasyon protokolünde yer alan spermanın in vitro kapasitasyonunu aşamasına geçildi.

### 2.2. Spermatozoon Seçilimi ve Kapasitasyon Medyumuna Aktarılması

Çözdürülen sperma örnekleri in vitro kapasitasyon protokolüne göre hazırlandı. Boğa spermasının seçilmesi ve saflaştırılması amacıyla çözdürülen her payet 1 ml'lik kolloidal dansite gradiyent solüsyonuna eklendi (Nidacon BoviPure). Bovipure solüsyonları kullanımdan önce 1 saat 39 °C 5% CO<sub>2</sub> 'li ortamda bekletilerek %40 (200 µl BoviPure™ + 300 µl BoviDilute™) ve %80 (400 µl BoviPure™ +100 µl BoviDilute™) olmak üzere iki yoğunlukta hazırlandı. Santrifüj tüpüne %80 yoğunluktaki solüsyondan 0,5 ml konulduktan sonra aynı miktarda %40 yoğunluktaki solüsyon katların karışmaması için tüpün yanından yavaşça eklendi. Çözüm sonu sperma tüpün en üstüne eklendikten sonra oda sıcaklığında 400g X 9 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak kapasitasyon medyumuna alındı. Kapasitasyon medyumunu olarak pellet üzerine 38,5 °C'de bekletilen SP-TALP (Ferrer vd., 2016; Ferrer vd., 2017) medyumundan 1 ml eklendi.

### 2.3. Sperma Örneklerinin Gruplandırılması

Kapasitasyon için Sp-TALP medyumuna alınan spermatozoon her biri 150 µl olacak şekilde 6 eşit parçaya bölünerek 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine alındı. Ardından sırasıyla spermin eklenmeyen (sadece SP-TALP) kontrol grubu ve 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM ve 1 mM spermin eklenen 5 deney grubu oluşturuldu. İnkübasyon öncesinde (0. Saat) ve

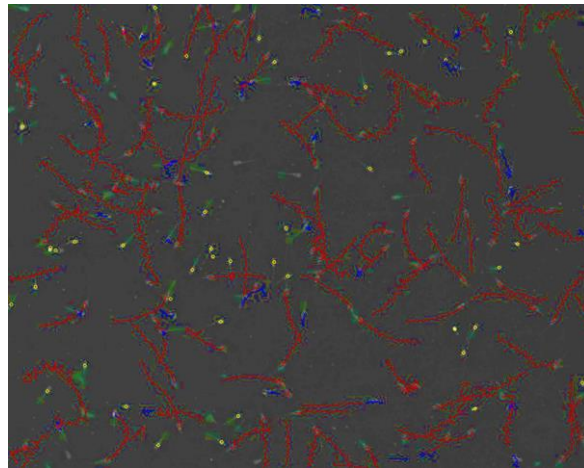
38,5 °C'de 1 saat ve 4 saatlik inkübasyonun ardından spermatolojik muayeneler gerçekleştirildi.

## 2.4. İnkübasyon Sonu Spermatolojik Analizler

Beş deney ve 1 kontrol olmak üzere oluşturulan 6 grupta bulunan spermatozoon inkübasyonuna alınmadan 0. saatte ve 1, 4 saatlik inkübasyon süreleri sonunda motilite, progresif motilite, spermatozoon kinetik parametreleri, plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI), mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) ve kapasitasyon indeksi yönünden değerlendirildi. Gerçekleştirilen analizler 30 farklı boğa sperması için tekrarlandı. Böylece her bir spermatolojik parametrenin muayenesi 540 örnek için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

### 2.4.1. Spermatozoon Hareket Özellikleri

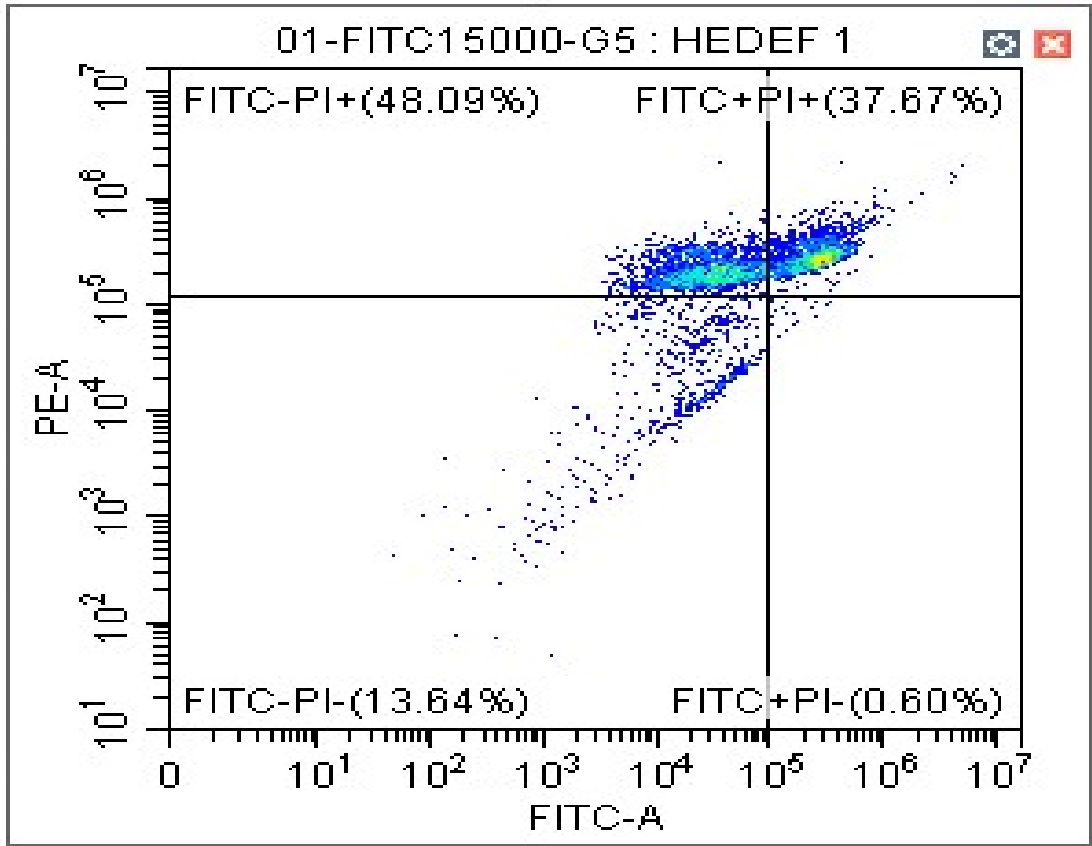
Total motilite (TMOT; %), progresif motilite (PMOT; %) ve spermatozoon kinetik parametreleri olan VCL ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL ( $\mu\text{m/s}$ ), VAP ( $\mu\text{m/s}$ ), LIN (%), STR (%), WOB (%), ALH ( $\mu\text{m}$ ) ve BCF (Hz) ve hiperaktivite (%) parametreleri, ısıtma tablalı sisteme bağlı faz-kontrast mikroskopta (Nikon ECLIPSE 50i) Sperm Class Analyzer (SCA®), CASA kullanılarak incelendi. Her bir örnekten lam üzerine 5  $\mu\text{l}$  alındıktan sonra üzerine 22x22 mm lamel kapatıldı. Ardından faz kontrast mikroskopun 37 °C'ye ayarlanmış ısıtma tablasına alınarak, 10x10'luk büyütmede kamera (Basler®) eşliğinde her bir örnek için 5 farklı alandan görüntü alınarak analizi yapıldı (Şekil 2.1.).



**Şekil 2.1.** Çözüm sonu spermatozoa motilite, progresif motilite ve spermatozoon kinetik parametrelerinin belirlenmesi

## 2.4.2. Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğü

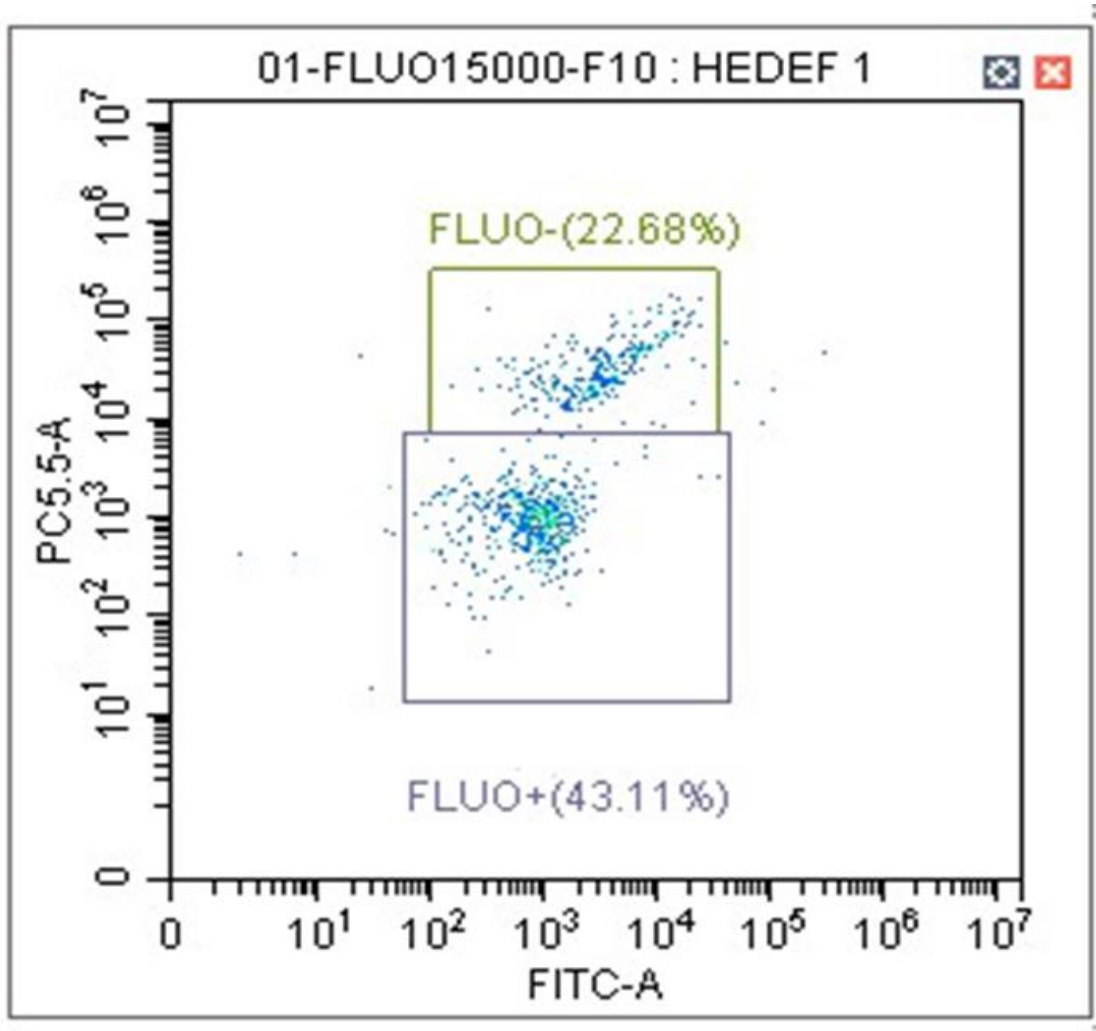
Plazma membran ve akrozom bütünlüğü parametresi örnekler hazırlandıktan sonra inkübasyon öncesinde (0. saat) ve 1, 4 saatlik inkübasyonun ardından FITC-PNA/PI (L21409, ThermoFisher) ikili boyama yöntemiyle belirlendi. Sperma 2,5 milyon spermatozoa/ml olacak şekilde PBS ile sulandırıldıktan sonra mikrolaka kuyucuklarına 246 µl aktarılarak üzerine 2,5 µl FITC-PNA ve 1,5 µl PI boyası eklendi. Hazırlanan karışım 38 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra flow sitometri cihazında (Cytotflex, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), CytExpert 2.2 yazılımı (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) yardımıyla analiz edildi (Şekil2.2.).



**Şekil 2.2.** Spermatozoa plazma membran ve akrozom bütünlüğünün flow sitometri ile belirlenmesi (FITC-PI+, plazma membran bütünlüğü bozulmuş akrozom bütünlüğünü koruyan hücre; FITC-PI-, plazma membran ve akrozom bütünlüğünü koruyan hücre; FITC+PI-, plazma membran bütünlüğünü koruyan akrozom bütünlüğü bozulmuş hücre; FITC+PI+, plazma membran ve akrozom bütünlüğü bozulmuş hücre)

### 2.4.3. Kapasitasyon İndeksi

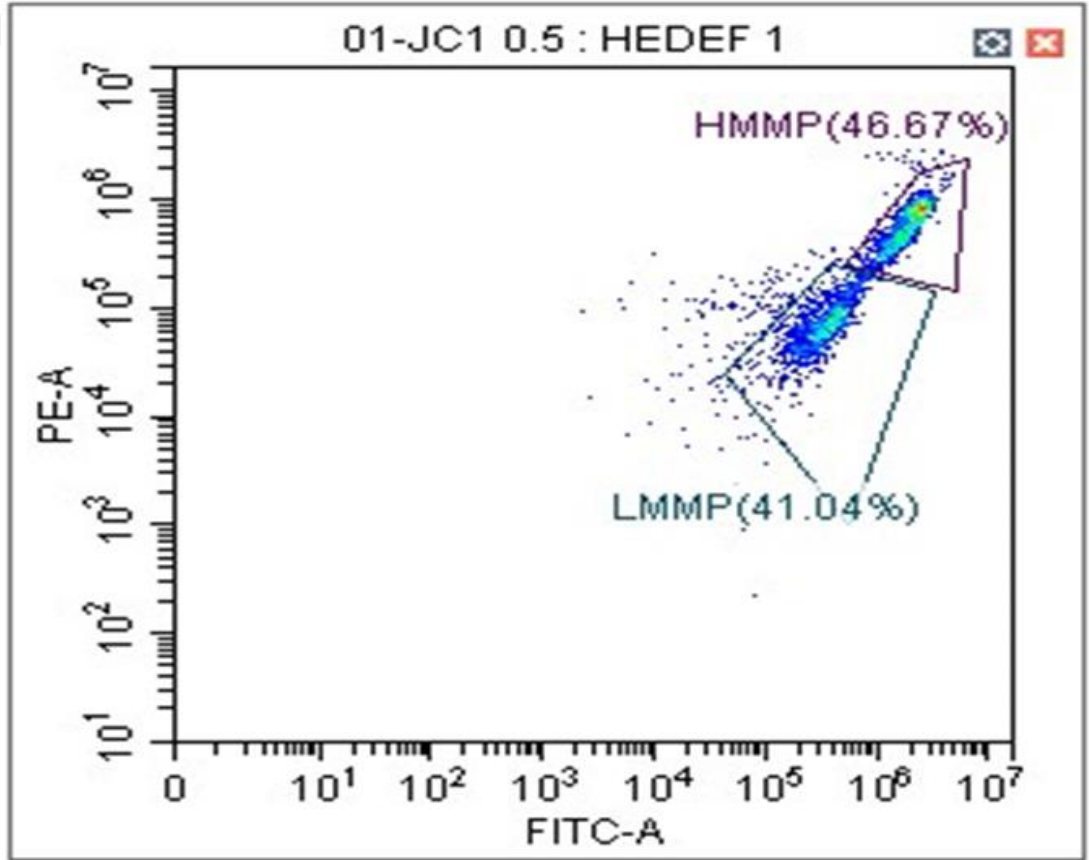
Kapasitasyon indeksi için Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit kullanıldı. Boğa sperması 0. saatte ve 1, 4 saatlik inkübasyonun sonunda 2,5 milyon spermatozoa/ml yoğunluğa sahip olacak şekilde PBS ile sulandırıldı. Sulandırılan spermadan 247,5 µl alınarak 96'lık mikrolaka kuyucuklarına aktarıldı ve üzerine 2,5 µl Fluo-4 boyası eklendi. Hazırlanan sperma-boya karışımı 38 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra flow sitometri cihazı (Cytoflex, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) ile sisteme bağlı CytExpert 2.2 yazılımı (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) yardımıyla analiz edildi (Şekil 2.3.).



