



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**DONDURULMUŞ BOĞA SPERMASI KALİTESİNİN
ProAKAP4 PROTEİN SEVİYE TESTİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

İlktan BAŞTAN

**DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ergun AKÇAY**

**ANKARA
2020**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DONDURULMUŞ BOĞA SPERMASI KALİTESİNİN
ProAKAP4 PROTEİN SEVİYE TESTİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ

İlktan BAŞTAN

DÖLERME ve SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ergun AKÇAY

ANKARA
2020

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Dondurulmuş Boğa Sperması Kalitesinin ProAKAP4 Protein Seviye Testi ile Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak hazırlanmıştır. Tezimin fikir ve hipotezi tümüyle tez danışmanıma ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: İlktan BAŞTAN

Tarih: 30.06.2020

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Türkiye Hayvancılık Politikalarında Suni Tohumlamanın Yeri	1
1.2. Dondurulmuş Boğa Sperması Endüstrisi	4
1.3. Türkiye’de Ölçeklerine Göre Sığır İşletmelerinin Reprodüktif Stratejileri	6
1.4. Reprodüktif Başarıda Sperma Analizlerinin Önemi	9
1.5. Başlıca İleri Teknoloji Spermatozoon Analiz Teknikleri	10
1.5.1. Bilgisayar Destekli Spermatozoon Analiz Sistemleri (CASA)	10
1.5.1.2. CASA Sistemlerinin Dezavantajları	13
1.5.1.3. CASA Analizlerinin Fertilite ile İlişkisi	14
1.5.2. Spermatozoon Kalitesinin Akış Sitometri (Flow Cytometry) Cihazı ile Değerlendirilmesi	16
1.5.2.1. Spermatozoon Plazma Membran Bütünlüğü	16
1.5.2.2. Spermatozoon Akrozom Bütünlüğü	17
1.5.2.3. Spermatozoon Mitokondrial Membran Potansiyeli	17
1.5.2.4. Spermatozoon Kapasitasyon Reaksiyonu	18
1.5.2.5. Spermatozoon Oksidatif Stresinin Belirlenmesi	18
1.5.2.6. Spermatozoon DNA Bütünlüğü	19
1.5.3. Sperma Proteinlerinin Moleküler Analizi	19
1.5.3.1. Spermatozoon Proteinleri ve Fertilite ile İlişkisi	20
1.5.3.1.1. A-kinaz Bağlayıcı Proteini-4 (AKAP4) ve A-kinaz Bağlayıcı Protein-4 Prekürsör Proteini (ProAKAP4)	21
1.5.3.1.2. Alfa-Enolaz (ENO1)	22
1.5.3.1.3. Apolipoprotein A-1 (APOA1)	22
1.5.3.1.4. Calicin (CCIN) veya Perinükleer Teka-60 (PT60)	23
1.5.3.1.5. Histone-2 Proteinin (H2B) subakrozomal varyantı (SUBH2BV)	23
1.5.3.1.6. Protamin (PRM)	23
1.5.3.1.7. Sitokrom b-c1 Kompleks Alt Birimi-2 (UQCRC2)	24
1.5.3.1.8. Spermatozoon Kuyruk Dış Fiber Proteini-2 (ODF2)	24
1.5.3.1.9. Spermatogenezis ile İlişkili Protein-18 (SPATA18)	24
1.5.3.1.10. Voltaj Bağlı Anyon Kanal Proteini-2 (VDAC2)	25
1.5.3.2. Başlıca Spermatozoon Minör Proteinleri	26
1.5.3.3. Seminal Plazma Proteinleri	26
1.5.3.3.1. Sığır Seminal Plazma Proteini (BSP)	27
1.5.3.3.2 Diğer Seminal Plazma Proteinleri	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	31

2.1. Gereç	31
2.2. Yöntem	31
2.2.1.Dondurulmuş-Çözdürülmüş Boğa Spermalarının ELİZA Yöntemiyle proAKAP4 Protein Seviyelerinin Tespiti	31
2.2.1.1. ELİZA Testinin Uygulanması	33
2.2.2. Spermatozoon Termorezistans Testi	35
2.2.3. Motilite, Progresif Motilite ve Spermatozoon Hareket Özellikleri	36
2.2.4. Anormal Spermatozoon Oranı	37
2.2.5. Spermatozoon Plazma Membran Bütünlüğü	38
2.2.6. Spermatozoon Yoğunluğunun Tespiti	39
2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme	39
3. BULGULAR	41
4. TARTIŞMA	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
ÖZET	64
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66
EKLER	83
Ek-1. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı	83
ÖZGEÇMİŞ	85

ÖNSÖZ

Dondurulmuş boğa spermasının, yardımcı üreme teknikleri ile kullanımı, tüm Dünyada sürü ıslahı amacıyla kullanılan en yaygın biyoteknolojik yöntemdir. Bu yöntemin yaygınlaştırılması her zaman hayvancılık politikaları içerisinde, stratejik bir planlama olmuştur.

Suni tohumlama uygulamasının başarılı olması için, dondurulmuş spermanın kalite ve yaşam gücü açısından değerlendirilmesi temel ilkedir. Bu amaçla, birçok in vitro sperma analiz yöntemleri (morfolojik değerlendirme, spermatozoon kinematik analizi, mikroskopik muayene vb.) bulunmaktadır. Bu in vitro analiz yöntemlerinin temel amacı, spermatozoon analizinde objektif değerlendirme yaparak spermatozoon fertilite yeteneğini ortaya koymaktır. Böylece kalitesi ve yaşam kabiliyeti düşük spermaların, hayvancılık işletmelerinde kullanımı önlenerek olası ekonomik kayıpların önüne geçilmesi hedeflenmektedir. Ülkemizde 7 milyon düzeyinde boğa altı hayvan olduğu düşünüldüğünde, olası dondurulmuş spermaya bağlı verim kaybının ulusal çapta ekonomik kayıplara neden olması tartışılmazdır. Ayrıca bu durum büyükbaş hayvan yetiştiricisinin yardımcı üreme tekniklerinin yerine tabii tohumlamayı tercih etmesine neden olarak, koitus yoluyla bulaşan hastalıkların yaygınlaşmasına fırsat verebilir. Nitekim bu durum sadece hayvan sağlığını değil insan sağlığını da tehdit eden zoonoz hastalıkların yayılmasına ve gıda güvenliğinin sekteye uğramasına yol açabilir. Belirtilen durumlara sebebiyet vermemek için, sperma analiz metodlarını, gelişen ileri analiz teknikleri ile revize etme ve optimizasyon çalışmaları her geçen gün devam etmektedir. Bu çalışmalar içerisinde sperma proteomik çalışmaları çok yönlü diyagnoz kapasitesiyle son dönemde ön plana çıkmaktadır.

“İnsan Genom Projesi” 20. yüzyılın sonunda başlayan, 10 yılı aşkın süren çok uluslu bir projedir. Bu proje sonucunda genlerin birbirlerine göre konumları ve hangi kromozomlar üzerinde bulunduğunu belirten bir insan gen haritası çıkarılmıştır. Bu projede farklı organizmaların DNA dizilimleri karşılaştırılarak çok sayıda yeni gen

keşfedilmiştir. Ayrıca eş zamanlı olarak farklı hayvan türlerinde genom çalışmaları devam etmiştir. Laboratuvar ortamında gen nakavtı yöntemiyle yapıları bozulan genlerin, farelerde ortaya çıkardığı anomalilere bakılarak normal şartlarda ilgili genin ne tür işlevleri olduğu öğrenilmiştir. Bu proje gelecek dönemde moleküler disiplinlerin gelişimine ivme kazandırmıştır. Bu disiplinlerden biri olan Proteom veya Proteomik; protein ve genom kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşturulan, bir organizmanın, genlerinin kodladığı proteinlerin profilini ve fonksiyonunu ortaya koyan bilim dalıdır. Son dönemde proteomik çalışmalar, endüstriyel üretimi yapılan hayvan türlerindeki, sperma proteinlerinin fertilite ile ilişkisine odaklanmıştır. Global ticareti yapılan boğa spermasının proteomik çalışmaları sonucunda yaklaşık 5 bin protein keşfedilmiş, bu proteinlerden bir kısmı tanımlanmış ve fertilite ile ilişkisi ortaya konulmuştur. Bu proteinlerden biri olan AKAP4, spermatozoon flagellum yapısında bulunan ve spermatozoon motilite hareketinde diyagnoz bir protein olarak görülmektedir. Son dönemdeki çalışmalar aynı işleve AKAP4 proteinin prekürsörü olan proAKAP4 proteinin de sahip olduğu ve diyagnoz bir protein olarak kullanılabileceği yönündedir. Bu tez çalışmasında spermatozoon proAKAP4 seviyesinin tespiti, oldukça yeni bir analiz metodu olan ELİZA tekniği ile tespit edilerek, yaygın spermatozoon analiz yöntemleri ile karşılaştırılması ve etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