**Şekil 2.3.** Spermatozoa kapasitasyon indeksinin flow sitometri ile belirlenmesi (Fluo, hücre geçirgen kalsiyum indikatörü; Fluo +, Fluo 4 boyasını almış, kapasite olmuş spermatozoa; Fluo -, Fluo 4 boyasını almamış, kapasite olmayan spermatozoa)

#### 2.4.4. Mitokondriyal Aktivite

Mitokondriyal aktivite parametresi MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (M34152, ThermoFisher) ile belirlendi. Örnekler 0. Saat ve 1, 4 saatlik inkübasyonun ardından 2,5 milyon spermatozoa/ml yoğunluğa sahip olacak şekilde PBS ile sulandırıldı. Sulandırılan spermadan 247,5 µl alınarak 96'lık mikropłaka kuyucuklarına aktarıldı ve üzerine 2,5 µl JC-1 boyası eklendi. Hazırlanan sperma-boya karışımı 38 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra flow sitometri cihazı (Cytoflex, Beckman Coulter, Fullertone, CA, USA) ile sisteme bağlı CytExpert 2.2 yazılımı (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) yardımıyla analiz edildi (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Spermatozoa mitokondriyal membran potansiyelinin flow sitometri ile belirlenmesi (JC1, Mitokondriyal membran potansiyeli test kiti; LMMP, düşük mitokondriyal membran potansiyeli; HMMP, yüksek mitokondriyal membran potansiyeli)

## 2.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilk testi, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler “Aritmetik Ortalama  $\pm$  Std.hata” şeklinde gösterildi. Toplam Motilite, Progresif Motilite, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF ve Hiperaktivite, Plazma ve Akrozomal Membran Bütünlüğü, Mitokondriyal Membran Potansiyeli, Kapasitasyon oranları üzerine madde, doz ve bunların etkileşimlerinin etkisi aşağıdaki model kullanılarak MIXED prosedürü ile analiz edildi.

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + D_j + (M \times D)_{ij} + e_{ijk}$$

( $Y_{ijk}$ , bağımlı değişken;  $\mu$ , genel ortalama;  $M_i$ , madde etkisi;  $D_j$ , doz etkisi;  $(M \times D)_{ij}$ , madde ve doz etkileşimi ve  $e_{ijk}$ , hata terimi).

Modele gruptaki hayvanlar ve ejakulat rastgele etkiler, madde, doz ve bunları etkileşimleri sabit etkiler olarak dâhil edildi. Etkileşim teriminin anlamlı bulunduğu durumlar için Bonferroni düzeltmeli basit etki analizi uygulandı.

### 3. BULGULAR

Boğa sperması çözüm sonu motilite, progresif motilite ve spermatozoon kinetik parametrelerine ait veriler Çizelge 3.1.'de; kapasitasyon medyumuna eklenen sperminin inkübasyon öncesi ve sonrasında motilite, progresif motilite, spermatozoon hareket özellikleri üzerine etkileri Çizelge 3.2. ve 3.3.'de sunulmuştur.

Tez çalışmasına dahil edilen sperma örneklerinin çözüm sonu aritmatik motilite ortalaması %83,52 olarak belirlendi (Çizelge 3.1). Spermayı dansite gradient solüsyonuna eklenme, santrifüj etme ve Sp-Talp medyumuna alma sonrasında inkübasyona bırakılan spermatozoonun motilitesi zaman etkisi yönünden değerlendirildiğinde 0,01 mM, 0,05 mM ve 0,1 mM spermin eklenen gruplarda inkübasyon süresi boyunca motilitenin korunduğu görüldü. 0,5 mM; 1 mM spermin eklenen grup ve kontrol grubunda 4. saatte yapılan ölçümler, 0. ve 1. saat ölçümlerine göre düşüş gösterdi ancak değişim istatistiksel açıdan anlamsızdı. Buna göre motilitenin en iyi korunduğu 0,05 mM grubunda 0 ve 4. saatlerde kaydedilen motilite değerleri sırasıyla %46,22; %45,03 iken 1 mM spermin eklenen grupta sırasıyla %44,56; %30,03 olarak belirlendi. Motilite değerlerindeki değişim genel ortalama üzerinden değerlendirildiğinde fark istatistiksel açıdan önemliydi ( $p < 0,001$ ). Gruplar arası etkileşimde 0, 1 ve 4. saat ölçümleri kendi arasında değerlendirildiğinde oluşan farklar önemsizdi ancak genel ortalamalar açısından görülen fark istatistiksel açıdan fark anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ). Buna göre en yüksek motilite ortalaması 0,05 mM spermin eklenen grupta, en düşük değer kontrol ve 1mM spermin grubunda gözlemlendi. Grup ve zaman etkisi birlikte değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan farkın önemsiz olduğu görüldü ( $p > 0,05$ ).

Sperminin progresif motilite üzerine etkisi incelendiğinde hem grup etkisi hem zaman etkisi yönünden görülen farklar istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ( $p < 0,01$ ). 4. saat kontrollerinde 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM spermin eklenen grupların progresif motilite değerleri 0,5 mM; 1 mM spermin ve kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel açıdan anlamlıydı ( $p < 0,001$ ). Buna göre 4. saat kontrollerinde en yüksek ve en düşük değerlerin görüldüğü gruplar ve progresif motilite oranları sırasıyla 0,05 mM spermin grubunda %36,56; 1 mM spermin grubunda %20,63 şeklindeydi. Zaman etkisi yönünden progresif motilitenin inkübasyon süresince korunmasında 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM spermin grupları oldukça etkiliydi. Kontrol; 0,5 mM spermin ve 1mM spermin grubu değerlerinde zamanla görülen

düşüş anlamlıydı ( $p<0,001$ ). Progresif motilitenin en iyi korunduğu 0,05 mM grubunda 0 ve 4. saat değerleri sırasıyla %37,76 ve %36,56 iken en büyük farkın gözleendiği 1mM spermin grubunda sırasıyla %36,41 ve %20,58 olarak belirlendi.

Spermatozoon kinetik parametreleri olan VCL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF ve Hiperaktivite için zaman etkisi yönünden görülen farklılıklar anlamlıydı ( $p<0,01$ ). Grup zaman etkisi birlikte değerlendirildiğinde sadece VAP, VSL ve hiperaktivite parametrelerinde görülen fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında en yüksek değerler VCL, VAP için 0,01 mM spermin eklenen grubun 0. saatinde; VSL, STR, LIN, WOB için 0.01 mM spermin eklenen grubun 4. Saatinde; ALH için 0,01 mM spermin eklenen grubun 0. saatinde ve BFC için 0,5 mM spermin içeren grubun 0. saatinde ölçüldü.

**Çizelge 3.1.** Çözüm sonu motilite, progresif motilite ve spermatozoon kinetik parametreleri

| Parametre     | Arit. Ort. | Std. Hata | Std. Sapma | Medyan | Minimum | Maksimum |
|---------------|------------|-----------|------------|--------|---------|----------|
| Motilite      | 83,52      | 0,91      | 4,75       | 83,23  | 76,87   | 93,99    |
| PM            | 64,13      | 1,42      | 7,40       | 64,92  | 48,75   | 79,60    |
| VCL           | 94,62      | 2,73      | 14,21      | 94,95  | 68,68   | 123,67   |
| VAP           | 58,38      | 1,41      | 7,33       | 56,17  | 44,75   | 76,26    |
| VSL           | 40,92      | 1,56      | 8,12       | 39,91  | 26,33   | 57,27    |
| STR           | 66,35      | 1,34      | 6,95       | 67,63  | 54,21   | 78,50    |
| LIN           | 43,93      | 1,92      | 9,98       | 42,58  | 29,42   | 65,17    |
| WOB           | 62,69      | 1,58      | 8,20       | 60,53  | 51,94   | 82,50    |
| ALH           | 3,55       | 0,16      | 0,83       | 3,72   | 1,96    | 5,26     |
| Hiperaktivite | 10,25      | 1,53      | 7,80       | 9,15   | 0,44    | 31,81    |

PM, progresif motilite; VCL, eğri-çizgisel hız; VAP, ortalama yol hızı; VSL, doğru-çizgisel hız; STR, doğrusallık; LIN, çizgisellik; WOB, yalpalama; ALH, yalpalama büyüklüğü; BCF, kesişim frekansı

**Çizelge 3.2.** İnkübasyon sonucu kontrol ve deney gruplarına ait motilite, progresif motilite, VCL, VAP, VSL parametreleri

| Parametre | Grup               | Zaman                      |                            |                               | Genel Ort.<br>(Grup)       | P      |        |       |
|-----------|--------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------|--------|-------|
|           |                    | 0.saat                     | 1.saat                     | 4.saat                        |                            | G      | Z      | G*Z   |
| Motilite  | 0,01mM             | 46,61 ± 3,58               | 41,80 ± 3,62               | 41,67 ± 3,69                  | 43,36 ± 3,02 <sup>AB</sup> | 0,004  | <0,001 | 0,150 |
|           | 0,05mM             | 46,22 ± 3,52               | 44,77 ± 3,62               | 45,03 ± 3,58                  | 45,34 ± 3,00 <sup>A</sup>  |        |        |       |
|           | 0,1mM              | 44,05 ± 3,55               | 44,70 ± 3,62               | 43,25 ± 3,58                  | 44,00 ± 3,00 <sup>AB</sup> |        |        |       |
|           | 0,5mM              | 47,29 ± 3,58               | 44,00 ± 3,58               | 37,49 ± 3,73                  | 42,93 ± 3,03 <sup>AB</sup> |        |        |       |
|           | 1mM                | 44,56 ± 3,62               | 42,57 ± 3,65               | 30,03 ± 3,77                  | 39,06 ± 3,05 <sup>B</sup>  |        |        |       |
|           | Kontrol            | 41,74 ± 3,58               | 39,82 ± 3,65               | 35,30 ± 3,65                  | 38,95 ± 3,02 <sup>B</sup>  |        |        |       |
|           | Genel Ort. (Zaman) | 41,74 ± 3,58 <sup>a</sup>  | 39,82 ± 3,65 <sup>a</sup>  | 35,30 ± 3,65 <sup>b</sup>     |                            |        |        |       |
| PM        | 0,01mM             | 38,24 ± 3,59               | 34,98 ± 3,65               | 34,57 ± 3,69 <sup>A</sup>     | 35,93 ± 3,13               | <0,001 | <0,001 | 0,039 |
|           | 0,05mM             | 37,76 ± 3,54               | 36,85 ± 3,62               | 36,56 ± 3,59 <sup>A</sup>     | 37,06 ± 3,10               |        |        |       |
|           | 0,1mM              | 37,08 ± 3,57               | 37,51 ± 3,62               | 35,85 ± 3,72 <sup>A</sup>     | 36,82 ± 3,11               |        |        |       |
|           | 0,5mM              | 40,98 ± 3,60 <sup>a</sup>  | 35,79 ± 3,62 <sup>ab</sup> | 29,63 ± 3,72 <sup>b, AB</sup> | 35,46 ± 3,13               |        |        |       |
|           | 1mM                | 36,41 ± 3,62 <sup>a</sup>  | 33,48 ± 3,65 <sup>a</sup>  | 20,58 ± 3,80 <sup>b, B</sup>  | 30,16 ± 3,15               |        |        |       |
|           | Kontrol            | 35,99 ± 3,60 <sup>a</sup>  | 31,52 ± 3,65 <sup>ab</sup> | 27,48 ± 3,68 <sup>b, AB</sup> | 31,66 ± 3,12               |        |        |       |
|           | Genel Ort. (Zaman) | 37,74 ± 2,97               | 35,02 ± 2,99               | 30,78 ± 2,99                  |                            |        |        |       |
| VCL       | 0,01mM             | 101,78 ± 4,04              | 89,91 ± 3,99               | 82,73 ± 4,09                  | 91,47 ± 3,07 <sup>A</sup>  | <0,001 | <0,001 | 0,059 |
|           | 0,05mM             | 97,34 ± 3,83               | 85,95 ± 3,99               | 80,23 ± 3,93                  | 87,84 ± 3,00 <sup>A</sup>  |        |        |       |
|           | 0,1mM              | 95,33 ± 3,88               | 94,49 ± 3,98               | 82,90 ± 3,93                  | 90,90 ± 3,01 <sup>A</sup>  |        |        |       |
|           | 0,5mM              | 95,21 ± 3,94               | 85,96 ± 3,93               | 75,08 ± 4,15                  | 85,42 ± 3,05 <sup>A</sup>  |        |        |       |
|           | 1mM                | 92,11 ± 3,98               | 86,25 ± 4,04               | 61,50 ± 4,22                  | 79,95 ± 3,09 <sup>B</sup>  |        |        |       |
|           | Kontrol            | 98,30 ± 3,94               | 83,16 ± 4,03               | 73,42 ± 4,03                  | 84,96 ± 3,04 <sup>AB</sup> |        |        |       |
|           | Genel Ort. (Zaman) | 96,68 ± 2,74 <sup>a</sup>  | 87,62 ± 2,76 <sup>b</sup>  | 75,98 ± 2,77 <sup>c</sup>     |                            |        |        |       |
| VAP       | 0,01mM             | 76,10 ± 4,14               | 75,76 ± 4,09               | 75,76 ± 4,20 <sup>A</sup>     | 75,87 ± 3,19               | 0,005  | 0,001  | 0,004 |
|           | 0,05mM             | 72,57 ± 3,94               | 71,20 ± 4,09               | 70,56 ± 4,04 <sup>A</sup>     | 71,44 ± 3,12               |        |        |       |
|           | 0,1mM              | 68,14 ± 3,99 <sup>b</sup>  | 79,29 ± 4,08 <sup>a</sup>  | 74,60 ± 4,03 <sup>ab, A</sup> | 74,01 ± 3,14               |        |        |       |
|           | 0,5mM              | 70,92 ± 4,04               | 72,22 ± 4,04               | 64,90 ± 4,26 <sup>AB</sup>    | 69,34 ± 3,18               |        |        |       |
|           | 1mM                | 71,92 ± 4,09 <sup>a</sup>  | 74,64 ± 4,14 <sup>a</sup>  | 53,37 ± 4,32 <sup>b, B</sup>  | 66,64 ± 3,21               |        |        |       |
|           | Kontrol            | 74,11 ± 4,04 <sup>a</sup>  | 69,17 ± 4,14 <sup>ab</sup> | 63,75 ± 4,13 <sup>b, AB</sup> | 69,01 ± 3,17               |        |        |       |
|           | Genel Ort. (Zaman) | 72,29 ± 2,87               | 73,71 ± 2,89               | 67,15 ± 2,90                  |                            |        |        |       |
| VSL       | 0,01mM             | 58,37 ± 4,05               | 59,52 ± 4,00               | 66,83 ± 4,10 <sup>A</sup>     | 61,57 ± 3,17               | 0,166  | 0,616  | 0,020 |
|           | 0,05mM             | 57,07 ± 3,86               | 58,11 ± 4,01               | 59,70 ± 3,95 <sup>AB</sup>    | 58,30 ± 3,11               |        |        |       |
|           | 0,1mM              | 52,73 ± 3,91 <sup>b</sup>  | 60,64 ± 4,00 <sup>ab</sup> | 65,44 ± 3,95 <sup>a, A</sup>  | 59,60 ± 3,12               |        |        |       |
|           | 0,5mM              | 58,05 ± 3,96               | 57,63 ± 3,95               | 56,80 ± 4,16 <sup>AB</sup>    | 57,49 ± 3,16               |        |        |       |
|           | 1mM                | 56,73 ± 4,00 <sup>ab</sup> | 59,53 ± 4,05 <sup>a</sup>  | 48,25 ± 4,22 <sup>b, B</sup>  | 54,84 ± 3,19               |        |        |       |
|           | Kontrol            | 60,79 ± 3,96               | 57,43 ± 4,04               | 55,52 ± 4,04 <sup>AB</sup>    | 57,91 ± 3,15               |        |        |       |
|           | Genel Ort. (Zaman) | 57,29 ± 2,88               | 58,81 ± 2,90               | 58,76 ± 2,91                  |                            |        |        |       |

PM, progresif motilite; VCL, eğri-çizgisel hız; VAP, ortalama yol hızı; VSL, doğru-çizgisel hız.

a, b, c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,001/p<0,05). A, B, AB: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,001/p<0,05)

**Çizelge 3.3.** İnkübasyon sonucu STR, LIN, WOB, ALH, BCF, Hiperaktivite parametreleri

| Parametre     | Grup               | Zaman                       |                           |                           | Genel Ort.<br>(Grup)      | p     |        |       |
|---------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|--------|-------|
|               |                    | 0.saat                      | 1.saat                    | 4.saat                    |                           | G     | Z      | G*Z   |
| STR           | 0,01mM             | 72,68 ± 2,39                | 70,84 ± 2,35              | 82,70 ± 2,42              | 75,41 ± 1,81              | 0,328 | <0,001 | 0,151 |
|               | 0,05mM             | 74,47 ± 2,26                | 76,75 ± 2,35              | 77,50 ± 2,32              | 76,24 ± 1,77              |       |        |       |
|               | 0,1mM              | 72,78 ± 2,30                | 71,94 ± 2,34              | 81,69 ± 2,33              | 75,47 ± 1,78              |       |        |       |
|               | 0,5mM              | 76,88 ± 2,33                | 74,31 ± 2,32              | 82,48 ± 2,45              | 77,89 ± 1,80              |       |        |       |
|               | 1mM                | 73,68 ± 2,35                | 74,67 ± 2,39              | 83,32 ± 2,49              | 77,19 ± 1,82              |       |        |       |
|               | Kontrol            | 77,35 ± 2,33                | 76,45 ± 2,38              | 80,29 ± 2,38              | 78,03 ± 1,79              |       |        |       |
|               | Genel Ort. (Zaman) | 74,64 ± 1,62 <sup>b</sup>   | 74,14 ± 1,63 <sup>b</sup> | 81,33 ± 1,64 <sup>a</sup> |                           |       |        |       |
| LIN           | 0,01mM             | 56,05 ± 3,06                | 59,98 ± 3,02              | 76,39 ± 3,10              | 64,14 ± 2,37              | 0,403 | <0,001 | 0,329 |
|               | 0,05mM             | 58,16 ± 2,91                | 64,63 ± 3,02              | 69,68 ± 2,99              | 64,16 ± 2,33              |       |        |       |
|               | 0,1mM              | 53,99 ± 2,95                | 61,10 ± 3,03              | 74,36 ± 2,98              | 63,15 ± 2,34              |       |        |       |
|               | 0,5mM              | 58,80 ± 2,98                | 63,08 ± 2,99              | 74,87 ± 3,15              | 65,58 ± 2,36              |       |        |       |
|               | 1mM                | 58,99 ± 3,02                | 66,70 ± 3,06              | 74,94 ± 3,19              | 66,88 ± 2,39              |       |        |       |
|               | Kontrol            | 60,87 ± 2,99                | 64,59 ± 3,06              | 72,07 ± 3,06              | 65,84 ± 2,35              |       |        |       |
|               | Genel Ort. (Zaman) | 57,81 ± 2,14 <sup>c</sup>   | 63,35 ± 2,16 <sup>b</sup> | 73,72 ± 2,17 <sup>a</sup> |                           |       |        |       |
| WOB           | 0,01mM             | 73,56 ± 2,47                | 78,25 ± 2,44              | 88,14 ± 2,50              | 79,99 ± 1,94              | 0,821 | <0,001 | 0,234 |
|               | 0,05mM             | 74,79 ± 2,35                | 80,51 ± 2,44              | 83,69 ± 2,41              | 79,66 ± 1,91              |       |        |       |
|               | 0,1mM              | 70,80 ± 2,38                | 81,44 ± 2,43              | 86,12 ± 2,40              | 79,46 ± 1,91              |       |        |       |
|               | 0,5mM              | 73,30 ± 2,41                | 80,29 ± 2,41              | 85,85 ± 2,53              | 79,81 ± 1,93              |       |        |       |
|               | 1mM                | 75,89 ± 2,44                | 83,96 ± 2,47              | 84,36 ± 2,57              | 81,41 ± 1,95              |       |        |       |
|               | Kontrol            | 75,54 ± 2,41                | 79,62 ± 2,46              | 83,68 ± 2,46              | 79,62 ± 1,93              |       |        |       |
|               | Genel Ort. (Zaman) | 73,98 ± 1,77 <sup>c</sup>   | 80,68 ± 1,78 <sup>b</sup> | 85,31 ± 1,79 <sup>a</sup> |                           |       |        |       |
| ALH           | 0,01mM             | 3,17 ± 0,16                 | 2,26 ± 0,16               | 1,58 ± 0,16               | 2,34 ± 0,12 <sup>A</sup>  | 0,004 | <0,001 | 0,970 |
|               | 0,05mM             | 3,02 ± 0,15                 | 2,27 ± 0,16               | 1,79 ± 0,16               | 2,36 ± 0,11 <sup>A</sup>  |       |        |       |
|               | 0,1mM              | 3,09 ± 0,15                 | 2,34 ± 0,16               | 1,69 ± 0,15               | 2,37 ± 0,11 <sup>A</sup>  |       |        |       |
|               | 0,5mM              | 2,98 ± 0,16                 | 2,17 ± 0,15               | 1,73 ± 0,16               | 2,29 ± 0,12 <sup>AB</sup> |       |        |       |
|               | 1mM                | 2,66 ± 0,16                 | 1,84 ± 0,16               | 1,44 ± 0,17               | 1,98 ± 0,12 <sup>B</sup>  |       |        |       |
|               | Kontrol            | 2,99 ± 0,16                 | 2,20 ± 0,15               | 1,71 ± 0,16               | 2,30 ± 0,11 <sup>AB</sup> |       |        |       |
|               | Genel Ort. (Zaman) | 2,99 ± 0,10 <sup>a</sup>    | 2,18 ± 0,10 <sup>b</sup>  | 1,66 ± 0,10 <sup>c</sup>  |                           |       |        |       |
| BCF           | 0,01mM             | 8,44 ± 0,57                 | 7,25 ± 0,56               | 7,07 ± 0,58               | 7,59 ± 0,40               | 0,268 | <0,001 | 0,633 |
|               | 0,05mM             | 8,08 ± 0,53                 | 7,39 ± 0,56               | 6,54 ± 0,55               | 7,33 ± 0,38               |       |        |       |
|               | 0,1mM              | 8,69 ± 0,54                 | 7,44 ± 0,56               | 7,06 ± 0,55               | 7,73 ± 0,39               |       |        |       |
|               | 0,5mM              | 9,88 ± 0,55                 | 6,90 ± 0,55               | 7,28 ± 0,59               | 8,02 ± 0,39               |       |        |       |
|               | 1mM                | 7,76 ± 0,56                 | 6,67 ± 0,57               | 6,82 ± 0,60               | 7,08 ± 0,40               |       |        |       |
|               | Kontrol            | 8,86 ± 0,55                 | 7,26 ± 0,57               | 6,96 ± 0,57               | 7,69 ± 0,39               |       |        |       |
|               | Genel Ort. (Zaman) | 8,62 ± 0,33 <sup>a</sup>    | 7,15 ± 0,34 <sup>b</sup>  | 6,95 ± 0,34 <sup>b</sup>  |                           |       |        |       |
| Hiperaktivite | 0,01mM             | 9,31 ± 1,32 <sup>a,A</sup>  | 3,23 ± 1,49 <sup>b</sup>  | 1,52 ± 1,49 <sup>b</sup>  | 4,69 ± 0,89               | 0,580 | <0,001 | 0,048 |
|               | 0,05mM             | 3,87 ± 1,10 <sup>B</sup>    | 1,97 ± 1,32               | 4,36 ± 1,32               | 3,40 ± 0,78               |       |        |       |
|               | 0,1mM              | 6,85 ± 1,25 <sup>a,AB</sup> | 2,50 ± 1,15 <sup>b</sup>  | 2,27 ± 1,40 <sup>b</sup>  | 3,88 ± 0,79               |       |        |       |
|               | 0,5mM              | 4,42 ± 1,40 <sup>AB</sup>   | 2,47 ± 1,49               | 2,29 ± 1,32               | 3,06 ± 0,87               |       |        |       |
|               | 1mM                | 4,88 ± 1,49 <sup>AB</sup>   | 1,43 ± 1,49               | 2,92 ± 1,49               | 3,08 ± 0,93               |       |        |       |
|               | Kontrol            | 9,67 ± 1,40 <sup>a,A</sup>  | 2,58 ± 1,61 <sup>b</sup>  | 1,13 ± 1,61 <sup>b</sup>  | 4,46 ± 0,95               |       |        |       |
|               | Genel Ort. (Zaman) | 6,50 ± 0,64                 | 2,36 ± 0,68               | 2,42 ± 0,69               |                           |       |        |       |

STR, doğrusallık; LIN, çizgisellik; WOB, yalpalama; ALH, yalpalama büyüklüğü; BCF, keşişim frekansı. a, b, c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,001/p<0,05). A, B, AB: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,001/p<0,05)

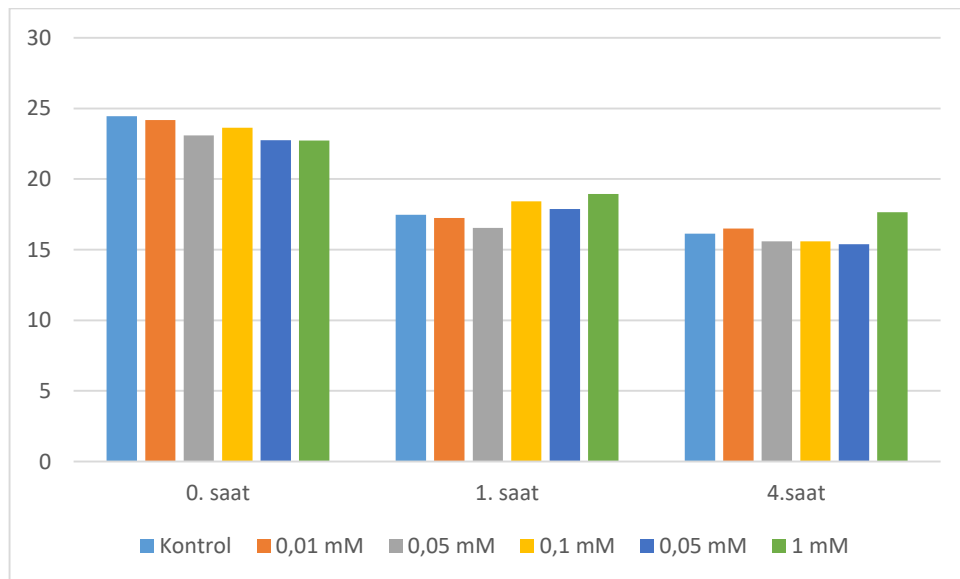
Plazma membran ve akrozomal bütünlüğün korunmasıyla ilgili 0, 1 ve 4. saat analizleri Çizelge 3.4. ve 3.5'te gösterilmiştir. Plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI) genel ortalamasına bakıldığında, zaman ilişkisi açısından istatistiksel fark anlamlı bulundu ( $p < 0,001$ ). Buna göre 0. saatte tespit edilen sonuçların 1. ve 4. saat sonunda elde edilen sonuçlara göre önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi. Grup ilişkisi açısından değerlendirildiğinde 0,01 mM grubu ve kontrol grubunun PMAI oranı 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM ve 1 mM grubuna göre yüksekti ancak görülen fark istatistiksel olarak önemsiz olduğu değerlendirildi ( $p > 0,05$ ).