Doktora öğrenimim boyunca, tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde her zaman desteğini hissettiğim danışman hocam sayın Prof. Dr. Ergun AKÇAY'a; tecrübelerinden her zaman istifade ettiğim sayın Dr. Hüseyin KİNET'e; tez çalışmam süresince emeklerini ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Doğukan ÖZEN, Dr. Öğr. Üyesi Koray TEKİN, Dr. Fırat KORKMAZ ve Dr. Ufuk KAYA'ya; Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nın tüm akademik ve idari personeline; Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi, Biyoteknoloji ve Fizyoloji Bölümü, Suni Tohumlama Şubesi mesai arkadaşlarıma; her zaman beni destekleyen, tebessümleri ile beni her daim motive eden Eşim Serap ve Oğlum Yağız Efe'ye teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
2D-PAGE	İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi
ACOT-9	Açıl koenzim-A-tiyoesteraz-9
ACTL-7B	Aktin benzeri protein-7B
AKAP4	A-kinaz Bağlayıcı Proteini-4
ALH	Kaput spermatozoonun ortalama yoldan laterale sapma uzaklığı
APOA1	Apolipoprotein A-1
Ar-Ge	Araştırma ve geliştirme
aSFP	Asidik seminal sıvı proteini
BCF	Çapraz atım sıklığı
BSP	Sığır seminal plazma proteini
°C	Santigrat
Ca	Kalsiyum
CALM-1	Kalmodulin-1
CASA	Bilgisayar destekli sperma analizi
CCIN	Calicin
CTC	klortetrasiklin
DCFDA	5-(ve-6)-karboksil-2',7'-diklorofloresan diasetat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EH	Etidyum homodimer
ELİZA	Enzim-bağımlı immünosorbent analizi
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FMP	İleri motilite proteini
GAPDHS	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
HBP	Heparin bağlayıcı proteinler
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HSP	Isı şoku proteini

Hz	Hertz
JC-1	5,5',6,6-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-karbosiyanin iyodür.
kDa	Kilo dalton
LIN	Çizgisellik
MITO	MitoTracker
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
°	Derece
O ₂ ⁻	Süperoksit
ODF-2	Spermatozoon kuyruk dış fiber proteini-2
P25b	25 kDa protein beta
PEBP1	Fosfatidil etanolamin bağlayıcı protein-1
PEBP4	Fosfatidil etanolamin bağlayıcı protein-4
PI	Propidyum iyodür
PKA	Protein kinaz-A
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> (yer fıstığı) aglütini
PRM	Protamin
proAKAP4	A-kinaz Bağlayıcı Protein-4 Prekürsör Proteini
PSA	<i>Pisum sativum</i> (bezelye) aglütini
PT60	Perinükleer Teka 60
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SCSA	Spermatozoon kromatin yapı analizi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SMCP	Sistein bakımından zengin salgı proteini
SPADH-2	Spermadhezin-Z2
SPAG-6	Spermatozoon ilişkin antijen-6
SPATA-18	Spermatogenezis ile ilişkili protein-18
ST	Suni tohumlama
STR	Doğrusallık

TL	Türk Lirası
TM-5	Transmembrane proteini-5
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz (Tdt)-aracılı deoksiuridin trifosfat (dUTP)- biotin nick end-labelling testi
UHAEM	Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi
UQCRC-2	Sitokrom b-c-1 kompleks alt birimi-2
VAP	Ortalama yol hızı
vb	Ve benzeri
VCL	Eğri-çizgisel hız
VDAC-2	Voltaj bağlı anyon kanal proteini-2
VSL	Doğru-çizgisel hız
Yo-Pro-1	trimetil-[3-[4-[(Z)-(3-metil-1,3-benzoxazol-2ylidene)methyl]quinolin-1ium-1-y]propyl]azanium;diiodide
WOB	Yalpalama
ZP2	Zona pellusida proteini 2

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Spermatozoon hareket iz düşümünün hız ve yol tanımları.	11
Şekil 1.2. Bazı spermatozoon proteinlerinin lokasyonu.	25
Şekil 2.1. ProAKAP4 ELİZA testinin uygulama aşamaları.	32
Şekil 2.2. ProAKAP4 ELİZA testinin uygulanışı.	34
Şekil 2.3. ELİZA okuyucusunda mikropın değerlendirilmesi.	35
Şekil 2.4. Spermatozoon CASA analizi görüntü diyagramı.	36
Şekil 2.5. Normal ve anormal spermatozoonların morfolojik mikroskop görüntüleri.	38
Şekil 2.6. HOST (+) ve HOST (-) spermatozoonların mikroskop görüntüsü.	38
Şekil 3.5. Spermatozoon 0. ve 3. saat toplam motilite ve proAKAP4 değerleri korelasyon grafiği.	45
Şekil 3.6. Spermatozoon 0. ve 3. saat toplam motilite ve proAKAP4 değerleri korelasyon grafiği.	46

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Ölçeklerine göre Sığır İşletmelerinin sayısı ve oranları.	7
Çizelge 1.2. Başlıca spermatozoon minör proteinleri.	26
Çizelge 2.1. Hancock solüsyonunun hazırlanışı.	37
Çizelge 3.1. Dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermalarının proAKAP4 seviyeleri.	41
Çizelge 3.2. ProAKAP4 seviyelerine göre 0. ve 3. saat spermatozoon toplam motilite ve progresif motilite değerleri.	42
Çizelge 3.3. ProAKAP4 seviyelerine göre 0. ve 3. saat spermatozoon CASA doğrusal hareket değerleri.	43
Çizelge 3.4. ProAKAP4 seviyelerine göre 0. ve 3. saat spermatozoon CASA çizgisel ve hiperaktif hareket değerleri.	44
Çizelge 3.5. Spermatozoon proAKAP4 seviyesi ile spermatozoon motilite, yoğunluk ve morfolojik parametreleri arasındaki korelasyon tablosu.	47
Çizelge 3.6. Spermatozoon proAKAP4 seviyesi ile spermatozoon kinetik değerleri arasındaki korelasyon tablosu.	48
Çizelge 3.7. Spermatozoon morfolojik analiz bulgularının proAKAP4 grupları arasında karşılaştırılması.	49
Çizelge 3.8. Spermatozoon HOST bulgularının proAKAP4 grupları arasında karşılaştırılması.	50

1.GİRİŞ

1.1. Türkiye Hayvancılık Politikalarında Suni Tohumlamanın Yeri

Kontrollü yavru verimi elde etmek için kullanılan, suni tohumlama; uygun yöntem ve tekniklerle erkek damızlık hayvandan alınan spermanın, muayenesi yapılarak ve belli işlemlerden geçirildikten sonra yine uygun yöntem ve tekniklerle belli zamanda dişi genital kanala aktarılması işlemidir. Ancak gebelik elde edilmesi sadece kullanılan spermaya değil, gebelik beklenen dişi hayvanın genel sağlık durumu ve metabolizmasıyla da yakından ilişkilidir. Ayrıca reproduktif performansı etkileyen bakım, besleme, östrus takibi gibi sürü yönetimi unsurlarının da başarılı bir suni tohumlama için idaresi önem arz etmektedir (Daşkın, 2011).

Dünyadaki ilk suni tohumlama uygulamasının 14. yüzyılda bir Arap şeyhi tarafından atlarda gerçekleştirildiği bildirilmektedir. 1677 yılında Van Loenhoeck'in yeni keşfettiği mikroskopta sperma içerisindeki spermatozoonları görmesi, suni tohumlama çalışmaları açısından önemli bir gelişme olmuştur. İtalyan bilim insanı Spallanzani 1780 yılında suni tohumlama uygulamasıyla dişi bir köpeğin gebe kalabileceğini, yaptığı çalışmasıyla ispatlamıştır. Çiftlik hayvanlarında, suni tohumlama çalışmaları üzerine yoğunlaşan bilim insanı ise Rus Profesör İlia İvanoviç İvanov olmuştur (Büyükleblebici, 2012; Korkmaz Yavaş, 2009).

1925 yılında Tarım Bakanı Sabri Toprak, Sovyetler Birliğine yapmış olduğu ziyarette kendisine atlarda uygulanan suni tohumlama uygulaması gösterilmiştir. Bu tekniğin hayvan ıslahı çalışmalarında kullanılabileceğine inanan Bakan, girişimlerde bulunarak konunun uzmanı bir kişinin, ülkemize getirilerek bu metodun icra edilmesini sağlamıştır. Bu sayede, Sovyetler Birliğinde suni tohumlamanın kurucusu sayılan Profesör İlia İvanoviç İvanov'un asistanlarından Mihailov'un 1926 yılında Karacabey Harasında, Veteriner Hekimlere atlarda suni tohumlama kursu düzenlemiştir. Bu gelişmeler ışığında ülkemiz, çiftlik hayvanlarında suni tohumlamanın uygulandığı ikinci ülkedir. İlerleyen yıllarda koyun ve sığır ırklarında

sunı tohumlama alanında çalışmalara başlanılmış ve bu alanlarda uzman yetiştirmek amacıyla Türk Veteriner Hekimleri Fahri Araz, İsmail Hakkı nveren ve Tahsin Muslu Rusya'ya gönderilmiştir. Bu uzmanlar yurda döndüklerinde, sperma kriyoprezervasyonu ve sunı tohumlama çalışmalarının alt yapısını inşa etmişlerdir (Gökçen, 2015; zkoca, 1984; Temel, 2015).