**Çizelge 3.4.** İnkübasyon sonucu kontrol ve deney gruplarına ait plazma membran ve akrozomal membran bütünlüğünü koruyan sperma oranları

| Parametre                               | Grup    | Zaman                     |                           |                           | Genel Ort. (Grup) | p     |        |       |
|---|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|-------|--------|-------|
|   |         | 0.saat                    | 1.saat                    | 4.saat                    |                   | G     | Z      | G*Z   |
| Plazma Membran ve Akrozom Bütünlüğü (%) | 0,01mM  | 24,17 ± 1,96              | 17,24 ± 2,09              | 16,50 ± 1,98              | 19,30 ± 1,63      | 0,882 | <0,001 | 0,983 |
|   | 0,05mM  | 23,09 ± 1,96              | 16,55 ± 2,07              | 15,60 ± 2,00              | 18,41 ± 1,62      |       |        |       |
|   | 0,1mM   | 23,64 ± 1,95              | 18,42 ± 2,06              | 15,68 ± 2,00              | 19,25 ± 1,63      |       |        |       |
|   | 0,5mM   | 22,74 ± 2,00              | 17,88 ± 2,09              | 15,38 ± 2,01              | 18,66 ± 1,63      |       |        |       |
|   | 1mM     | 22,72 ± 1,99              | 18,94 ± 2,07              | 17,66 ± 2,00              | 19,77 ± 1,63      |       |        |       |
|   | Kontrol | 24,45 ± 1,96              | 17,46 ± 2,09              | 16,13 ± 1,99              | 19,35 ± 1,62      |       |        |       |
| Genel Ort. (Zaman)                      |         | 23,47 ± 1,51 <sup>a</sup> | 17,75 ± 1,54 <sup>b</sup> | 16,16 ± 1,52 <sup>b</sup> |                   |       |        |       |

a, b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ( $p < 0,001$ ).

**Çizelge 3.5.** Spermatozoon kapasitasyon medyumuna alındıktan 0, 1 ve 4 saat sonra plazma ve akrozomal membran bütünlüğünü koruyan spermatozoon oranı



Kapasitasyon medyumuna eklenen spermin dozlarının mitokondrial membran potansiyeli üzerine etkisi Çizelge 3.6. ve 3.7.'de gösterilmiştir. Mitokondrial membran potansiyeli değerlendirildiğinde genel ortalama açısından zaman etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,001$ ). Bu bağlamda 0 ve 1. saatler ile 4. saat karşılaştırıldığında önemli aktivite düşüşü olduğu görüldü. En yüksek mitokondrial aktivite spermin eklenmeyen kontrol grubunun 0. ve 1. saatlerinde ölçüldü (sırasıyla  $25,39 \pm 2,05$  ve  $26,44 \pm 2,21$ ). Zaman ve grup etkisi değerlendirildiğinde fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ( $p>0,05$ ).

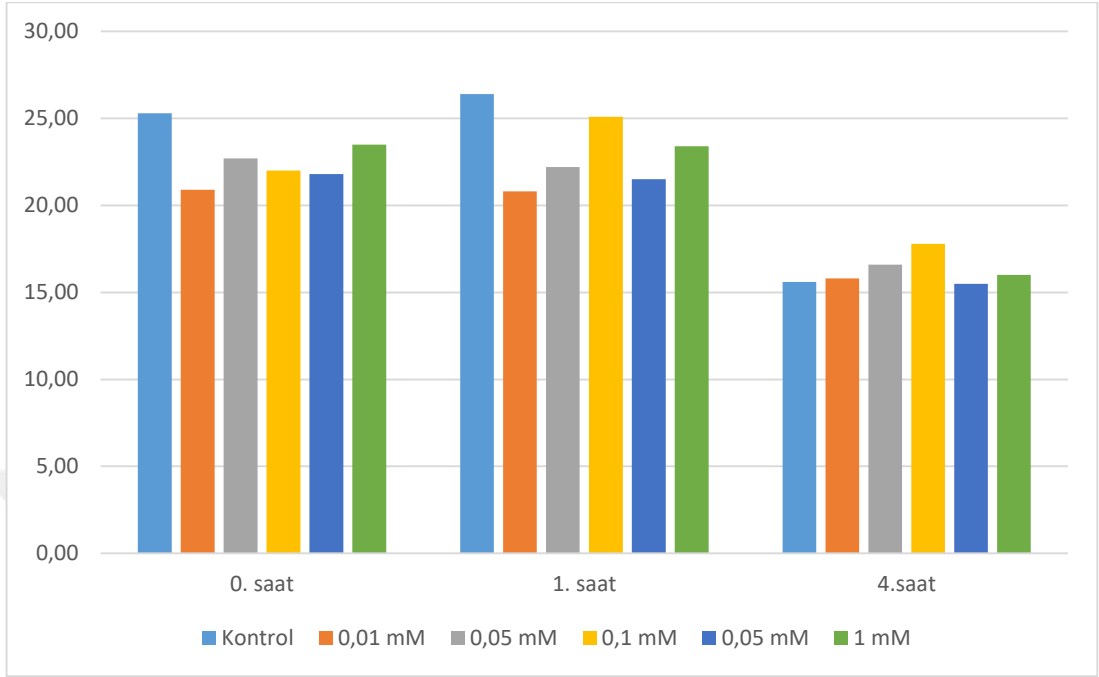
Kapasitasyon indeks değerleri Çizelge 3.6. ve 3.8.'de gösterilmiştir. Kapasitasyon indeksi değerlendirildiğinde zaman etkisi genel ortalaması açısından istatistiksel fark önemli bulundu ve zamanla orantılı olarak kapasitasyon oranı artış gösterdi ( $p<0,001$ ). Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmedi. En yüksek kapasitasyon indeksi kontrol grubunun 1 saat inkübasyonu sonucunda % 59,84 olarak belirlendi.

**Çizelge 3.6.** İnkübasyon sonucu kontrol ve deney gruplarına ait kapasitasyon ve yüksek mitokondrial membran potansiyeli ortalamaları

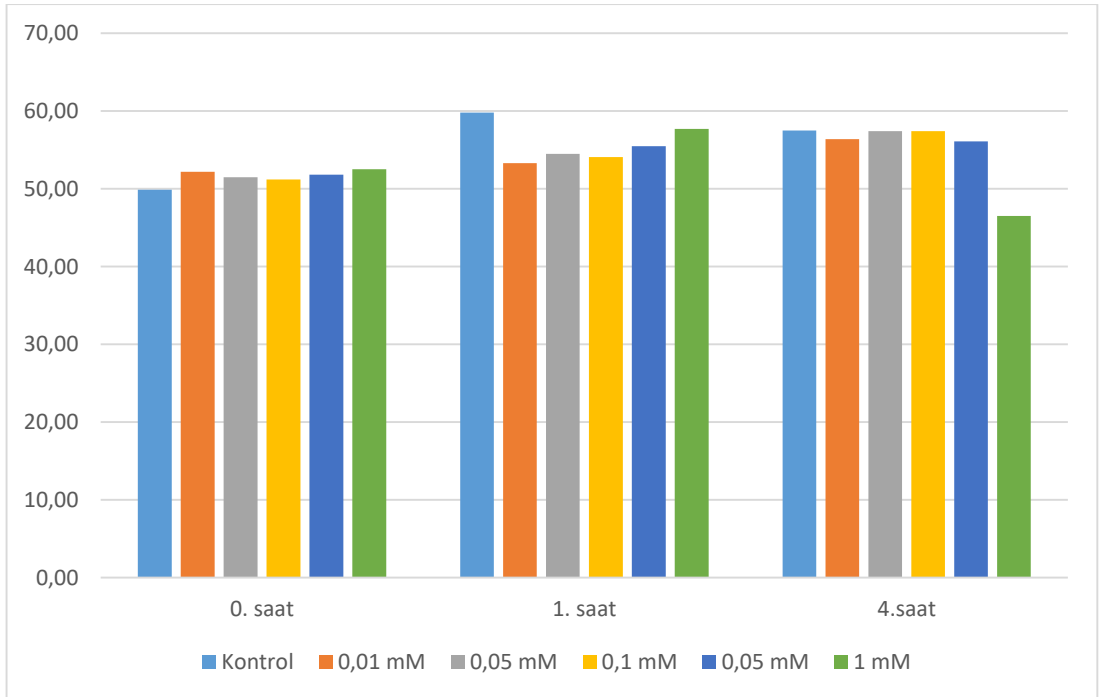
| Parametre                                    | Grup    | Zaman                     |                           |                           | Genel Ort.<br>(Grup) | P     |        |       |
|--|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------|-------|--------|-------|
|  |         | 0.saat                    | 1.saat                    | 4.saat                    |                      | G     | Z      | G*Z   |
| Yüksek mitokondriyal membran potansiyeli (%) | 0,01mM  | 20,92 ± 2,05              | 20,85 ± 2,25              | 15,86 ± 2,08              | 19,21 ± 1,48         | 0,273 | <0,001 | 0,904 |
|  | 0,05mM  | 22,75 ± 2,05              | 22,26 ± 2,25              | 16,61 ± 2,11              | 20,54 ± 1,49         |       |        |       |
|  | 0,1mM   | 22,00 ± 2,04              | 25,12 ± 2,26              | 17,81 ± 2,11              | 21,64 ± 1,49         |       |        |       |
|  | 0,5mM   | 21,86 ± 2,11              | 21,58 ± 2,21              | 15,59 ± 2,11              | 19,68 ± 1,48         |       |        |       |
|  | 1mM     | 23,50 ± 2,08              | 23,44 ± 2,20              | 16,03 ± 2,10              | 20,99 ± 1,48         |       |        |       |
|  | Kontrol | 25,39 ± 2,05              | 26,44 ± 2,21              | 15,64 ± 2,11              | 22,49 ± 1,47         |       |        |       |
| Genel Ort. (Zaman)                           |         | 22,74 ± 1,25 <sup>a</sup> | 23,28 ± 1,31 <sup>a</sup> | 16,26 ± 1,27 <sup>b</sup> |                      |       |        |       |
| Kapasitasyon indeksi (%)                     | 0,01mM  | 52,28 ± 2,88              | 53,33 ± 3,00              | 56,45 ± 2,86              | 54,02 ± 2,38         | 0,858 | <0,001 | 0,766 |
|  | 0,05mM  | 51,52 ± 2,83              | 54,54 ± 2,97              | 57,48 ± 2,91              | 54,52 ± 2,37         |       |        |       |
|  | 0,1mM   | 51,26 ± 2,83              | 54,19 ± 3,01              | 57,43 ± 2,90              | 54,29 ± 2,38         |       |        |       |
|  | 0,5mM   | 51,87 ± 2,82              | 55,57 ± 2,97              | 56,10 ± 2,88              | 54,52 ± 2,37         |       |        |       |
|  | 1mM     | 52,56 ± 2,81              | 57,76 ± 3,00              | 46,54 ± 2,91              | 55,62 ± 2,38         |       |        |       |
|  | Kontrol | 49,98 ± 2,86              | 59,84 ± 3,01              | 57,59 ± 2,88              | 55,81 ± 2,39         |       |        |       |
| Genel Ort. (Zaman)                           |         | 51,58 ± 2,21 <sup>b</sup> | 55,87 ± 2,25 <sup>a</sup> | 56,93 ± 2,22 <sup>a</sup> |                      |       |        |       |

a, b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ( $p<0,001$ ).

**Çizelge 3.7.** Spermatozoon kapasitasyon medyumuna alındıktan 0, 1 ve 4 saat sonra yüksek mitokondriyal membran potansiyeli (HMMP) gösteren spermatozoon oranı



**Çizelge 3.8.** Spermatozoon kapasitasyon medyumuna alındıktan 0, 1 ve 4 saat sonra kapasitasyonu gerçekleştiren spermatozoon oranı



## 4. TARTIŞMA

İn vitro fertilizasyon, in vitro ortamda olgunlaştırılan oositlerin kapasite olmuş spermatozoa ile karşılaştırılarak fertilizasyonunun sağlanması ve oluşan embriyonun, uygun alıcılara aktarılması şeklinde uygulanan bir tekniktir (Gündoğan, 1998). Yöntemin sığırlarda başarıya ulaşması oosit maturasyonu ve dölleme yeteneği ile spermatozoa kapasitasyonu ve dölleme yeteneğinin incelenmesi ile ilişkilidir (Akyol, 2005). Sığırlarda in vitro fertilizasyon için taze veya dondurulmuş spermatozoon kullanılabilir ancak taze sperma kullanımında kapasitasyon için gereken inkübasyon süresi çok uzun olmakta ve daha yüksek dozda kapasitasyon ajanına maruz kalması gerekmektedir. Bunun yanında dondurulmuş spermatozoon ile in vitro fertilizasyon oranı daha yüksek olabilmektedir. İlişkili olarak in vitro kapasitasyonda dondurulmuş spermanın kullanımı daha yaygındır (Akyol, 2005; Hasler ve Barfield, 2021).

In vitro kapasitasyonun başarılı olabilmesi için uygun motilite ve yoğunlukta spermatozoonun hazırlanması gerekmektedir. Bunun için kullanılacak spermatozoon sırasıyla yıkanmakta, dilüe edilmekte ve inkübasyona bırakılmaktadır. Bu işlemler sırasında meydana gelebilen hücre membran hasarlarına bağlı olarak akrozomal ve sitosolik enzimlerin zamansız salınımı gerçekleşebilmektedir. Bu etkiler sığırlarda IVF başarısının %13-94 gibi geniş bir aralıkta seyretmesinin nedenlerinden olabilir (Akyol, 2005).

Spermin maddesinin spermatozoon üzerine etkisinin incelendiği bazı çalışmalarda, sperminin infertil bireylerde daha düşük oranda bulunduğu, spermatozoon glikoz kullanımını artırdığı, kapasitasyonu indükleyen 3', 5 siklik adozin monofosfat seviyesini, spermatozoon membran bütünlüğünü ve spermatozoon motilitesini artırdığı bildirilmiştir (Melendrez vd., 1992; Mendez, 2018; Shohat vd., 1990). Sperminin spermatozoon üzerine bilinen etkileri dikkate alınarak planlanan çalışmada, in vitro kapasitasyon tekniğine göre hazırlanan boğa spermasına farklı dozlarda eklenen sperminin spermatolojik parametreler üzerine etkileri incelenmiştir. Bu bağlamda çözüm sonu yıkama ve dilüsyonu gerçekleştiren spermatozoona, kapasitasyon medyumuna eklenen farklı dozlardaki sperminin motilite, progressif motilite, spermatozoon kinetik parametreleri (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF ve Hiperaktivite), spermatozoon plazma ve akrozomal membran bütünlüğü, mitokondriyal membran potansiyeli ve kapasitasyon indeksi parametreleri üzerine etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Motilite spermatozoon kalitesini değerlendirmek için en yaygın kullanılan parametredir. Bazı araştırmacılar motilite ve progresif motilite oranı ile fertilizasyon oranı arasında anlamlı korelasyon olduğunu bildirirken bazıları bunun aksini rapor etmişlerdir. Bunun nedeni spermatozoon kalite değerlendirilmesinde motilitenin temel alınması ve diğer spermatolojik parametrelerin birlikte değerlendirilmesinin daha doğru sonucu verebileceği olabilir (Castellano vd., 2021; Graham, 2001; Li vd., 2014; Olğaç ve Akçay, 2021; Tırpan vd., 2015; Vincent vd., 2021). Spermatozoon motilitesi boğalar arasında ve hatta aynı boğanın farklı zamanlardaki sperma muayenelerinde önemli oranda değişebilmektedir (Castellano vd., 2021; Li vd., 2016; Vincent vd., 2021).