İzmir İktisat Kongresinde yerli koyun ırklarımızdan elde edilen yapağının, kalın olması ve sadece halı üretiminde kullanılabilmesi nedeniyle, Atatürk'ün emri ile yapağısı yönlü dokumaya uygun Macaristan ve Almanya'dan merinos ırkı koçlar ithal edilmiştir. Bu merinos ırkı koçların, sulandırılan ve ısısı +5°C düşürülen sperması ile halk elinde bulunan kıvrıcık ırkı koyunlara sunı tohumlama yapılmıştır. Yürütülen, yerli kıvrıcık ırkı koyunların çevirme melezlemesi ıslah projesi ile sunı tohumlama metodu, ilk kez hayvancılık politikalarında yerini almıştır. Bu proje kapsamında Bursa ve çevresinde gezici ve sabit sunı tohumlama istasyonları ile 1925-1935 yılları arasında 20.000 koyuna sunı tohumlama yapıldığı belirtilmektedir. İlerleyen yıllarda benzer bir proje yerli sığır ırklarımız için hayata geçirilmiştir. Bu amaçla Simental ve İsviçre Esmeri ırkı boğalar ithal edilmiştir. 1930'lu yıllarda, Simental ırkı hayvanların ülkemiz koşullarına uyum sağlayamadığı ve tüberküloz hastalığına duyarlılığı nedeniyle, sunı tohumlama amacıyla İsviçre Esmeri ırkı boğalardan alınan spermalar kullanılmıştır. Bu uygulamada, Karacabey Harası Sunı Tohumlama İstasyonunda hazırlanan sulandırılmış boğa spermaları soğuk zincir içeren çeşitli vasıtalarla hayvancılık bölgelerine götürülmüş ve günlük tur sistemi ile sunı tohumlama uygulamaları yapılmıştır (olak ve Javorka 2017; Genç ve zgr 2017; Gökçen, 2015; Koç, 2016; zkoca, 1984; Sevinç, 1979).

Cumhuriyetin ilk yıllarında hayvan ıslahı çalışmaları bu şekilde devam ederken İkinci Dünya savaşının patlak vermesi, ıslah çalışmalarını olumsuz etkilemiştir. Ülkedeki seferberlik durumu nedeniyle ilgili teknik personellerin askere alınmaları ve finansal kaynakların daha çok savaş bütçesine ayrılması nedeniyle hayvan ıslahı ve dolayısıyla da sunı tohumlama çalışmaları aksamış hatta durma noktasına gelmiştir. Bu nedenle uzun bir duraklama dönemi geçiren hayvan ıslahı

alışmalarına, savaşın sona ermesi ve ekonomik iyileşme sonrasında başlanabilmiştir (Gökçen, 2015; Gül, 2004).

İkinci Dünya savaşı sonrası 1950’li yıllarda, hayvan ıslahı ve suni tohumlama alanında önemli reformlar uygulamaya geçirilmiştir; ücretsiz suni tohumlama hizmeti veren merkezlerin sayısı arttırılmıştır. Suni tohumlama uygulaması yaparak gebelik sağlayan teknik personellere maddi haklar ve teşvikler sağlanmıştır. Bu alanda çalışan personellere motorlu araçlar tanzim edilerek, suni tohumlama hizmetinin geniş çaplı yaygınlaştırılması amaçlanmıştır (Genç ve Özgür, 2017; Temel, 2015).

Bu dönemin ilk yıllarında, 7 merkezde %71,2 başarı ile 2.892 ineğe ve 4 merkezde %90 başarı ile 5.523 koyuna suni tohumlama yapılırken, 1959 yılında 58 merkez, 67 istasyonda 34.500 ineğe (10 yılda 233.895), 161 istasyonda da 134.000 koyuna (10 yılda 548.936) sulandırılan ve ısısı +5°C düşürülen boğa ve koç spermaları ile suni tohumlama yapılmıştır. Bu alanda hizmet vermek amacıyla, enstitü kurulması, uzmanlık kursu düzenlenmesi, suni tohumlama laboratuvarları açılması gibi gelişmeler kamu nezdinde yapılırken benzer haklar gerçek ve tüzel kişilere de tanınmıştır. Bu gelişmeler ışığında suni tohumlama hizmeti Marmara ve Ege bölgesinden tüm ülke coğrafyasına uzanmıştır (Genç, 2011; Gökçen, 2015; Osmanağaoğlu, 2006; Özkoca, 1984).

1930 yılında Macar Profesör Oszkar Wellamann’ın incelemeleri sonucu sunduğu, ideal bölgelerde yerli ırk ineklerin, İsviçre Esmeri boğalarla tabii veya suni tohumlama amacıyla kullanılarak melezlenmesi, iklim şartlarının zor olduğu bölgelerde ise yerli ırk sığırkların ıslahının geliştirilmesine yönelik olan havza modeli 1970’li yılların başına kadar devam etmiştir. 1972 yılında bu havza modeli yayınlanan Islahı Hayvanat Komisyonu kararıyla genişletilmiştir (Anonim, 1972; olak ve Javorka, 2017). Bu karara göre sıcak iklim ve mikroklima iklim görülen bölgelerde Holstein, Karadeniz bölgesinde Jersey, İç Anadolu ve soğuk iklim görülen bölgelerde ise İsviçre Esmeri boğaların tabii veya suni tohumlama ile kullanılarak yerli ırk hayvanların ıslah stratejisi benimsenmiştir. Ayrıca bu amaçla

damızlık materyal ithalatına izin verilmiştir. Bu dönemde (1960-1975) yaklaşık 200 suni tohumlama merkezinde %66 başarı ile 2 milyona yakın ineğe ve %77 başarı ile 3 milyona yakın koyuna suni tohumlama uygulaması yapılmıştır (Gökçen, 2015; Osmanağaoğlu, 2006; Özkoca, 1984).

Yakın geçmişe dair hayvancılık politikalarını da incelediğimizde, benzer suni tohumlama ile hayvan ıslahını amaçlayan projeler ve suni tohumlamanın yaygınlaşmasını hedefleyen teşvikler görülmektedir. Bu uygulamalara; Tarım ve Orman Bakanlığının ilgili birimleri tarafından sürdürülen, suni tohumlamadan doğan buzağılara maddi desteğin arttırılması, Kaliteli Besi Materyali Üretimi ve Jersey Irkı Geliştirilmesi Projesi, Buzağı Kayıplarının Önlenmesi Projesi ile örnek verebiliriz. Ayrıca kamu ve özel sektör ile yürütülen, suni tohumlama biyoteknolojisinin odak alındığı birçok Ar-Ge çalışmaları da devam etmektedir. Sonuç olarak Cumhuriyet tarihi boyunca suni tohumlama, hayvan ıslahının geliştirilmesi için önemli bir stratejik plan olarak görülmüştür. Bu amaçla uzman personel yetiştirilmesi, kamu veya özel sektörün bu alandaki Ar-Ge çalışmalarının desteklenmesi ile suni tohumlamadan doğan buzağuların desteklenmesi gibi faaliyetleri, Tarım ve Orman bakanlığının bu yöndeki değişmez politikası olmuştur (Anonim, 2016; Anonim, 2019).

1.2. Dondurulmuş Boğa Sperması Endüstrisi

Suni tohumlamanın ilk uygulandığı yıllarda, damızlık hayvanlarda toplanan spermalar taze olarak kullanılmaktaydı. Farklı kimyasallar ile sulandırılan (fosfat, sodyum sitrat, vb.) ve ısısı +5°C ye düşürülen taze sperma numunelerinin 48 saat içerisinde kullanılması gerekmekteydi. Bu kısa kullanım süresi, tohumlama doz hacminin yüksek olması, çiftlik hayvanlarında kısa sürede artan suni tohumlama talebinin karşılanmasını, oldukça zor kılmıştır. Bu nedenle bilim insanları, spermatozoonların fertilite yeteneğini kaybetmeden uzun süre saklama olanakları üzerine, araştırmalara yoğunlaşmıştır. Bu amaçla spermanın kriyoprezervasyonu,

bilim insanları tarafından kabul gören ve suni tohumlama biyoteknolojisi ile özdeş bir yöntem olmuştur (Sönmez, 2010).

1949 yılında Polge ve arkadaşlarının, gliserolün kriyoprotektan özelliğini keşfederek sperma sulandırıcısında kullanmaları, spermatozoon kriyoprezervasyon sürecinde milat olarak kabul edilmektedir. İlerleyen yıllarda spermanın dondurulma sürecine gliserilizasyon işlemi dâhil olarak, ampul veya pellet yöntemiyle spermanın kuru buz (-79°C) tekniği ile veya azot buharında (-120°C) uzun süreli kriyoprezervasyonu mümkün kılınmıştır (Özkoca, 1984).

Ampul veya pellet şeklinde, kuru buzda dondurulan sperma numuneleri taze spermaya kıyasla daha uzun süre saklama imkânı sağlamaktaydı. Ancak kuru buzda dondurulan spermaların, nakil ve kullanıma hazırlama sürecinde yaşanan komplikasyonlar, suni tohumlama biyoteknolojisinin yaygınlaşması açısından, kabul edilebilir değildi. Bu durumu ortadan kaldıracak gelişme, 1960 yılların başında Fransız İMV firmasından geldi. Geliştirilen 0.5 ml hacimli 13 cm boyunda polivinil klorid den üretilen “payet” adı verilen tüp sayesinde, suni tohumlama biyoteknolojisi yeni bir döneme girmişti. Böylece spekulum-serviks pensi yöntemi yerine hala günümüzde kullanılan rekto-vaginal yöntemle uygulama yapılması mümkün kılınmıştır. Ayrıca bu gelişme, spermanın -196°C de pratik saklama imkânı sağladığı gibi dondurulmuş spermanın kıtalar arası ticaretini mümkün kılarak, ülkeler arasında soluksuz rekabetle devam edecek olan dondurulmuş sperma endüstrisinin temelini oluşturmuştur (Gökçen, 2015; Özkoca, 1984; Sönmez, 2010).

Türkiye dondurulmuş sperma üretimindeki bu gelişmeleri hep yakından takip etmiştir. Bu tekniğin öğrenilmesi ve ülkemize uyarlanması amacıyla Avrupa'nın farklı ülkelerine Veteriner Hekimler gönderilmiştir. Gerekli altyapının oluşturulması ve çalışmaların tamamlanması neticesinde 1972 yılının sonlarında dondurulmuş boğa sperması üretimi bugün ki adıyla Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğünde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra benzer boğa istasyonları İstanbul, Samsun ve İzmir'de kurularak dönemin dondurulmuş boğa sperması talebi karşılanmıştır. Günümüzde dondurulmuş boğa sperması, Ankara

Lalahan (UHAEM), Malatya Tigem Sultansuyu işletmeleri, özel sektörde İzmir Egevet, Konya Selfarma işletmeleri ve İzmir Menemen Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği tarafından üretilmekte ve satışa sunulmaktadır (Gökçen, 2015).

Nitekim dondurulmuş boğa sperması endüstrisi güncel teknolojik gelişmelerin paralelinde hızla ilerlemekte ve pazar payı giderek artmaktadır. Progeny testingin yanı sıra genomik seleksiyon verileri ile sperması üretilen boğaların, tahmini genetik aktarımı ve kızlarının geniş kapsamlı verim kompozisyonu, boğa kataloglarında belirtilmektedir (İnanç ve Daşkın, 2015; Nur ve ark., 2017; Tırpan ve Tekin, 2014). Bunun yanı sıra satışa sunulan, cinsiyeti belirlenmiş, mikroakışkan spermatozoon ayırıştırma çipi ile seçilen veya yavaş salınımla çözünen gibi farklı dondurma standartlarındaki dondurulmuş spermalar işletmelerin talepleri doğrultusunda pazar bulunmaktadır. Bu global pazarda, yıllık ortalama 25 milyon doz sperma ihracatı ile yaklaşık 200 milyon dolar gelir elde eden Amerika Birleşik Devletleri bu sektörün önde gelenlerindendir (Enginler ve Özdaş, 2016; Knowlton ve ark., 2015; NAAB, 2019; Perteghella ve ark., 2017; Schuster ve ark., 2003).

Son beş yılda, ülkemizde, toplam 130 boğadan 10 milyon dozun üzerinde yerli dondurulmuş sperma üretimi ve paralel rakamlarla satışı gerçekleştirilmiştir (HAYGEM, 2019). Buzağı desteği gibi, sperma üretiminde kullanılan boğaların yetiştiricilerine destek sağlanmasının, sperma üretimi için aday boğa arayışında bulunan, yerli dondurulmuş boğa sperması üreten firmalara, geniş bir boğa popülasyonundan suni tohumlama boğası seçilmesine fırsat vereceği muhtemeldir. Benzer gelişmelerin doğrultusunda, yakın gelecekte yerli sperma üretim miktarının artarak, ithal sperma miktarının azalması ve böylece bölge ülkelere sperma ihracatının gelecekte olağan olduğu düşünülmektedir.

1.3. Türkiye’de Ölçeklerine Göre Sığır İşletmelerinin Reprodüktif Stratejileri

Sığır işletmeleri, hayvan mevcudunu arttırmak ve sürdürülebilir bir kazanç elde etmek için reprodüktif stratejilerini doğru planlamadır. Ülkemizdeki sığır işletmelerinin reprodüktif prognozunu tespit etmek için işletme kapasitelerini değerlendirmek önemli bir belirteçtir. Çünkü işletmeler mevcut hayvan sayılarına göre, sürü yönetim sistemlerinden yararlanmakta ve veteriner hekim hizmeti talep etmektedir. Yaklaşık 14 milyon büyükbaş bulunan ülkemizde, hayvan varlığına göre işletmelerin dağılımı; Çizelge 1.1’de belirtildiği gibi 200 baş ve üzeri %6,08, 50-199 baş arası %16,45, 1-50 baş arası %77,47 oranındadır (Aytekin, 2011; TAGEM, 2019).

Çizelge 1.1. Ölçeklerine göre Sığır İşletmelerinin sayısı ve oranları (TAGEM, 2019).

İşletme Hayvan Kapasitesi (Baş)	İşletme Sayısı (Adet)	(%)	Hayvan Sayısı (Baş)	Hayvan Varlığına Göre Dağılımı (%)
01-09	1.155.958	75,77	4.251.049	31,35
10-49	339.306	22,24	6.252.878	46,12
50-199	28.580	1,87	2.231.149	16,45
200 baş ve üzeri	1.757	0,11	823.466	6,08
TOPLAM	1.525.601		13.558.542	

Hayvan sayılarına göre orta ve büyük ölçekli işletmeler, 50 baş ve üzeri sağmal hayvan bulunduran işletmelerdir. Bu işletmeler, genel olarak bünyesinde veteriner hekim istihdam eden veya veteriner hekim danışmanlık hizmeti alan entansif süt sığırcı işletmelerdir. Bu işletmelerin, belirli bir östrus takip yöntemi ve sürü takip programı vardır. Nitekim veteriner hekim desteği aldığı için genellikle düzenli bir reprodüktif stratejileri vardır ve genetik ilerleme için suni tohumlama biyoteknolojisini tercih ederler. Yüksek süt veriminin yanı sıra, işletmelerindeki zayıf fenotip özelliklerini elimine edecek karakterde boğa sperması seçiminde

bulunurlar. Ayrıca bazıları cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanarak damızlık dişi hayvan sayılarını artırma eğilimindedirler. Böylece sürü ıslahını pozitif yönde geliştirmeye çalışan bu işletmeler, ekonomik olarak daha uygun bulunduğu ancak tereddütlü yaklaştıkları yerli üretim spermaları ise laktasyon sayısı yüksek veya döl tutma problemi görülen ineklerde kullanılmaktadırlar. Nitekim ülkemizde sperma üretiminde kullanılan holstein boğaların çoğu, top 100 deki boğaların ithal embriyolarından elde edilen boğalardır. Ülkemiz süt gereksiniminin karşılanmasında büyük paya sahip ve genelde ithal sperma kullanım eğiliminde olan bu işletmelerin, yerli spermadan doğan buzağuların verim özellikleri daha güvenilir ve yüksek sayıda sunularak, yerli sperma kullanımına yönelik eğilim artırılmalıdır (Ata ve Ata, 2004; Evirgen, 2009; Gökçen, 2020; Özyurt, 2009; Pothmann ve ark., 2014; Tüzemen, 2015; Yırtıcı ve ark., 2018).

Aile tipi işletmeler olarak da sınıflandırılan, küçük ölçekli işletmeler, 1-50 baş arası büyükbaş bulunduran işletmelerdir. Genel olarak, yarı entansif olarak bakım ve besleme yapan, yaygın olarak kombine ırk ve yerli ırk sığır melezlerinin bulunduğu işletmelerdir. Yüksek süt verimi elde etmekten ziyade besi materyali almayı amaçlayan bu işletmelerin geneli özel veteriner hekimlerden hizmet alımı yaparak sürü sağlığı ve suni tohumlama gereksinimlerini karşılamaktadırlar. Belli bir östrus takip sistemine sahip olmayan daha çok gözlem yolu ile östrus takibi yapmaya çalışan, işletmelerdir. Ülkemiz büyükbaş hayvan varlığının %77,47'sini bu işletmeler oluşturmaktadır. Östrus takip sistemi olmayan, kızgınlık gözlemini sabah ve akşam yem veya sağım saatlerinde yapılan bu işletmelerde suni tohumlama uygulamaları ciddi bir komplikasyondur (Aksoy ve Yavuz, 2011; Aytekin, 2011; Önal ve Özder, 2008; Pothmann ve ark., 2014; Roelofs ve ark., 2010; Tüzemen, 2015; Yener, 2017). Ne yazık ki bu işletmeler ST uygulamasını, genetik ilerlemeden ziyade gebelik elde etme aracı olarak görmektedirler. Bu yüzden düşük bir ST başarı oranında, damızlık boğa kullanma eğilimindedirler. Planlama ve sağlık kontrolü yapılmadan boğaların damızlık amacıyla kullanımı, kalıtsal ve zoonoz hastalıkların yaygınlaşmasına yol açarak önemli ekonomik kayıplara neden olabilir (Cirit ve ark., 2017). Nitekim sosyal medya aracılığı ile paylaşılan patolojik olgular bu durumu doğrular niteliktedir (VHTP, 2018). Ayrıca özel veteriner hekimin iş yoğunluğu ve işletmeye

uzaklığı, aile tipi işletmeler için zamanında reproduktif muayeneyi aksatan diğer unsurlardır (Demir ve ark., 2014; Şeker ve ark., 2012).