Tez çalışmasında kullanılan spermaların çözüm sonu motilite aritmetik ortalaması %83,52 iken spermatozoon kapasitasyon medyumunda inkübasyon sonucu motilite değerlerinin %41,7-46,6 arasında olduğu görülmektedir. Spermatozoonun in vitro kapasitasyon tekniğine göre hazırlandığı farklı çalışmalarda motilite değerleri %46-90,2 arasındadır (García-Herreros ve Leal, 2014; Itahashi vd., 2022; Purdy vd., 2021; Sepúlveda vd., 2017). Tez çalışmasında elde edilen motilite değerleri farklı çalışmalarda görülen değerlerin alt sınırında kalmıştır. Bunun yanında bu alanda yapılan çalışmalarda elde edilen motilite değerlerinin de oldukça farklı olduğu dikkat çekmektedir. In vitro kapasitasyon işlemleri, spermının farklı solüsyonlarla muamele görmesi, santrifüj işlemleri, inkübasyon ve sıcaklık değişimleri gibi çok sayıda değişkene maruz kalmasına neden olabilmektedir. Öte yandan bu işlemler her prosedür özelinde farklı süre ve sıralarda uygulanabilmektedir. Çalışmalar arasındaki farklı sonuçların bu nedenlerden dolayı ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Tez çalışması motilite değerlerinin farklı çalışmaların alt sınırında kalma sebebi kapasitasyonla motilite arasındaki ilişki olabilir. Kapasitasyonda etkin rol oynayan cAMP, metabolik olarak ATP'den elde edilmektedir. İlişkili olarak cAMP seviyesi arttıkça ATP miktarının azalacağı ve bununla birlikte spermatozoon motilitesindeki düşüşün normal karşılanabileceği düşünülmektedir. Carvalho vd (2010), yaptıkları çalışmada motiliteyi %70,4; kapasitasyon oranını %30,5 bulmuşlardır. García-Herreros ve Leal (2014) üç farklı yöntemle sperm seçilimi gerçekleştirdikleri çalışmada spermatozoa motilite ve kapasitasyon indeks oranlarını sırasıyla %79,3;%29,3 ve %90,2; %38,6 ile %65,1;%34,3 olarak belirlemişlerdir. Tez çalışması kapasitasyon indeks oranları ise %49,9-59,8 aralığındadır. Motilitenin yüksek bulunduğu farklı çalışmalarda kapasitasyon oranlarının tez çalışmasına göre düşük bulunması kapasitasyon oranındaki artışın motilite oranındaki düşme ile ilişkili olabileceği tezini desteklemektedir .

Progresif motilite spermatozoonun belirli bir yöne yaptığı ileri hareket yeteneğidir (Ramirez-Diaz vd., 2023). Progresif motilitenin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte mitokondrial aktivite ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Mitokondrial membran potansiyeli ile in vitro fertilizasyon başarısının pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir. Progresif motilitenin diğer parametrelerle birlikte değerlendirilmesi in vitro fertilizasyon başarısını öngörmeye önemli olabilir (Li vd., 2014; Olğaç ve Akçay, 2021; Ramirez-Diaz vd., 2023). Tez çalışmasında 0,01 mM; 0,05 mM ve 0,1 mM spemin eklenen gruplarda progresif motilite oranı inkübasyon süresince korunmuştur. 0,5 mM; 1 mM spermin eklemenin progresif motilite üzerine zararlı etki oluşturduğu görülmüştür.

Tez çalışması 0. saat progresif motilite oranlarının %35,99-40,98 arasında olduğu belirlenmiştir. Farklı çalışmalar incelendiğinde progresif motilite değerlerinin %24-80 aralığında olduğu görülmektedir (Carvalho vd., 2010; Castellano vd., 2021; Gutiérrez-Añez vd., 2021; Purdy vd., 2021; Samardzija vd., 2006; Sepúlveda vd., 2017). Tez çalışmasında progresif motilite değerleri farklı çalışmalarda görülen değer aralığında bulunmuştur. Araştırma sonuçlarında görülen bu farklılık boğa spermaları arasındaki bireysel farklılık veya kullanılan spermatozoon seçim yöntemiyle ilişkili olabilir. Seperasyon yöntemi açısından değerlendirebilmek için, tez çalışmasında kullanılan Bovipure solüsyonunun kullanıldığı iki farklı çalışmadaki progresif motilite değerleri ile tez çalışmasında elde edilen değerler ayrı ayrı incelenmiştir. Bahsedilen iki çalışmada değerlerin %66-72 arasında olduğu görülmektedir. Tez çalışması progresif motilite sonuçlarının bu iki çalışmanın altında kaldığı görülmektedir. (Gutiérrez-Añez vd., 2021; Samardzija vd., 2006). Tez çalışması genel ortalamalarına bakıldığında progresif motilitenin zamanla orantılı olarak düşüş göstermesi açısından atıf yapılan çalışmada görülen etki uyusmaktadır ancak tez çalışmasında motilite değeri daha düşük kalmıştır. Bu fark boğalar arasındaki bireysel farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Öte yandan tez çalışmasında kapasitasyon oranı %49,9-59,8 arasında görülürken farklı bir çalışmada progresif motilite oranının %60-80 arasında ve kapasitasyon indeksinin %15-25 arasında olduğu görülmektedir. Bu kapsamda motilite ve kapasitasyon arasındaki ilişkide olduğu gibi artan kapasitasyon oranlarının progresif motilitede de düşüşe neden olabileceği düşünülmektedir.

Spermanın değerlendirilmesinde spermatozoon motilite ve progresif motilitesi yanında kullanılan farklı kinetik parametreler mevcuttur. Bunlar genel olarak spermatozoonun baş ve kuyruk hareket özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Tez çalışmasında VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF ve Hiperaktivite kinetik parametreleri incelenmiştir. VCL,

VSL ve VAP en temel hız değerlendirme parametreleridir. Eğrisel hız anlamına gelen VCL spermatozoonun hedefe doğru ne kadar yol aldığını bildirmektedir. VAP hedefe doğru kat edilen ortalama yol hızını vermektedir. VAP değeri CASA cihazındaki algoritmalara göre düzenlenmekte ve ortalama bir değer vermektedir. Bu yüzden VAP değeri farklı yazılımlar ile farklılık gösterebilir. Kısaca doğrusal hız olarak tanımlanan VSL spermatozoonun iki nokta arasında oluşturduğu düz çizgide aldığı ortalama hızı ifade eder. STR, LIN, WOB sperm doğrusallık oranını ifade eden parametrelerdir. LIN (doğrusallık),  $VSL/VCL \times 100$  şeklinde ve STR (gidiş doğrultusu),  $VSL/VAP \times 100$  formülüyle hesaplanmakta olup spermatozoonun aldığı yolun düzgünlük, doğrusallık oranını vermektedir. WOB (yalpalama)  $VAP/VCL \times 100$  formülüyle hesaplanmakta ve spermatozoonun yalpalama ya da kararsızlık oranını yansıtmaktadır. Yanal baş değiştirme genliği olarak bilinen ALH spermatozoon başının doğru yoldan saparak ne kadar yer değiştirdiğini göstermektedir. BCF spermatozoonun ilerlerken iki nokta arasındaki düz çizgiden ne kadar geçtiğini belirler. Bu sebeple kuyruğun yön değiştirme ritminin değerlendirilmesi açısından kullanılması mümkündür (Sönmez ve Fırat, 2022).

Spermatozoon kinetik parametreleri, spermatozoonu in vitro kapasitasyon tekniğine göre hazırlayan ve tez çalışmasına benzer şekilde gradient yöntemini kullanan Sepúlveda vd (2017)'nin çalışmasıyla karşılaştırmıştır. Karşılaştırma için, atıf yapılan çalışmanın en başarılı grubuna ait spermatozoon kinetik parametre değerleri referans alınmıştır. Spermatozoon hız parametreleri olan VCL, VAP, VSL (atıf yapılan çalışmada sırasıyla, %89,8; %53,1; %38,6) ve spermatozoon doğrusallık oranını ifade eden STR, LIN, WOB (atıf yapılan çalışmada sırasıyla, %72,8; %43,5; %59,7) parametreleri tez çalışmasında Sepúlveda vd (2017)'nin çalışmasından daha yüksek bulunmuştur. Bununla ilişkilendirilebilecek şekilde spermatozoon başının laterale sapma oranını veren ALH (%4,2) değeri tez çalışmasında daha düşüktür. BFC (%9,1) değerinin ise yakın olduğu görülmektedir (Sepúlveda, 2017). Gutiérrez-Añez vd (2021) 30. dakikada yaptıkları ölçümlere bakıldığında VCL, VAP, VSL değerlerinin tez çalışmasından oldukça yüksek olduğu görülmektedir. STR, LIN, WOB değerlerini daha düşük buldukları ve BCF'yi oldukça yüksek buldukları görülmüştür. Gutiérrez-Añez ve arkadaşlarının çalışmasında görülen kinetik parametre değerleri Mortimer ve arkadaşlarının tanımlamaları temel alındığında spermatozoanın hiperaktivasyona uğradığını göstermektedir (Mortimer vd., 1990; Mortimer, 2013). Kapasitasyon koşullarında 1 saatte spermatozoanın %30-40'ının hiperaktivite kazandığı düşünüldüğünde bahsedilen çalışmada 30 dakika içinde görülen hiperaktivasyon erken olarak değerlendirilebilir (Pregl Breznik vd., 2013). Tez çalışmasında hiperaktivite parametresi zaman etkileşimi açısından A,C ve kontrol grubunda görülen farklar, grup ilişkisi açısından 0. satte görülen farklar istatistiksel açıdan anlamlı

bulunmuştur. Marquez ve Suarez (2004) yaptıkları çalışmada 0 ve 4. saat hiperaktivasyon oranlarını sırasıyla %1 ve % 1.3 olarak bildirmişlerdir. Buna göre inkübasyon süreci hiperaktivasyon üzerinde anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Spermatozoon kinetik parametreleri açısından diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında kapasitasyon medyumuna eklenen sperminin, in vitro fertilizasyonda kullanılacak spermatozoon kalitesini ve kullanılabilirliğini artırdığı görülmüştür. Bununla birlikte zamanla orantılı olarak değerlerin düştüğü de tespit edilmiştir. İn vitro fertilizasyon tekniğiyle hazırlanmış boğa spermasına eklenen spermin maddesinin spermatolojik parametreler üzerine etkisi ilk kez çalışılmıştır. Yapılan tez çalışması bir ilk olduğu için sperminin motilite parametreleri üzerine görülen etkisi, in vitro kapasitasyon tekniği üzerine yapılacak yeni çalışmalarla desteklenmelidir.

Spermatozoonu oluşturan yapılardan olan plazma ve akrozom membranı hücrenin canlılığını korumak açısından bütünlüğünü kaybetmemesi gereken fizyolojik bariyerlerdir. Spermanın dondurulup çözülmesi işlemlerinde plazma membranının hasar görebileceği bildirilmektedir. Plazma membranı spermatozoon-ooosit birleşiminde görevli reseptörlerin etkileşiminden sorumlu olduğundan fertilizasyon için hayati önem taşımaktadır. Plazma membranında doymamış yağ asidinin doymuş yağ asidine oranı yüksektir. Bu durum spermatozoonu kriyoprezervasyona ve peroksidasyona karşı hassaslaştırmaktadır. Bunun yanı sıra dondurma ve çözülme işlemleri sırasında plazma membranı ve akrozomal membran dış ortama daha fazla maruz kaldığından yapısal, biyokimyasal ve fonksiyonel değişikliklere uğrayabilmektedir. Bu da fertilizasyon oranlarında düşüşle sonuçlanabilir. Yüksek fertilitite oranına ulaşmak için spermatozoon plazma ve akrozomal membranının yapısal ve işlevsel bütünlüğün korunması gerekmektedir (Fraser, 2017; Sobeh vd., 2020).

Tez çalışmasında plazma membran ve akrozomal membran bütünlüğünün değerlendirilmesinde, plazma ve akrozomal membran bütünlüğü bozulmamış spermatozoon oranı temel alınmıştır. Farklı çalışmalara bakıldığında, spermatozoonun akrozomal bütünlüğü koruma oranı büyük farklılıklar göstermektedir. García-Herreros vd (2014) spermatozoon seçilimini üç ayrı teknikle gerçekleştirmişler ve akrozom bütünlüğü oranını sırasıyla %13,09; %19,10; %12,40 bulmuşlardır. Gillan vd (2008) ise akrozom bütünlüğünü %79 olarak belirlemişlerdir. Atıf yapılan diğer çalışmalardaki sonuçlar ise bu iki değer arasında kalmaktadır ve %12,4-79 arasında değişmektedir. Tez çalışmada 0. saat plazma membran ve akrozom bütünlüğü oranı %22,7 - %24,4 arasındadır. Buna göre tez çalışmasında bulunan değerler atıf yapılan çalışmalarda görülen aralıkta kalmaktadır (Campanholi vd., 2021; Carvalho vd., 2014; García-Herreros ve Leal, 2014; Gillan vd., 2010; Li vd., 2016; Samardzija

vd., 2006; Sepúlveda vd., 2017; Shan vd., 2022). Farklı boğalara ait spermalar ile gerçekleştirilen in vitro fertilizasyon işlemlerinde fertilizasyon başarısının %13 ile %94 arasında değişebildiği görülmüştür (Akyol, 2005). İlişkili olarak incelenen çalışmalarda belirlenen sonuçlar arasında görülen geniş aralık, bu konuda henüz bir standardizasyon bulunmaması ve boğalar arası bireysel farklılıkların yüksek etkisi değerlendirildiğinde normal görülebilir. Yine de çalışmaların çoğunda görülen değerler in vitro kapasitasyon çalışmalarında plazma membran ve akrozom bütünlüğünü koruma oranlarının düşük kaldığını göstermektedir. Plazma ve akrozom membran bütünlüğündeki düşük oranların sebebi in vitro kapasitasyonda dondurulmuş spermatozoanın tercih edilmesi, çözdürülen spermatozoanın ısı değişim stresinin ardından birden fazla defa medyumunun değişerek farklı ortamlara aktarılması ve spermatozoanın santrifüj işleminden geçiriliyor olması olabilir. Sığırlarda in vitro fertilizasyon sonucu gebelik başarısının %25-30 oranlarında kalmasının sebeplerinden birisinin bu olabileceği düşünülmektedir.

Spermatozoon mitokondrial membran potansiyeli, mitokondrinin enerji durumunu belirleyen ve spermatozoon hareketliliğiyle ilişkilendirilen bir parametredir. Spermatozoonda hem yüksek hem de düşük mitokondrial membran potansiyeli bulunmaktadır. İkisinin oranı spermatozoon mitokondrisinin aktivitesini vermekte olup düşük ve yüksek potansiyelin eşit olduğu duruma dengeli mitokondrial aktivite denmektedir (Li vd., 2016). Mitokondrial membran, ATP üretim görevini üstlenmekte olup bazı fonksiyonların yürütülebilmesi için temel enerji kaynağı konumundadır. Spermanın işlenmesi sırasında meydana gelebilen mitokondrial membran hasarlarının, fertilizasyon yeteneğinin azalmasında temel sebeplerden biri olduğu bazı araştırmacılarca bildirilmiştir (Fraser, 2017; Sharbatoghli vd., 2012).

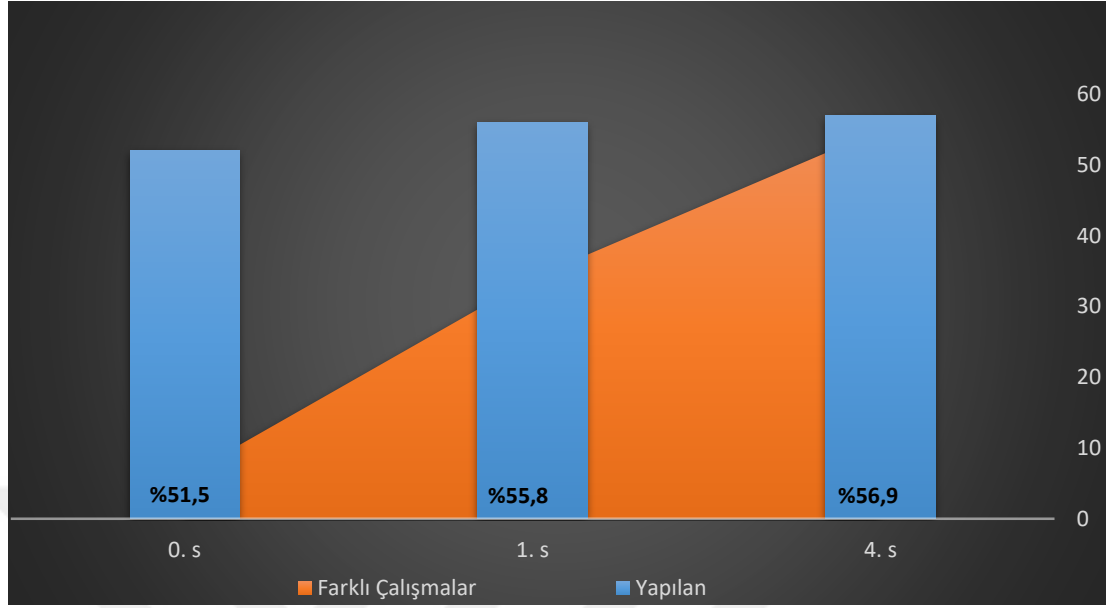
Boğa spermatozoonunun IVF tekniğiyle hazırlandığı farklı çalışmalarda yüksek mitokondrial membran potansiyelinin (HMMP) %23-84 arasında olduğu görülmektedir (Li vd., 2016; Peres vd., 2021; Sepúlveda vd., 2017). Tez çalışmasında HMMP ortalaması 0, 1 ve 4. saatlerde sırasıyla %22,74; %23,28; %16,26 olarak belirlenmiştir. Tez çalışmasında bulunan sonuçlar farklı çalışmalarda bulunan değerlerin alt sınırında kalmıştır. Ancak yukarıda belirtildiği gibi boğa spermasına ait parametre değerleri ve fertilizasyon oranları arasında geniş farklılıklar bulunmaktadır. Bu açıdan günümüze kadar yapılan çalışmalar referans alındığında çalışma sonuçlarının olağan olduğu değerlendirilmektedir. Kapasitasyon medyumuna eklenen farklı dozlardaki sperminin boğa spermatozoonu mitokondrial membran potansiyelini artırıcı ya da koruyucu etkisi görülmemiştir. Bununla birlikte spermatolojik parametrelerin her birinin birbiriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kapasitasyonda rol oynayan cAMP ATP'den

sentezlenmektedir. Enerji mekanizmasıyla yakından ilişkilendirilen MMP değeri, hücrede ATP oranındaki değişimlerle birlikte azalıp artabilir. Tez çalışmasında kapasitasyon oranlarının, yukarıda belirtildiği üzere farklı çalışmalarda karşılaştırıldığında yüksek olması, kapasitasyonda meydana gelen kalsiyum geçirgenlik artışının indüklenmesinde cAMP'nin rolü ve cAMP'nin ATP'den sentezleniyor olması sebebiyle tez çalışmasında HMMP oranının düşük olması olağan karşılanabilir.

Kapasitasyon, spermatozoonunun ovuma girmesini sağlayan akrozom reaksiyonuna spermatozoonu hazırlayan, fizyolojik ve biyokimyasal bir olaydır. Fertilizasyon için tamamlanması zorunludur. Kapasitasyon sürecinde; membran özellikleri, hücre içi iyon konsantrasyonu ve enzim aktivasyonundaki değişiklikler, çoklu sinyal olaylarını ve yollarını indüklemektedir. Bu aşamada seminal plazmadaki bazı faktörlerin spermatozondan uzaklaştırılması, membran proteini ve lipidlerin yeniden düzenlenmesi, bikarbonat iyon akışıyla kolesterolün dışa salınımı ve kalsiyum akışı başlatılır. Bahsedilen bu değişiklikler akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesine aracı olmaktadır. Akrozom reaksiyonu ise spermatozoonun oosite penetrasyonunu sağlamakta olup yalnızca kapasite olmuş spermatozoon akrozom reaksiyonuna girerek oositi dölleyebilmektedir (Akyol, 2005; Jin ve Yang, 2016; Shan vd., 2022). İn vitro fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için de bu değişimlerin taklit edilmesi gerekmektedir (Talevi ve Gualtieri, 2004).

İN vitro fertilizasyonda spermatozoon hazırlama tekniklerinin kullanıldığı farklı çalışmalar incelendiğinde kapasitasyon oranlarının %6-54,9 arasında değiştiği görülmektedir. İncelenen diğer spermatolojik parametrelere benzer şekilde kapasitasyonu gerçekleştiren spermatozoon oranının oldukça geniş bir aralıkta olduğu görülmektedir. Tez çalışmasına göre boğa sperması kapasitasyon medyumuna eklenen spermin, kapasitasyon oranını iyileştirmek adına yetersiz kalmıştır. Kontrol ve deney gruplarında fark bulunmamakla birlikte zamanla orantılı olarak kapasitasyon indeksinde artış görülmüştür. Bunun yanında hem kontrol hem spermin deney gruplarında bulunan kapasitasyon oranının diğer çalışmalarda bildirilen çoğu değerden yüksek olduğu dikkati çekmektedir (Carvalho vd., 2014; García-Herreros ve Leal, 2014; Gillan vd., 2008; Lavelle vd., 2023) (Çizelge 4.1)

**Çizelge 4.1.** Tez çalışması ile farklı çalışmaların spermatozoa kapasitasyon oranlarının karşılaştırması



Çizelgede sütunlar tez çalışması kapasitasyon genel ortalamasını, taralı bölge farklı çalışmalara ait kapasitasyon sonuçlarını göstermektedir. 0.s, sıfırncı saat; 1.s, birinci saat; 4.s, dördüncü saat

Rubinstein ve Breitbart (1991) spermının seminal plazmadaki ana dekapasitan faktör olduğunu öne sürmüşlerdir. Dişi genital kanalındaki yolculuğu sırasında belli etkiler altında spermının azalmasıyla dekapasitan etkinin ortadan kalkıyor olabileceği yorumunu sunmuşlardır. Rubinstein ve arkadaşları bu çalışmadan 4 sene sonra kapasitasyonu in vitro olarak gerçekleştirilen boğa spermasına sperm ekleyerek akrozom reaksiyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu çalışma boğa spermasına sperm eklemenin oluşturduğu etkiyi gösteren tek çalışma örneğidir. Bahsedilen çalışmada uygulanan iki sperm dozu arasında 1000 kat fark uygulanmış ve sadece akrozom reaksiyonuna etkisi açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada spermatozoonun kapasitasyonu sağlandıktan sonra 10 mikromolar (0,001 mM) sperm eklenmesi akrozomal reaksiyonu indüklerken 10 milimolar sperm eklenmesi ters etki göstererek inhibisyona sebep olmuştur. Etki bakımından 10 mikromolar eklenen sperm akrozom reaksiyon indüksiyonunu artırmıştır (Rubinstein vd., 1995). Bu çalışmada sperm spermatozoon üzerine dekapasitan etki oluşturmamıştır. Tez çalışmasında elde edilen veriler de bunu destekler niteliktedir. Kapasitasyon indeksi incelendiğinde kontrol ve sperm eklenen deney grupları arasında anlamlı bir fark görülmezken her bir grupta görülen kapasitasyon oranı zamanla orantılı olarak artış göstermiştir ( $p<0,001$ ). Çalışmada boğa sperması kapasitasyon medyumuna en düşük 0,01

mM ve en yüksek 1 mM spermin eklenmiş ve uygulanan 100 kat dozun dekapasitan etki oluşturmadığı, aksine kapasitasyon indeksinin zamanla orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.

Tez çalışmasında sperminin spermatozoon kapasitasyonu üzerine beklenen pozitif etkisi gözlenmemiştir ve bunun nedenini anlayabilmek için sperminin seminal plazmadaki çalışma mekanizma ayrıntısına inilmiştir. Bu bağlamda spermin mekanizmasını değerlendirmek amacıyla seminal plazma ve spermatozoaya eklenen siklik adenzin monofosfat (cAMP) araştırmaları incelenmiştir (Casillas vd., 1980; Mendez, 2018; Rodríguez-Páez vd., 2021; Shah vd., 1975; Yeung vd., 1989). Siklik adenzin monofosfat, ATP'den üretilen ikinci tip mesajcı bir moleküldür. Protein kinazları aktive etmekte ve takibinde bir dizi fizyolojik basamaklar sonucunda hücredeki kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) kanallarına bağlanarak kalsiyum iyonlarını serbest bırakmaktadır. Böylece hücre Ca<sup>2+</sup> geçişini düzenlemektedir (Khan Academy, 2024). İnsan seminal plazmasında 2-15 mM spermin bulunduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada 2,9 mM – 13,4 mM aralığında eklenen spermin, erkek sperm cAMP seviyesini birkaç kat artırmıştır. Buna göre insanlarda spermaya fizyolojik miktarlarda eklenen spermin cAMP seviyesini artırmada oldukça etkili olmuştur (Shah vd., 1975). Erkek spermasına eklenen fizyolojik miktarlardaki spermin etkilerinin incelendiği farklı bir çalışmada, kapasitasyona neden olan 3', 5'-siklik adenzin monofosfat nükleotid seviyesi önemli oranda artmıştır (Mendez, 2018). İnsan seminal plazmasına katılan spermin miktarı, seminal plazmada bulunan fizyolojik dozlar uygulandığında cAMP aktivite artışı sağlamıştır. Boğa seminal plazmasında bulunan fizyolojik spermin miktarı bilinmemektedir. Bu sebeple tez çalışmasında kullanılan dozlar; sığırlarda farklı dokular üzerine yapılan spermin çalışmalarında sperminin zararlı etkisinin görüldüğü dozların üzerine çıkmama ve farklı türlerdeki spermatozoon çalışmalarında uygulanan spermin miktarları temel alınarak karar verilmiştir. Ayrıca boğa seminal plazmasındaki spermin varlığının diğer türlere oranla düşük olabileceğinin bildirilmesi etkili olmuştur. Rubinstein ve arkadaşlarının 0,01 mM sperminin sperm akrozom reaksiyonunu artırdığını bildiren çalışma tez çalışmasında kullanılan en düşük dozu belirlemede rol oynamıştır. Ancak boğa seminal plazmasına eklenen sperminin cAMP aktivitesine etkisi incelendiğinde farklı hücreler üzerine yapılan çalışmalarda uygulanan spermin miktarlarından yüksek dozlarda sperminin cAMP aktivitesini artırdığı görülmüştür. Örneğın boğa spermatozoonuna 9,8 mM spermin eklenmiş ve adenilat siklaz aktivitesini artırdığı görülmüştür (Casillas vd., 1980). Farklı bir çalışmada, boğa sperminden elde edilen trypsin benzeri proteazın saflaştırılmış bir preparasyonu olan GTP gamma S, 20 mM den düşük dozdaki spermin varlığında adenilat siklaz aktivitesini inhibe etmemiştir (Yeung vd., 1989). Siklik adenzin monofosfat çalışmaları değerlendirildiğinde insanlarda spermatozoon

çalışmalarında kullanılan spermin dozlarıyla cAMP etki dozları benzerdir ancak boğa için yapılan çalışmalarda kullanılan dozlar ile seminal plazma ve spermatozoon cAMP / adenilat siklaz çalışmalarında uygulanan spermin dozları oldukça farklıdır. Farklı sığır dokularında, nispeten düşük dozlarda sperminin oluşturduğu zararlı etkinin sebebi olarak diğer türlere benzer şekilde sığır seminal plazmasının vücut sıvılarından daha yüksek spermin içeriyor olması düşünülebilir. İlişkili olarak tez çalışmasında kullanılan dozlar yetersiz kalmış olup beklenen etki sperminin daha yüksek dozlarının uygulanması durumunda görülebilir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında spermatozoon, in vitro fertilizasyon tekniğine uygun şekilde hazırlanarak kapasitasyon medyumuna sperminin farklı dozları eklenmiş ve 0, 1, 4 saatlik inkübasyon süresinin ardından spermatolojik parametreler üzerine etkileri ortaya konmuştur. Buna göre spermin maddesini eklemenin bazı motilite parametrelerini olumlu etkilediği görülmüş, farklı çalışmalara oranla daha iyi sonuçlar elde edildiği ortaya konmuştur. Tez çalışmasında kapasitasyon medyumuna eklenen 0,01 mM; 0,05 mM ve 0,1 mM spermin inkübasyon süresince motilite ve progresif motilitenin korunmasında etkili olmuştur. Dozların 0,5 mM ve 1 mM'a yükseltilmesi motilite ve progresif motilite açısından zararlı etki oluşturmuştur. Tez çalışması spermatozoon plazma ve akrozomal membran bütünlüğü açısından kendi içinde değerlendirildiğinde spermin eklenen gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark görülmemektedir. Bu açıdan sperminin kapasitasyon medyumunda inkübe edilmesi boğa spermasına pozitif etki oluşturmamıştır. Motilite ile ilişkilendirilen HMMP parametresi açısından yüksek oranların elde edilemediği görülmüştür.

Çalışma verileri kapasitasyon açısından kendi içinde değerlendirildiğinde kontrol ve deney grupları arasında anlamlı fark görülmezken zamana göre kapasitasyon oranındaki artış in vitro kapasitasyon için istenen ve hedeflenen bir sonuçtur. Spermin grupları ve kontrol grup verileri benzerdir. Bu genel olarak çalışmada spermatozoonun kapasite edilmesi üzerine başarısını göstermektedir ancak spermin eklenen gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı değildir. Bu açıdan tez çalışmasında uygulanan spermin dozlarının kapasitasyon üzerine pozitif etkinin görülmesinde yetersiz kaldığı değerlendirilmektedir.