1.4. Reprodüktif Başarıda Sperma Analizlerinin Önemi

Sığır yetiştiriciliğinde reproduktif başarı; bakım, besleme, uygun sürü yönetimi, östrus takibi, ST zamanı, dondurulmuş - çözdürülmüş spermanın kalitesi, uygulayıcı teknik personel tecrübesi gibi birçok etki altında çok parametrik bir başarı olgusudur (Gökçen, 2020). Bu faktörler içerisindeki kaliteli dondurulmuş boğa sperması üretimi, boğa istasyonlarının sorumluluğunda ve ilgili ülkenin yasal otoritesinin denetimindedir. Üretilen dondurulmuş boğa spermaları satışa sunulmadan önce yasal olarak yetkilendirilmiş androloji laboratuvarlarında analiz edilmektedir (HAYGEM, 2019).

Fazla sayıda dışı materyal kullanım gereksinimi ve saha şartlarının optimize edilmesindeki zorluklar, araştırmacıları sperma kalitesinin tespitinde in vivo analizler yerine in vitro analizlere yönlendirmiştir. Her geçen zaman içerisinde in vitro analizlere yeni parametreler eklenerek, spermatozoonların fertilite ile ilişkin fonksiyonları, morfolojisi ve moleküler yapısının, ileri teknoloji analiz sistemleri ile objektif incelenmesi hedeflenmektedir. Spermaya bağlı başarısız bir ST uygulaması, günümüzde bir süt sığırları için işletmesine en az 1.000 TL 'lik ekonomik kayba neden olmaktadır. Sığır mevcudumuzun en az %1 'nin bu durumla karşılaştığını düşünürsek yıllık 14 milyon TL gibi ulusal bazda bir ekonomik kayıp söz konusudur. Dolayısıyla sperma analiz sürecinde, ileri teknoloji analiz sistemleri ile objektif değerlendirme yapılması, sığır yetiştiriciliğinde olası ekonomik kayıpları önlemek adına elzemdir (Daşkın, 2011).

1.5. Başlıca İleri Teknoloji Spermatozoon Analiz Teknikleri

1.5.1. Bilgisayar Destekli Spermatozoon Analiz Sistemleri (CASA)

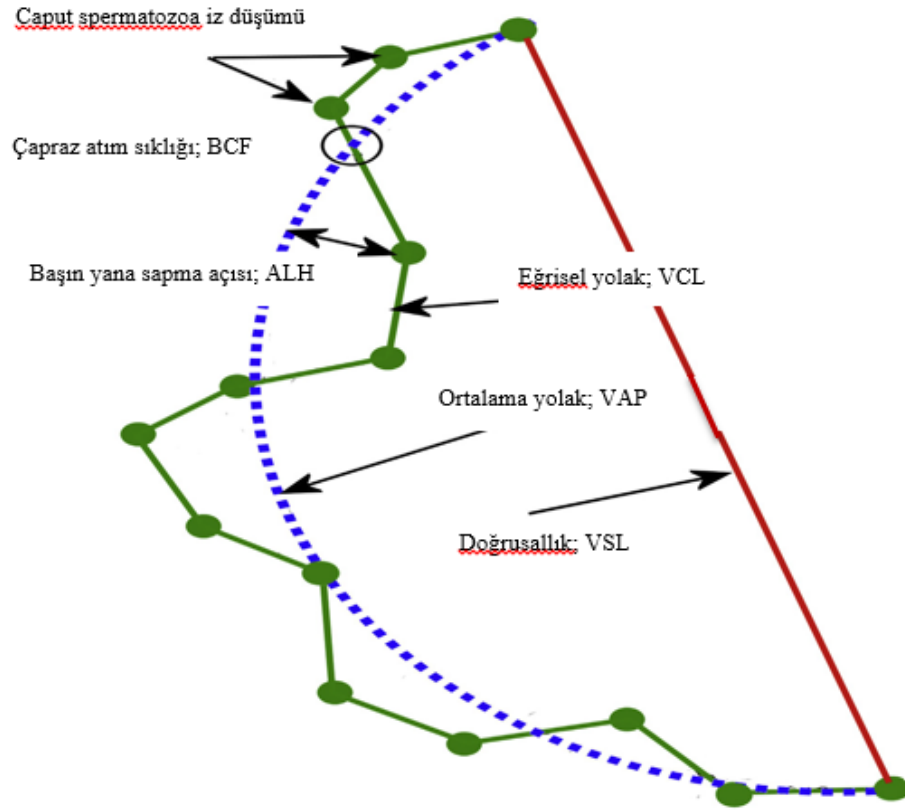
İn vitro ortamda, spermatozoon morfolojisi ve kinetik parametrelerini, ayrıntılı ve sistematik şekilde ortaya koyan bilgisayar destekli spermatozoon analiz sistemleri (CASA) günümüzde objektif spermatozoon kalitesinin değerlendirilmesinde yaygın kullanılan teknolojilerden biridir (Şerefoğlu, 2011). Bu teknolojinin temel bileşenleri: mikroskop, mikroskop görüntülerini video olarak kaydeden dijital bir kamera ve video kaydında görülen spermatozoon morfolojik ve kinetik değerlerini nicel verilere dönüştüren, bir yazılım algoritmasına sahip bilgisayardan oluşur (Vincent ve ark., 2018).

Bilgisayar sistemine bağlı mikroskop tablasına, cihaza özgü lam veya konvansiyonel lam, lamel arasına konulan sperma numunesi yerleştirilir. Lam üzerinde, belirli mesafe arasındaki spermatozoon hareketlerinin kamera ile videosu kaydedilir. Lam içerisindeki 100 ila 1000 spermatozoon daha önce bilgisayar yazılımına işlenen referans değerlere göre, spermatozoonun motil, progresif, stabil gibi kinetik değerlerinin yanı sıra yoğunluk ve uygun boyama prosedürlerinin kullanılmasıyla da spermatozoon yaşam yeteneği hakkında eş zamanlı, objektif bir tahmin değeri elde edilir. Bu analiz süreci ortalama 10 dakika sürmektedir (İnanç ve ark., 2017; Sergeant ve ark., 2019).

Spermatozoon kinematik parametreleri içerisinde toplam motil ve progresif motil spermatozoon yüzdeleri, spermatozoon kalitesinin değerlendirilmesinde önemli parametrelerdir. Spermatozoonun oositin katmanlarını ve zona pellucidayı geçmesi için motil olması ve gerekli enzimleri bu bölgeye ulaştırması gerektiği için spermatozoon motilitesi fertilizasyon esnasında kritik öneme sahiptir. Toplam motil spermatozoon; herhangi bir şekilde hareket kabiliyetine sahip spermatozoon toplamı olarak tanımlanır. Progresif motil olarak kabul edilen spermatozoonlar ise toplam motil spermatozoon içerisindeki ileri doğru düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonu tanımlar. Progresif olmayan motil spermatozoon ise hareket

yeteneğine sahip ancak güçsüz, dairesel ya da anormal bir yörüngede hareket eden motil spermatozondur. Ülkemizde ithal edilen ve üretilen dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermalarının analizinde, 2019 yılı Tarım ve Orman Bakanlığı talimatlarına göre, CASA toplam motilite değeri en az %40 ve bir payetteki motil spermatozoon sayısı en az 5 milyon olmalıdır (İnanç ve ark., 2017; Tekin, 2011; Vincent ve ark., 2018).

Motil spermatozoon hareketlerinin doğru tanımlanması, spermatozoon yaşam yeteneğinin tahmini açısından önem arz etmektedir. Nitekim spermatozoon baş ve kuyruk salınımları ile oluşturduğu hareket izdüşümü, lateral (x ve y ekseninde) ve longitudinal (z ekseninde) düzlemde, iki boyutlu olarak detaylı bir şekilde analiz edilir, zaman, hız ve aldığı yol cinsinden nicel verilere çevrilir (İnanç ve ark., 2017).



Şekil 1.1. Spermatozoon hareket iz düşümünün hız ve yol tanımları (Amann ve Waberski 2014).

Belirli bir yörüngede spermatozoon salınımının, nicel veri olarak tanımları şunlardır;

VCL (Curvilinear Velocity): Eğrisel Hız ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoon başının ilerlerken katettiği 2-boyutlu gerçek eğrisel yoldaki hızıdır. Spermatozoon canlılığının bir göstergesidir (Mortimer, 2000).

VSL (Velocity Straight Line): Doğrusal Hız ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoon başının tespit edilen ilk noktadan son noktaya gidene kadar olan hızıdır. VSL yörüngenin ilk ve son noktası arasındaki mesafeden belirlenir ve gözlem periyodunda kazanılan net alanı verir (Mortimer, 2000).

VAP (Velocity Avarage Path): Ortalama yol hızı ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoon başının ortalama yolaktaki hızıdır. Bu yolak eğrisel yolun CASA cihazlarındaki algoritmalarla göre düzleştirilmesi ile hesaplanır. VAP spermatozoonun gözlem periyodu içinde hareket yönünde kat ettiği ortalama mesafedir. VAP anlaşılması en zor hız değeridir çünkü VSL ile benzerlik gösterir (Mortimer, 2000).