Çalışma verileri ve spermin mekanizması birlikte değerlendirildiğinde motilite, progresif motilite ve paralelinde HMMP parametrelerinin 0,5 mM ve 1 mM dozlarında görüldüğü üzere spermin miktarı artıkça motilite ilişkili parametrelerde görülen düşüş etkisinin, kapasitasyon oranında hedeflenen artışın daha yüksek miktarlardaki spermin ile elde edilebileceği görüşünün mekanizma açısından uygun olduğu düşünülmektedir. Kalsiyum geçişinin artışı sağlayan cAMP, ATP'den açığa çıkmaktadır. İlişkili olarak spermatozoonda kapasitasyon oranı artıyorken motilitede düşüş görülmesi olağan karşılanabilir. Sperminin spermatozoon kapasitasyonu üzerine beklenen artırıcı etkisinin, daha yüksek spermin dozlarının çeşitli inkübasyon medyumlarına eklenerek elde edilebileceği öne sürülmektedir. Sonuçlara bakarak in vitro fertilizasyon ve ilişkili olarak in vitro kapasitasyon için

spermatozoon seçiminde kalite ve kullanılabilirliğini değerlendirme kriteri olarak, motilite ilişkili parametrelerin diğer spermatolojik parametrelerle birlikte değerlendirilmesinin daha yararlı olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada boğa spermasının in vitro fertilizasyon öncesinde gerçekleştirilen spermatozoon preinkübasyonu basamağında kapasitasyon medyumuna eklenen farklı dozlardaki sperminin, fertilizasyon başarısını değerlendirmede önemli kabul edilen spermatolojik parametreler üzerine etkisi incelenmiştir. Sperminin 0,01 mM; 0,05 mM ve 0,1 mM eklenmesi spermatozoon motilite yeteneğini korumada etkili olduğu ancak tüm gruplar açısından değerlendirildiğinde mitokondriyal membran potansiyeli, plazma membran ve akrozom bütünlüğü, kapasitasyon indeksini etkilemede uygulanan spermin miktarların yetersiz kaldığı görülmüştür. Tez çalışmasında elde edilen verilerle yukarıda bahsedilen cAMP çalışmaları birlikte değerlendirildiğinde boğa seminal plazmasında bulunan spermin miktarının diğer türlere oranla daha yüksek olabileceği düşünülmektedir. İn vitro fertilizasyonda kapasitasyon medyumuna eklenen sperminin boğa spermatozoon parametreleri üzerine etkisinin ortaya konduğu veriler ilk kez ortaya konmuştur. Elde edilen verilerin pekiştirilmesi veya geliştirilmesi; boğalarda inkübasyon medyumuna eklenen sperminin spermatozoon kalitesi üzerine etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için farklı çalışmaların ortaya koyulması gerekmektedir. Boğa spermasında kullanılacak optimum spermin miktarının belirlenmesi, sperminin boğa spermatozoonu üzerine etkisini daha iyi değerlendirebilmenin önünü açacaktır.

## KAYNAKLAR

- Akman, N. (2016). Hayvan ıslahı. *Anadolu Üniversitesi Yayınları Hayvan Yetiştirme Kitabı*, ISBN 978-975-06-0927-5.
- Akyol, N. (2005). Sığırlarda in vitro fertilizasyon. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 45(2),53-61.
- Alemdar, H. (2016). Memeli dişi genital kanalında spermatozoa taşınması ve spermatozoayı yönlendiren mekanizmalar. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- Allen, C.H. and Almquist, J.O. (1981). Effect of bulk freezing straws of bovine spermatozoa in a programmed freezer on pos-thaw survival. *Journal of Animal Science*, 53(6),1432–1439. <https://doi.org/10.2527/jas1982.5361432x>
- Amendola, R., Cervelli, M., Fratini, E., Polticelli, F., Sallustio, D. & Mariottini, P. (2009). Spermine metabolism and anticancer therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 9(2),118–130. <https://doi.org/10.2174/156800909787580935>
- Bachrach, U. and Heimer Y.M. (2021). The physiology of polyamines, Volume I. *CRC Press*, s: 1-30.
- Bag, S., Joshi, A., Naqvi, S.M. & Mittal, J.P. (2004).Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. *Theriogenology*, 62(3-4),415–424. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.018>
- Bailey, R. (2017). Christopher Polge and Lionel Edward Aston Rowson's experiments on the freezing of bull spermatozoa (1950–1952). <https://embryo.asu.edu/pages/christopher-polge-and-lionel-edward-aston-rowsons-experiments-freezing-bull-spermatozoa-1950>
- Barakat, I.A.H., Danfour, M.A., Galewan, F.A.M. & Dkhil, M.A. (2015). Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *BioMed Research International*, 2015,1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/948575>
- Bardocz, S. and White, A. (1999). Polyamines in health and nutrition. *Kluwer Academic Publishers*, s: 3-7.
- Baştan, İ. and Akçay, E. (2021). Quality assessment of frozen bull semen with the precursor A-kinase anchor protein 4 biomarker. *Andrologia*, 53(9). <https://doi.org/10.1111/and.14164>
- Bauersachs, S., Blum, H., Mallok, S., Wenigerkind, H., Rief, S., Prella, K. & Wolf, E. (2003). Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the

- postovulation period: A transcriptomics approach. *Biology of Reproduction*, 68(4),1170–1177. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010660>
- Bucci, D., Cunto, M., Gadani, B., Spinaci, M., Zambelli, D. & Galeati, G. (2019). Epigallocatechin-3-gallate added after thawing to frozen dog semen: Effect on sperm parameters and ability to bind to oocytes' zona pellucida. *Reproductive Biology*, 19(1),83–88. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.12.001>
- Bulgurcuoğlu Kuran, S. (2020). IUI ve ICSI'de laboratuvar süreci. *Androloji Bülteni*, 22,33–42. <https://doi.org/10.24898/tandro.2020.99267>
- Carvalho, J.O., Sartori, R., Machado, G.M., Mourão, G.B. & Dode, M.A.N. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology*, 74(9),1521–1530. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.030>
- Castellano, L., Arroyo-Salvo, C.A., Chiarante, N., Alonso, C.A.I., Lottero-Leconte, R.M., Vernaz, Z. J., Navarro, M., Mutto, A., Osycka-salut, C., Ribeiro M.L. & Perez-Martinez, S. (2021). Evaluation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin as a candidate marker for fertility in bull sperm samples. *Theriogenology*, 168, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.001>
- Çalışkan, İ. (2021). İlçe idarelerinde tarım ve hayvancılık politikaları: karabük eflani ilçesi üzerine bir inceleme. *Karabük Üniversitesi.* <http://acikerisim.karabuk.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1579/10433819.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Çevik, M. (2020). Çiftlik hayvanlarında in vitro fertilizasyon. *Ortadoğu Reklam Tanıtım Yayıncılık Turizm Eğitim İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş.*, s:20-30.
- Danzin, C., Jung, M.J., Claverie, N., Grove, J., Sjoerdsma, A. & Koch-Weser, J. (1979). Effects of  $\alpha$ -difluoromethylornithine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, on testosterone-induced regeneration of prostate and seminal vesicle in castrated rats. *Biochemical Journal*, 180(3),507–513. <https://doi.org/10.1042/bj1800507>
- Ealy, A.D., Wooldridge, L.K. & McCoski, S.R. (2019). Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *Journal of Animal Science*, 97(6),2555–2568. <https://doi.org/10.1093/jas/skz116>
- Ergün O.F., Bayram, B. (2021). Türkiye'de hayvancılık sektöründe yaşanan değişimler. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 10 (2), 158-175.
- Etkovitz, N., Rubinstein, S., Daniel, L. & Breitbart, H. (2007). Role of PI3-Kinase and PI4 kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 77(2),263–273. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.056705>

- Facchiano, F., D'Arcangelo, D., Riccomi, A., Lentini, A., Beninati, S. & Capogrossi, M.C. (2001). Transglutaminase activity is involved in polyamine-induced programmed cell death. *Experimental Cell Research*, 271(1), 118–129. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5356>
- Fayrer-Hosken, R. (1997). Anatomy and physiology of the bull's reproductive system. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 13(2), 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30335-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30335-2)
- Ferrer, M., Anderson, D., Miller, L., George, A., Miesner, M. & Wilkerson, M. (2016). Effect of bovine sperm-bound antisperm antibodies on oviductal binding index. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(2), 287–293. <https://doi.org/10.1111/rda.12679>
- Ferrer, M.S., Klabnik-Bradford, J., Anderson, D.E., Bullington, A.C., Palomares, R.A., Miller, L.M.J., Stawicki, R. & Miesner, M. (2017). Sperm-bound antisperm antibodies prevent capacitation of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 89, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.012>
- Fiser, P.S., Hansen, C., Underhill, L. & Marcus, G.J. (1991). New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 28(5), 454–459. doi:10.1016/0011-2240(91)90054-r New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 28(5): 454–459. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(91\)90054-R](https://doi.org/10.1016/0011-2240(91)90054-R)
- Fraser, L. (2017). Markers for sperm freezability and relevance of transcriptome studies in semen cryopreservation: A review. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68651>
- Fumuso, F.G., Chaves, G., Neild, D.M., Miragaya, M.H., Bertuzzi, M.L. & Carretero, M.I. (2020). Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. *Andrologia*, 52(6):e13597. <https://doi.org/10.1111/and.13597>
- Gillan, L., Kroetsch, T., Chis Maxwell, W.M. & Evans, G. (2008). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*, 103(3-4), 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.12.010>
- Gökçen, H. (2017, 22 Aralık). Dünya'da ve Türkiye'de sun'i tohumlamanın tarihçesi. <https://www.hazimgokcen.net/mesleki-tarih/dunyada-ve-turkiyede-suni-tohumlamanin-tarihcesi/>
- Graham, J.K. (2001). Assessment of sperm quality: a flowcytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68:239-247. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00160-9)
- Gutiérrez-Añez, J.C., Henning, H., Lucas-Hahn, A., Baulain, U., Aldag, P., Sieg, B., Hensel, V., Herrmann, D. & Niemann, H. (2021). Melatonin improves rate of monospermic fertilization and early embryo development in a bovine IVF system. *Plos One*, 16(9):e0256701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256701>

- Gündoğan, M. (1998). İneklerde in vitro fertilizasyon. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 8 (2): 103-115.
- Hasler, J.F. and Barfield, J.P. (2021). In vitro fertilization. *Bovine Reproduction*, 1124–1141. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch89>
- Hopper, R.M. (2021). Bovine reproduction. *John Wiley and Sons*, s:10-69.
- Huang, Q.Y., Rong, M.H., Lan, A.H., Lin, X.M., Lin, X.G., He, R.Q. & Li, M.J. (2017). The impact of atosiban on pregnancy outcomes in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer: A meta-analysis. *Plos One*, 12(4),e0175501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175501>
- Hunter, R.H., Wilmut, I. (1984). Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reproduction Nutrition Development*, 24,597–608. <https://doi.org/10.1051/rnd:19840508>
- Invitrogen, (2006, 20 Mart). JC-1 and JC-9 mitochondrial potential sensors. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp03168.pdf>.
- Invitrogen, (2009, 20 Mart). Fluo-4 direct™ calcium assay kits. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp10471.pdf>
- Itahashi, T., Oikawa, T., & Numabe, T. (2022). Effects of glutathione treatments during sperm washing and in vitro fertilization on the in vitro early development of embryos of Japanese Black cattle. *The Journal of Reproduction and Development*, 68(1),74–78. <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-070>
- İşler, H. and Ünlü Ören, H.G. (2021). Dünya’da bölgelerde ve türkiye’de hayvancılık sektörü. *Sosyal ve beşeri bilimler araştırma dergisi*, (22),48.
- İnanç, M.E. and Daşkın, A. (2015). Sığırlarda suni tohumlama uygulamaları yönünden genomik seleksiyonun önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimler Dergisi*, 10(2),139-145. <https://doi.org/10.17094/avbd.98368>
- Janne, J., Alhonen, L. & Pietila, M. (2004). Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *European Journal of Biochemistry*, 271(5),877-94. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04009.x>
- Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J.A., García, A., Betancourt, M. & Fierro, R. (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction

- in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59(5-6), 1171–1180. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01175-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01175-5)
- Jin, S.K. and Yang, W.X. (2016). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*, 8(2):3600-3627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12274>
- Kaneko, S., Ueda-Yamada, M., Ando, A., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Matsumura, M. & Ito, S. (2007). Cytotoxic effect of spermine on retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(1), 455. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0379>
- Keskin, O., Tekin, N. & Akçay, E. (1995). Erbro ırkı horoz spermalarının farklı sulandırıcı ve kryoprotektanlarla dondurulması. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 35 (3-4) 110-125.
- Khan academy, (2024, 30 Nisan). Sinyal Aktarım Yolakları. <https://tr.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/changes-in-signal-transduction-pathways/a/intracellular-signal-transduction>
- Konyalı, S. and İnan, O. (2018). Türkiye'de kırmızı et sektörü ve hayvancılık politikaları. *Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Köseoğlu, İ.E. and Güner, A. (2021). Sığırlardan elde edilen besinlerden kaynaklanan başlıca zoonotik hastalıklar. *Akademik Et ve Süt Kurumu Dergisi*, (1), 63-79.
- Lasiene, K., Gedrimas, V., Vitkus, A., Glinskyte, S., Lasys, V., Valanciute, A. & Sienkiewicz, W. (2013). Evaluation of morphological criteria of sperm quality before in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16: 4. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0112>
- Lavelle, G., Cairo, B. & Barfield, J.P. (2022). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin treatment of bovine sperm on capacitation timing. *Reproduction Domestic Animal*, 14277. <https://doi.org/10.1111/rda.14277>
- Lea, R. G., Porat, O., Daya, S., Fujiwara, K. & Clark, D.A. (1991). The detection of spermine and spermidine in human in vitro fertilization supernatants and their relation to early embryo-associated suppressor activity. *Fertility and Sterility*, 56(4): 771–775. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)54614-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)54614-7)
- Lee, H.L., Kim, S.H., Ji, D.B. & Kim, Y.J. (2009). A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *Journal of Veterinary Science*, 10(3), 249. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.3.249>
- Lefèvre, P.L. C., Palin, M.F. & Murphy, B.D. (2011). Polyamines on the reproductive landscape. *Endocrine Reviews*, 32(5): 694–712. <https://doi.org/10.1210/er.2011-0012>

- Lenis, Y.Y., Elmetwally, M.A., Maldonado-Estrada, J.G. & Bazer, F.W. (2017). Physiological importance of polyamines. *Zygote*, 25(03), 244–255. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000120>
- Li, Y., Kalo, D., Zeron, Y. & Roth, Z. (2014). Progressive motility – a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Zygote*, 24(01), 70–82. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000720>
- Li, J., Ning, B., Cao, X., Luo, Y., Guo, L., Wei, G., Liu, S., Zhang, Y., Wu, R. & Li, Y. (2016). Separation of motile sperm for in vitro fertilization from frozen-thawed bull semen using progesterone induction on a microchip. *Animal Reproduction Science*, 172, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.07.002>
- Li, J., Zhu, S., He, X., Sun, R., He, Q., Gan, Y., Liu, S., Funahashi, H. & Li, Y. (2016). Application of a microfluidic sperm sorter to in vitro production of dairy cattle sex-sorted embryos. *Theriogenology*, 85(7), 1211–1218. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.001>
- Lockwood, D.H., Lipsky, J.J., Meronk, F. & East, L.E. (1971). Actions of polyamines on lipid and glucose metabolism of fat cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44(3), 600–607. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(71\)80125-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(71)80125-0)
- Macindoe, J.H. & Turkington, R.W. (1973). Hormonal regulation of spermidine formation during spermatogenesis in the rat. *Endocrinology*, 92(2): 595–605. <https://doi.org/10.1210/endo-92-2-595>
- Marchetti, P., Ballot, C., Jouy, N., Thomas, P. & Marchetti, C. (2011). Influence of mitochondrial membrane potential of spermatozoa on in vitro fertilisation outcome. *Andrologia*, 44(2): 136–141. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01117.x>
- Marquez, B., & Suarez, S. S. (2004). Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of reproduction*, 70(6), 1626–1633. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026476>
- Melendrez, C.S., Ruttle, J.L., Hallford, D.M., Chaudhry, P.S. & Casillas, E.R. (1992). Polyamines in ejaculated ram spermatozoa and their relationship with sperm motility. *Journal of Andrology*, 13(4):293-6. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1992.tb00318.x>
- Mendez J.D. (2018). Polyamine Metabolism in Sperm Cell. *Diabetes Complications*, 2(2): 1-3. [https://www.researchgate.net/publication/330927546\\_Polyamine\\_Metabolism\\_in\\_Sperm\\_Cell](https://www.researchgate.net/publication/330927546_Polyamine_Metabolism_in_Sperm_Cell)
- Morales, M. E., Rico, G., Bravo, C., Tapia, R., Alvarez, C. & Méndez, J. D. (2003). Progressive motility increase caused by L-arginine and polyamines in sperm from patients with idiopathic and diabetic asthenozoospermia. *Ginecología y obstetricia de Mexico*, (71):297-303.

- Morrell, J. M. (2019). Effect of colloid centrifugation on boar sperm quality during storage and function in vitro fertilization. *Theriogenology*, (137):122-126. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.046>
- Mortimer, S.T. and Mortimer, D. (1990). Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *Journal of Andrology*, 11:195–203.
- Mortimer ST (2013). CASA—Practical aspects. *Journal of Andrology*, 21(4): 515-524. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x>
- Olğaç, K. T. and Akçay, E. (2021). Effects of Spermine and Spermidine supplemented extenders on post-thaw Spermatological Parameters in Stallion Semen Cryopreservation. *Cryobiology*, (100):72-76. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.03.008>
- Pegg, A.E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *The International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 61(9): 880-94. <https://doi.org/10.1002/iub.230>
- Pegg, A. E., Lockwood, D. H. & Williams-Ashman, H. G. (1970). Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic synthesis during androgen-induced prostatic growth. *Biochemical Journal*, 117(1), 17–31. <https://doi.org/10.1042/bj1170017>
- Peres Campanholi, S., Garcia Neto, S., Basso, A. C., de Agostini Losano, J. D., Perez Siqueira, A. F., Nichi, M., Ortiz d'ávila Assumpção, M.E., Afonso de Freitas, L., Paro de Paz, C.C., Ferraudo, A.S., Morato Monteiro, F. & Unno gímenes, L. (2021). Estimate of in vitro embryo production based on sperm subpopulations in Senepol bulls. *Theriogenology*, 161, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.019>
- Pregl Breznik, B., Kovačić, B. & Vlajsavljević, V. (2013). Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? *Fertility and Sterility*, 99(5), 1233–1241. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.048>
- Porat, O. and Clark, D. A. (1990). Analysis of immunosuppressive molecules associated with murine in vitro fertilized embryos. *Fertility and Sterility*, 54(6): 1154–1161. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)54021-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)54021-7)
- Pregl Breznik, B., Kovačić, B. & Vlajsavljević, V. (2013). Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? *Fertility and Sterility*, 99(5): 1233–1241. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.048>
- Purdy, P. H., Graham, J. K. & Azevedo, H. C. (2021). Evaluation of boar and bull sperm capacitation and the acrosome reaction using flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 106846. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.10684>

- Putri, A.R.I, Ciptadi, G., Wahyuningsih, S. & Wibowo, W.G. (2019). Boer Spermatozoa Quality in Different Incubation Periods and Medium for In Vitro Fertilization (IVF) Preparation. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 391(1):012017. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/391/1/012017>
- Qanbari, S., Pausch, H., Jansen, S., Somel, M., Strom, T.M., Fries, R., Nielsen, R. & Simianer, H. (2014). Classic Selective Sweeps Revealed by Massive Sequencing in Cattle. *PLoS Genetics*, 10(2), e1004148. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004148>
- Qian, Z.U., Tsai, Y.H., Steinberger, A., Lu, M., Greenfield, R.L. & Haddox, M.K. (1985). Localization of ornithine decarboxylase in rat testicular cells and epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 33(5): 1189–1195. <https://doi.org/10.1095/biolreprod33.5.1189>
- Quinn, P., Whittingham, D. G. & Stanger, J. D. (1982). Interaction of semen with ova in vitro. *Archives of andrology*, 8(3):189-98. <https://doi.org/10.3109/01485018208987039>
- Ramirez-diaz, J., Cenadelli, S., Bornaghi, V., Bongioni, G., Montedoro, S.M., Achilli, A., Capelli, C., Rincon, J.C., Milanese, M., Passamonti, M.M., Colli, L., Barbato, M., Williams, J.L. & Ajmone Marsan, P. (2023). Identification of genomic regions associated with total and progressive sperm motility in Italian Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, 106(1):407-420. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21700>
- Reichhardt, C. C., Ahmadpour, A., Christensen, R. G., Ineck, N. E., Murdoch, G. K. & Thornton, K. J. (2021). Understanding the influence of trenbolone acetate and polyamines on proliferation of bovine satellite cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 74, 106479. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106479>
- Rodríguez-Tobón, E., Fierro, R., González-Márquez, H., García-Vázquez, F. A. & Arenas-Ríos, E. (2021). Boar sperm incubation with reduced glutathione (GSH) differentially modulates protein tyrosine phosphorylation patterns and reorganization of calcium in sperm, in vitro fertilization, and embryo development depending on concentrations. *Research in Veterinary Science*, 135:386-396. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.020>
- Rubinstein, S. and Breitbart, H. (1991). Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biochemical Journal*, 278(1): 25–28. <https://doi.org/10.1042/bj2780025>
- Rubinstein, S., Lax, Y., Shalev, Y. & Breitbart, H. (1995). Dual effect of spermine on acrosomal exocytosis in capacitated bovine spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1266: 196-200. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(95\)00007-f](https://doi.org/10.1016/0167-4889(95)00007-f)
- Sağırkaya, H. (2009). Sığırlarda embriyo transfer uygulaması ve Türkiye açısından önemi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28(2): 11-19.

- Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., Tomaskovic, A., Petric, J., Surina, J., Grizelj, J. & Karadjole, T. (2006). A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*, 91(3-4), 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.005>
- Sarıözkan, S. (2004). Çiftlik hayvanlarında in vitro maturasyon ve fertilizasyon. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 44 (2): 47-52.
- Schulze, M., Mohammadpour, F., Schröter, F., Jakop, U., Hönicke, H., Hasenfuss, T., Henne, H., Schön, J. & Müller, K. (2021). Suitability of semen stress tests for predicting fertilizing capacity of boar ejaculates. *Theriogenology*, (176): 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.024>
- Sepúlveda, B., Arias, M. E., Aguila, L., Zambrano, F., Sánchez, R. & Felmer, R. (2018). Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? *Andrologia*, 50(3), e12921. <https://doi.org/10.1111/and.12921>
- Serin, İ. and Tekin, N. (2003). Dondurulmuş boğa spermasının değişik kapasitör maddelerle in vitro kapasitasyonu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 50: 39-46. [https://doi.org/10.1501/Vetfak\\_0000002228](https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002228)
- Setyawan, E. M. N., Kim, M. J., Oh, H. J., Kim, G. A., Jo, Y. K., Lee, S. H., Choi, Y. B. & Lee, B. C. (2016). Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 429(4):927-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.091>
- Shah, G. V., Sheth, A.R., Mugatwala, P.P. & Rao, S.S. (1975). Effect of spermine on adenylyl cyclase activity of spermatozoa. *Experientia*, 31(6), 631–632. <https://doi.org/10.1007/BF01944596>
- Shan, S., Xu, F., Hirschfeld, M., Herrmann, C., Schulze, M., Sharifi, A. R., Hoelker, M. & Brenig, B. (2022).  $\alpha/\beta$ -hydrolase d16b truncation results in premature sperm capacitation in cattle. *International journal of molecular sciences*, 23(14):7777. <https://doi.org/10.3390/ijms23147777>
- Sharbatoghli, M., Valojerdi, M.R., Amanlou, M., Khosravi, F. & Jafar-abadi, M.A. (2012). Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 286(5), 1315–1322. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2440-1>
- Shi, Q.X., Zhong, C.L., Ye, Z., Yuan, Y.Y., Ren, Y. & Wang, Z.J. (1991). Spermine inhibition of in vitro fertilizing ability of human spermatozoa and its possible mode of action. *Sheng li Xue Bao*, 43(5):480-8.
- Shohat, B., Maayan, R., Singer, R., Sagiv, M., Kaufman, H. & Zukerman, Z. (1990). Immunosuppressive activity and polyamine levels of seminal plasma in azo-spermic,

- oligospermic, and normospermic men. *Archives of Andrology*, 24(1): 41–50. <https://doi.org/10.3109/01485019008986857>
- Shubhada, S., Lin, S. N., Qian, Z. Y., Steinberger, A. & Tsai, Y. H. (1989). Polyamine Profiles in Rat Testis, Germ Cells and Sertoli Cells During Testicular Maturation. *Journal of andrology*, 10(2), 145–151. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1989.tb00076.x>.
- Sobeh, M., Hassan, S. A., Hassan, M. A. E., Khalil, W. A., Abdelfattah, M. A. O., Wink, M. & Yasri, A. (2020). A polyphenol-rich extract from entada abyssinica reduces oxidative damage in cryopreserved ram semen. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:604477. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.604477>
- Soda K. (2020). Spermine and gene methylation: a mechanism of lifespan extension induced by polyamine-rich diet, *Amino Acids* 52(2):213-224. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02733-2>
- Sönmez, M. and Fırat, F. (2022). Bilgisayar destekli sperma analiz (CASA) sistemiyle yapılan incelemelerde spermatozoonların motilitesini ve kinematik değerlerini etkileyen faktörler. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 36(2):153-164.
- Stanger, J. D. & Quinn, P. (1982). Effect of polyamines on fertilization of mouse ova in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 220(3): 377–380. <https://doi.org/10.1002/jez.1402200313>
- Swift, T. A. & Dias, J. A. (1988). Testosterone Suppression of Ornithine Decarboxylase Activity in Rat Sertoli Cells. *Endocrinology*, 123(2): 687–693. <https://doi.org/10.1210/endo-123-2-687>
- Talevi, R. and Gualtieri, R. (2004). In vivo versus in vitro fertilization. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 115, S68–S71. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.01.015>
- Tekin, N., Daşkın, A. & Akçay, E. (2000). Boğa spermatozoonlarında in vitro kapasitasyon ve fertilizasyon. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 25 (2001): 349-358.
- Terin M. (2014). Dünya süt ve süt ürünleri üretim, tüketim, fiyat ve ticaretindeki gelişmeler. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(3): 53-63.
- Tırpan, M.B., Akçay, E., Çebi, Ç., Akşen, Ü., Yıldırım, S. & Tekin, N. (2015). In vitro evaluation of short-term preserved stallion semen in different doses and temperatures. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(4): 539-544. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.12893>
- Tırpan, M.B., Olğaç, K.T., Korkmaz, F., Sonat, A., Kaya, U. & Akçay, E. (2022). Fertility comparison of frozen bull semen stored in cryogenic deep freezer (–152 °C) and LN2 container. *Theriogenology*, (185): 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.03.017>

- Tırpan, M.B., Tekin, N. (2018). Seleksiyon ve damızlık boğa seçim kriterleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(1):85-95. <https://doi.org/10.24880/maeuvsd.390933>
- Tüik Veri Portalı, (2023, 20 Mart). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2023-49681#:~:text=B%C3%BCy%C3%BCkba%C5%9F%20hayvan%20kategorisinde%2C%20s%C4%B1%C4%9F%C4%B1r%20say%C4%B1s%C4%B1,161%20bin%20749%20ba%C5%9F%20oldu>
- Underwood, S.L., Bathgate, R., Maxwell, W.M. & Evans, G. (2009). In vitro characteristics of frozen-thawed, sex-sorted bull sperm after refreezing or incubation at 15 or 37 °C. *Theriogenology*, 72(7), 1001–1008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.023>
- Weiner, K. X., Pentecost, B. T. & Dias, J. A. (1990). Testosterone decreases ornithine decarboxylase messenger RNA levels in primary cultures of rat sertoli cells. *Molecular Endocrinology*, 4(8):1249-1256. <https://doi.org/10.1210/mend-4-8-1249>
- Williams-Ashman, H.G. and Lockwood, H. (1970). Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 171(3 Metabolism an), 882–894.
- Wu, G. (2018). Principles of animal nutrition. *Taylor & Francis group*, s: 651.
- Varışlı, Ö. and Akyol, N. (2018). Süt sığırcılığında üreme verimini etkileyen faktörler. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 58 (Özel Sayı) 1-6.
- Vianna, F.P., Papa, F.O., Zahn, F.S., Melo, C.M. & Dell'Aqua, J A., Jr (2009). Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. *Animal Reproduction Science*, 113(1-4): 279-282. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.06.009>
- Vincent, P., Underwood, S.L., Dolbec, C, Bouchard, N., Kroetsch, T. & Blondin, P. (2021). Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Bovine Reproduction*, 1019–1031.
- Yagcı, A. (2013). İn vitro fertilizasyon ve intrastoplazmik sperm enjeksiyonu için hyaluronik asite bağlanma ile sperm seçme tekniği. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 32(1): 11-17.
- Yılmaz, F. (2020). Sperm değerlendirme testleri; dünden bugüne. *Sağlık Bilimleri ve Tıp Dergisi*, 3(1): 71-76. <https://doi.org/10.32322/jhsm.660649>
- Zhong, C.L., Xin, X.H. & Shi, Q.X. (1993). Inhibition of spermine on calcium influx during capacitation of guinea pig spermatozoa in vitro. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 14(2):141-144.