Spermatozoon başının çok düzenli doğrusal ve çok hafif yanal hareket ettiği durumlarda VAP neredeyse VSL ile aynı olmaktadır. Ancak doğrusal olmayan yörüngeler gibi düzensiz yollar olduğunda ya da spermatozoon başının aşırı derecede yana sapmasında VAP, VSL den çok daha yüksek çıkmaktadır. Ortalama yol rota düzleştirme kullanılarak CASA tarafından belirlenmektedir. Basitçe bu, (x,y) koordinatlarının her iki tarafındaki nokta izlerinin ortalamasının alınması anlamına gelmektedir. Bu düzeltme o iz noktası için (x,y) koordinatı vermektedir. Prosedür düz bir yol elde edilene kadar rota boyunca her nokta için tekrarlanmaktadır. Gözlem süresi zarfında bu yolun uzunluğuna VAP denilmektedir. Bu algoritmalar cihazlar arasında farklılık gösterebileceği için VAP farklı CASA sistemleri arasında mukayese edilebilir bir ölçüt olarak kabul edilmemektedir (Mortimer, 2000).

ALH (Lateral Head Displacement): Spermatozoon başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklıktır (μm). ALH genliği, spermatozoon başının yanal hareket genişliği olarak tanımlanır. Spermatozoon başının toplam yol genişliği olarak hesaplanır ve mikrometre olarak ifade edilmektedir (David ve ark., 1981).

LIN (Linearity %): Lineerlik/Çizgisellik (%). Spermatozoonun doğrusal yer değiştirmesini ($\text{VSL/VCL} \times 100$) belirtir. Spermatozoonun 2-boyutlu alanda gösterdiği lineer çizgi, 3-boyutlu ortam algoritması ile hesaplanmaktadır. Dairesel hareketi yüksek olan spermatozoonun linearitesi düşük değerde çıkmaktadır. Yüksek lineariteye sahip spermatozoon ise düşük ALH' ye sahip olmaktadır (Mortimer, 1999).

WOB (Wobble %): Spermatozoonun aldığı toplam yol zamanı boyunca sola, sağa sendeleme derecesini ($\text{VAP/VCL} \times 100$) belirtir (Mortimer, 2000).

STR (Straightness %): Doğrusallık. Spermatozoonun doğrusal bir yörünge boyunca aldığı mesafeyi ($\text{VSL/VAP} \times 100$) ifade etmektedir. (Mortimer, 2000).

BCF (Beat Cross Frequency): Çapraz atım sıklığı. Spermatozoon kuyruğunun ritim frekansını tanımlamak için kullanılmaktadır (Mortimer, 2000).

1.5.1.2. CASA Sistemlerinin Dezavantajları

CASA analiz teknolojileri objektif bir analiz potansiyeline sahip olmasına rağmen, her bir CASA sisteminin farklı yazılıma sahip olması ve CASA sistemlerinin belirli bir standardizasyonunun olmaması, analizden önce sperma optimizasyonu gibi temel işlemlerde kullanıcıların uzmanlığı ve tecrübesine bağlı olarak analiz sonuçlarının değişebilmesi bu teknolojinin dezavantajlarıdır (Amann ve Waberski, 2014; Comhaire ve ark., 1992; Holt ve ark., 1994; Vincent ve ark., 2018).

Türlere göre farklılık gösteren spermatozoon analiz ayarları, kullanılan derinlikli lam, derinlikli lam odacık sayısı, incelenen alan, görüntü alma hızı, analiz sırasındaki sıcaklık, örnek alma ile analiz arasında geçen süre gibi birçok öge analiz sonucunu etkilemektedir (Davis ve Gravance, 1993; Ginsburg ve Armant, 1990; Holt ve ark., 1994; Le Lannou ve ark., 1992; Morris ve ark., 1996; Mortimer ve ark., 1986).

CASA ile spermatozoon analizinde ideal mikroskop tablası sıcaklığı 37°C dir. Oda sıcaklığında veya 30°C yapılan analizlerin spermatozoon kinetik değerlerini önemli derecede etkilediği belirtilmiştir. Spermatozoon hız ve yol değerlerini analiz etmek için 30 veya 60 Hz kare hızı tercih edilir. Doğrusal hareketi düşük, hızlı bir sperma numunesinin değerlendirilmesinde yüksek kare hızının alınması objektif bir analiz için önemlidir (Castellini ve ark., 2011; Mortimer ve Swan, 1999).

Sperma dondurma sürecinde kullanılan sulandırıcılar, analiz öncesinde dikkate alınmalıdır. Yumurta sarısı ve süt tozu bazlı sperma sulandırıcıları, spermatozoon başına benzer partikül kalıntıları olduğu için CASA sistemlerinin doğru bir analiz yapmasına engel olur. Bu durumu elimine etmek için, sperma numunesi analiz öncesi DNA bağlayıcı florokrom boyalar (Hoechst 3342 vb.) ile boyanarak, floresan mikroskop özelliği olan CASA cihazlarında güvenilir bir şekilde analiz edilebilir (Zinaman ve ark., 1996).

1.5.1.3. CASA Analizlerinin Fertilite ile İlişkisi

CASA tarafından ortaya konulan spermatozoon kinetik parametreleri ile in vitro veya in vivo fertilizasyon arasındaki ilişkiyi araştıran birçok araştırma bulunmaktadır. Amann (1989), dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermalarında motilite kinetik parametrelerini incelemiş ve VCL, VSL, LIN, ALH ve BCF'nin fertilite indeksi ile ilişkili olduğunu tespit etmiştir. Benzer sonuçlar Farrell ve ark. (1998) tarafından da elde edilmiştir. Januskauskas ve ark. (2000), progresif boğa spermatozoonları ile fertilite arasında bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Benzer ilişki in

vitro ortamda yapılan çalışmalarda da belirtilmiştir. Kathiravan ve ark. (2011), progresif boğa spermatozoonları ile in vitro ortamda oosite bağlanma yeteneği arasında pozitif bir korelasyon olduğunu belirtmiştir. Jeulin ve ark. (1996), swim up tekniği ile seçilen motil spermatozoondaki ALH değerleri ile fertilizasyon arasında önemli bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Nagy ve ark. (2015), CASA sistemi yardımı ile spermatozoon kinetik parametrelerini değerlendirmiş ve yaklaşık 9.000 adet hayvanı bu spermalar ile suni tohumlama uygulamıştır. Suni tohumlama uygulamaları sonrasında, hız parametrelerinden VCL, VSL, VAP değerlerinin diğer parametrelere göre daha kullanışlı olduğu tespit edilmiştir. Bu parametreler içerisinde de (VCL, VSL, VAP) VAP'nin fertilitenin tahmin edilmesinde en kullanışlı parametre olduğu belirtilmiştir. Robaya ve ark. (2008), koç spermasının, çeşitli hayvan türlerinin servikal mukusları (koyun, keçi, inek) ile yaptıkları çalışmada, koç spermasının motilite ve kinetik parametrelerinin koyun servikal mukusunda ilerleyişi ile VCL, VAP değerlerinin ($p<0,05$), keçi servikal mukusundaki ilerleyişinde VCL, VAP, STR ve LIN değerleri ile pozitif yönde ($p<0,01$), inek servikal mukusundaki ilerleyişinde ise sadece ALH ile negatif bir korelasyon ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir (İnanç ve ark., 2017; Vincent ve ark., 2018).

Sonuç olarak CASA sistemleri, uygun sarf maliyetleri ile kısa sürede spermatozoon yoğunluk ve kinetik değerlerini analiz etmektedir. Ancak bu değerlendirmeler spermanın fertil yeteneğini ortaya koymak için yeterli değildir. Kapsamlı bir spermatozoon kalite analizi için spermatozoon DNA bütünlüğü, plazma membran bütünlüğü, morfolojik yapı ve viyabilite gibi analizlerin, sarf malzeme temini ve CASA cihazının uygun yazılım özelliğinin aktifleştirilmesi ile birlikte spermatozoon kalite değerlendirilmesinde kullanılması önerilmektedir. Mevcut CASA sisteminin bu tür analiz özellikleri bulunmuyorsa, ek analiz protokolleri ile belirtilen spermatolojik parametre analizlerinin, spermatozoon kalite standardizasyonu için eklenmesi gerekmektedir (Amann ve Waberski 2014; İnanç ve ark., 2018; Verstegen 2002; Vincent ve ark., 2018).

1.5.2. Spermatozoon Kalitesinin Akış Sitometri (Flow Cytometry) Cihazı ile Değerlendirilmesi

Akış halindeki uygun süspansiyonla işaretlenen spermatozoonun, lazer ve dedektör bileşenler ile spermatozoon fonksiyonlarının değerlendirilmesini sağlayan bir sistemdir. Üç bileşenden oluşan akış sitometrisinde; ölçülecek partikülleri lazer önüne taşıyan akışkanlar sistemi, ölçüm yapan lazerleri içeren ve partiküllerden dönen sinyalleri toplayan dedektörleri barındıran optik sistem, bu optik sinyalleri elektronik sinyallere çeviren ve değerlendirilebilir hale getiren elektronik sistemler bulunur (Korkmaz ve Çil, 2020).

Çalışma prensibi; uygun florokrom moleküller ile boyanan spermatozoon numunelerine, cihaz tarafından belirli bir ışık dalgasında uyarım yapılır, bu uyarım sonrası spermatozoonla bağlı florokrom moleküller uyarım ışığını absorbe ederek, daha büyük bir dalga boyunda ışığın yansımaya neden olan bir reaksiyon verir. Yansıyan yüksek dalgalı floresans ışığı, dedektörler tarafından ölçülür ve bir yazılım programı ile kantitatif verilere dönüştürülür. Bu sistem 10.000 ila 20.000 spermatozoonun, farklı fonksiyonlarını, kısa bir sürede analiz edilmesini mümkün kılmaktadır (Sergeant ve ark., 2019; Uğur ve ark., 2019).

1.5.2.1. Spermatozoon Plazma Membran Bütünlüğü

Spermatozoonun yaşam yeteneğinin (viyabilite) belirlenmesinde önemli bir belirteç olan parametredir. Kriyoprezervasyon süreci, spermatozoon plazma membranına önemli ölçüde zarar verebilen bir süreçtir. Bu amaçla etidyum homodimer (EH), SYBR-14, Propidyum iyodür (PI), Yo-Pro-1, yaygın kullanılan florokrom boyalardır. Propidyum iyodür (PI), hasarlı plazma membrandan nüfuz ederek, spermatozoon DNA'sına bağlanır, SYBR-14 hasarlı spermatozoon membranından geçemeyen ancak membran bütünlüğü olan spermatozoonun DNA'sına bağlanabilen özelliktedir. Genellikle iki florokrom boya kombinasyon halinde kullanılır ve 488-nm lazer ışık dalgasıyla uyarıldığında, 515 nm-545 nm (SYBR-14)

ve 561nm-583nm (PI) dalga boylarındaki ışık yansımaları gerçekleşir ve emisyon filtreleri tarafından ölçülür. Benzer prensiple Yo-Pro-1 ve etidyum homodimer kombinasyonu, spermatozoon membran stabilitesinin tespitinde kullanılmaktadır. Ayrıca Gallardo Balonas ve ark. (2012), spermatozoon membran bütünlüğünün tespitinde Yo-Pro-1/PI kombinasyonunun SYBR-14/PI boya kombinasyonundan daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir (Uğur ve ark., 2019; Vincent ve ark., 2018).

1.5.2.2. Spermatozoon Akrozom Bütünlüğü

Akrozom yapısı, spermatozoon caput kısmının ön 2/3 kısmında yer alır. Yapısında bulundurduğu, hyalüronidaz, akrozin, nörominidaz, asit fosfotaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler sayesinde spermatozoon, oosit dış duvarındaki zona pellusidadan penetrasyonunu sağlamaktadır. Bu nedenle spermatozoon fertil yeteneğinin tespitinde öncü parametrelerden biridir. Bu amaçla lektin bazlı hücre membranına bağlanabilen florokrom moleküller kullanılmaktadır. Floresan izotiyosiyanat (FITC), *Arachis hypogaea* (yer fıstığı) aglütinin (PNA), *Pisum sativum* (bezelye) aglütinin (PSA), yaygın olarak tercih edilen florokrom moleküllerdir. FITC-PNA, FITC-PSA kombinasyonları, sadece akrozom bütünlüğü amacıyla kullanılabileceği gibi bu kombinasyonlara Propidyum iyodür (PI) eklenerek spermatozoon plazma membran ve akrozom bütünlüğü aynı anda analiz edilebilir. Nitekim bu amaçla androloji laboratuvarları tarafından FITC-PNA/PI kombinasyonu yaygın olarak tercih edilmektedir (Lybaert ve ark., 2009; Nagy ve ark., 2003).

1.5.2.3. Spermatozoon Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Mitokondriyal membran potansiyeli, spermatozoon hareket fonksiyonlarını devam ettirmek için ihtiyaç duyduğu ATP nin sağlanmasında, önemli bir parametre olarak görülmektedir. Düşük mitokondriyal membran potansiyeli spermatozoon anomalisine ya da dondurma çözündürme sırasındaki kriyojenik hasara bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeple mitokondriyal membran potansiyelinin

belirlenmesi canlılık testleriyle birlikte önem taşımaktadır. Bu amaçla, 3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iyodür (JC-1), rhodamine 123 ve MitoTracker (MITO) sıklıkla kullanılan florokromlardır (Gloria ve ark., 2018; Pena ve ark., 2018).

1.5.2.4. Spermatozoon Kapasitasyon Reaksiyonu

Spermatozoon kapasitasyon reaksiyonu: seminal plazmadan köken alan ve spermatozoon membranında absorbe olan komponentlerin, uzaklaşarak spermatozoonun fertil yeteneğini kazandığı reaksiyondur. Bazı türlerde kapasitasyon reaksiyonu kalsiyum iyonlarından bağımsız olarak meydana gelirken, boğa spermatozoonları kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Kapasitasyon esnasında membran yapısında meydana gelen değişiklikler, hücre dışı kalsiyum iyonlarının, hücre içine girişine olanak sağlar. Bu hücre içi kalsiyum seviyesinin tespiti, kapasitasyon reaksiyonun öngörülmesinde, dolayısıyla spermatozoon fertil yeteneğinin tespitinde kabul gören bir analizdir. Bu amaçla akış sitometrisinde klortetrasiklin (CTC), Fluo-3 ve Fluo-4 yaygın kullanılan florokrom moleküllerdir (Gillan ve ark., 2005).

1.5.2.5. Spermatozoon Oksidatif Stresinin Belirlenmesi

Spermanın kriyoprezervasyon ve çözündürme sürecinde yaşanan biyomoleküler değişiklikler, hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO) ve süperoksit anyonu (O_2^-) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olur. Düşük miktardaki reaktif oksijen türleri, spermatozoon kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarında indükleyici olduğu için kabul edilebilirdir. Ancak yüksek orandaki reaktif oksijen türleri, spermanın kendi antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalmasına bağlı olarak, oksidatif stres etkisinin görülmesine neden olur. Nitekim oksidatif stres, spermatozoon DNA bütünlüğünün bozulmasına, membran lipid yapısının bozulmasına ve fertil yeteneğinin düşmesine neden olduğu için tespiti önemli

spermatolojik analizlerdendir. Bu amaçla, 5-(ve-6)-karboksil-2',7'-diklorofloresan diasetat (DCFDA), akış sitometri cihazlarında, sıkça kullanılan florokrom moleküldür (Gürler ve ark., 2016; Korkmaz ve ark., 2017).

1.5.2.6. Spermatozoon DNA Bütünlüğü

Spermatozoon genetik materyali olan DNA'nın bütünlüğü ve kromatin yapısı, fertilizasyon başarısı için spermatozoon kalite değerlendirmelerinde önem arz etmektedir. Spermatozoon DNA'sının, paketlenme hataları, metilasyonları ve histon katlanmaları, kalıtsal olduğu gibi oksidatif stres ve kriyoprezervasyon sürecine bağlı olarak gelişebilir. DNA bütünlüğü, akış sitometrisinde yaygın olarak, Terminal deoksिनükleotidil transferaz (Tdt)-aracılı deoksiuridin trifosfat (dUTP)- biotin nick end-labelling (TUNEL) ya da spermatozoon kromatin yapı analizi (SCSA) protokolleri ile ortaya konulmaktadır (Korkmaz ve ark., 2017; Sharma ve ark., 2013).

Sonuç olarak, akış sitometri analiz sistemleri, multiparametrik ve yüksek popülasyon analizi ile kabul gören bir analiz sistemidir. Ancak yüksek maliyet, sarf giderleri ve kalifiye personel eksikliği, akış sitometri sisteminin, androloji laboratuvarlarında yaygınlaşmasında engel teşkil eden önemli unsurlar olmuştur (Vincent ve ark., 2018).

1.5.3. Sperma Proteinlerinin Moleküler Analizi

Proteinler, kendilerini kodlayan genetik bilginin, DNA replikasyonu ile mRNA'lara iletilmesi (transkripsiyon) ve tRNA'ların bu genetik kodlamaya göre amino asitleri sıralaması (translasyon) sonucu sentezlenen makro moleküllerdir. Monomer aminoasit mikro molekülleri (alanin, valin, sistein vb.) peptit bağlar ile bağlanır ve polipeptit makro molekülleri oluşturur. Tek bir polipeptit molekül, protein olabileceği gibi birden fazla polipeptit yapıların birleşimi ile de proteinler sentezlenir. Proteinlerin yapısında bulunan, peptit makro moleküllerinin,

identifikasyonu ile proteinler sınıflandırılır. Ayrıca metabolik reaksiyonlardaki fonksiyonları belirlenerek, proteomik karakterizasyonu tespit edilir (Thieman ve Palladino, 2013).

Sperma (seminal plazma ve spermatozoon) kompozisyonunda çok sayıda protein bulunur. Bu proteinlerden bazılarının, identifikasyon ve proteomik çalışmaları sonucunda fonksiyonları belirlenmiş ve transkripsiyonu olan gen ile aynı isimle sınıflandırılmıştır. Sperma yapısında tespit edilen çok sayıda protein olmasına rağmen, proteomik karakterizasyonu tanımlanan sperma proteini sayısı, oldukça azdır (Bayram ve ark., 2016). Örneğin; Peddinti ve ark. (2008), yüksek fertilite (YF) ve düşük fertilite (DF) özelliği gösteren dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermatozoonlarında, yaklaşık 6000 farklı protein izole etmiştir. Bu proteinlerden 1518'i her iki grupta (YF ve DF) da bulunurken, YF grubunda 2051, DF grubunda 2281 proteinin farklı olduğu belirtilmiştir. İzolasyonu yapılan proteinlerden 125'nin farklı olduğu, tam olarak tanımlanamayan bu proteinlerden, YF grubunda 74 proteinin seviyesi yüksek iken, 51 proteinin seviyesinin düşük olduğu belirtilmiştir.

Proteomik karakterizasyonu tanımlanan proteinlerden bazıları, plazma membranının stabilizasyonu, motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, viyabilite, fertilizasyon, oosite spermatozoon penetrasyonu ve fagositozun desteklenmesi için yararlı etki gösterirken, bazı proteinler ise zararlı etkiler göstermektedir. Son dönemde iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE), sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), protein immüno blot (western blotlama), kütle spektrometresi (mass spectrometry), immünofloresan, enzim-bağımlı immünosorbent analizi (ELİZA) gibi teknikler ile tespit edilen sperma protein seviyeleri, spermatozoon fertil yeteneğinin tespitinde biyobelirteç olarak görülmektedir (Moura ve ark., 2007; Soares ve ark., 2012; Tacheny ve ark., 2013). Sperma proteinleri, Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü veri tabanındaki (<https://www.ebi.ac.uk/>) proteomik sınıflandırma dikkate alınarak belirtilmiştir.

1.5.3.1. Spermatozoon Proteinleri ve Fertilite ile İlişkisi

Spermatozoon yapısında farklı moleküler ağırlıkta, hücre içi veya hücre dışı biyolojik aktivasyona sahip, majör ve minör proteinler bulunur. Majör spermatozoon proteinleri genellikle, moleküler ağırlığı büyük veya biyolojik aktivitesi baskın, hücre yapı proteinleridir. Minör spermatozoon proteinleri genellikle, molekül ağırlığı küçük, yoğun olarak spermatozoon membranında bulunan, identifikasyonu güç proteinlerdir. Minör proteinler, kendi aralarında zincirleme reaksiyonlar ile kompleks etki yapan veya yeni bir kompleks reaksiyonu uyarmakla karakterize proteinlerdir (Byrne ve ark., 2012; Peddinti ve ark., 2008).

1.5.3.1.1. A-kinaz Bağlayıcı Proteini-4 (AKAP4) ve A-kinaz Bağlayıcı Protein-4 Prekürsör Proteini (proAKAP4)

Spermatozoon proteomik çalışmaları sonucu tanımlanan bir protein olan, A-kinaz bağlayıcı proteini 4 (AKAP4), spermatozoon flagellum fibröz kılıfının majör bir komponenti (~%50) olarak spermatozoon motilitesinde etkilidir. Ayrıca kemotaksis ve kapasitasyon sürecinde de görev alarak fertilizasyon sürecinde önemli rol alan bir proteindir (Blommaert ve ark., 2019; Delehedde ve ark., 2018; Fanny ve ark., 2018; Ficarro ve ark., 2003).

AKAP4, memelilerde farklı dokularda (dalak, beyin, karaciğer, akciğer, iskelet kası) bulunmasının yanı sıra yoğun olarak testis dokusunda bulunur (Rahamim Ben-Navi ve ark., 2016). İnsan, boğa ve fare spermatozoonunda AKAP4 miktarı ile total ve progresif motilite arasında pozitif korelasyon tespit edilen birçok çalışma bulunmaktadır (Legare ve ark., 2017; Luconi ve ark., 2011; Miki ve ark., 2002; Moss ve ark., 1999; Pierra ve ark., 2017; Turner ve ark., 1998).

ProAKAP4, AKAP4 proteinin sentezlenmesinde prekürsör bir proteindir. Son dönemdeki araştırmalar memeli spermatozoonunda AKAP4 proteinin ve onun prekürsörü olan proAKAP4 miktarları arasındaki pozitif korelasyon olduğunu

belirtmektedir (Blommaert ve ark., 2019; Delehedde ve ark., 2018; Le Couazer ve ark., 2019). İnsan ve aygır spermasıyla yapılan diğer çalışmalarda spermatozoon proAKAP4 seviyesi ile total ve progresif motilite arasında önemli bir korelasyon olduğu ve bu çalışmalarda proAKAP4'ün AKAP4'den sonra, spermatozoon flagellum fibröz kılıfının ikinci majör komponenti olduğu belirtilmiştir (Blommaert ve ark., 2018; Jumeau ve ark., 2018; Xu ve ark., 2012).

1.5.3.1.2. Alfa-Enolaz (ENO1)

Spermatozoon kuyruk kısmında bulunan majör bir proteindir. ENO1 translasyonu sonrası spermatozoonun kapasitasyon sürecinde görev alır. Ayrıca ATP sentezi ve oksidatif strese karşı koruyucu reaksiyon için spermatozoon enzimlerini düzenler. YF özelliği gösteren boğa spermalarında ENO1 protein seviyesi DF özelliği gösteren boğa spermalarına kıyasla daha yüksektir (Arcelay ve ark., 2008; Gitlits ve ark., 2000; Park ve ark., 2012).

1.5.3.1.3. Apolipoprotein A-1 (APOA1)

APOA1 seminal plazmadan, spermatozoon plazma membranına geçtiği düşünülmektedir. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) sentezlenmesinde esas olan majör proteindir. Spermatozoon membran geçirgenliğini düzenler, böylece hiperaktivasyon, kapasitasyondan ve akrozom reaksiyonundan sorumlu moleküllerin uyarım basamaklarının indüksiyonunu sağlar (Ehrenwald ve ark., 1990; Therien ve ark., 1997; Travis ve Kopf, 2002). İnsanlarda infertilite olgularında spermatozoon APOA1 seviyesi yüksektir (Xu ve ark., 2012). Yumurta sarısı bazlı boğa sperma sulandırıcılarında da tespit edilen APOA1'in, dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların moleküler analizlerinde, biyobelirteç olarak değerlendirilmesi önerilmemektedir (D'Amours ve ark., 2017).

1.5.3.1.4. Calicin (CCIN) veya Perinükleer Teka-60 (PT60)

Yoğun olarak testis dokusunda bulunur. Spermatogenezis sürecinde, spermatozoon kaput kısmının, perinükleer teka alanında, sitoskeleton yapısını oluşturan majör proteindir. Akrozom reaksiyonunda ve oosite spermatozoon penetrasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. İnsanlarda globozoospermi (yuvarlak başlı) vakalarının, calicin proteini eksikliğine bağlı olarak akrozom defektlerinin geliştiği ve düşük fertiliteye neden olduğu düşünülmektedir (Satar ve Narin, 2014; Sutovsky ve ark., 2003; Von ve ark., 1995).

1.5.3.1.5. Histone-2 Proteinin (H2B) Subakrozomal Varyantı (SUBH2BV)

Histon (H2B) proteini, DNA yapısına sıkıca bağlanarak nükleozomların oluşumunu sağlayan proteindir. SUBH2BV proteini, H2B proteinine %67 oranında benzer olduğu için, varyasyonu olduğu düşünülmektedir. Moleküler ağırlığı 60 kDa olan, subakrozomal bölgede bulunan, SUBH2BV proteini spermatozoon akrozom bütünlüğünün sağlanmasında önemli rol alan majör proteindir (Aul ve Oko, 2001; Oko ve Sutovsky, 2009). Yüksek fertilité görülen boğa spermalarında SUBH2BV seviyesi, daha düşüktür (Peddinti ve ark., 2008).

1.5.3.1.6. Protamin (PRM)

Protaminler, spermatogenezisin haploid fazı sırasında, spermatozoon kromatinindeki histonların yerine geçer ve spermatozoon DNA yapısının yoğun ve stabil bir komplekse dönüşmesine sağlar. İnsan, fare ve boğalarda protamin-1 ve protamin-2 olmak üzere iki varyasyonu bulunur. Protamin-1 ve protamin-2 seviyesi ile boğa fertilitesi arasında pozitif korelasyon vardır (Doğan ve ark., 2015; Kutchy ve ark., 2017; Kutchy ve ark., 2019).

1.5.3.1.7. Sitokrom b-c1 Kompleks Alt Birimi-2 (UQCRC2)

Spermatozoonun kaput ve kuyruk yapısında bulunan majör proteindir. Mitokondri organelinde reaktif oksijen türlerinin salınımına neden olarak oksidatif stresi artırır. YF özelliği gösteren boğa spermalarında UQCRC2 protein seviyesi, DF özelliği gösteren boğa spermalarına kıyasla daha düşüktür (Kwon ve ark., 2015; Park ve ark., 2012).

1.5.3.1.8. Spermatozoon Kuyruk Dış Fiber Proteini-2 (ODF2)

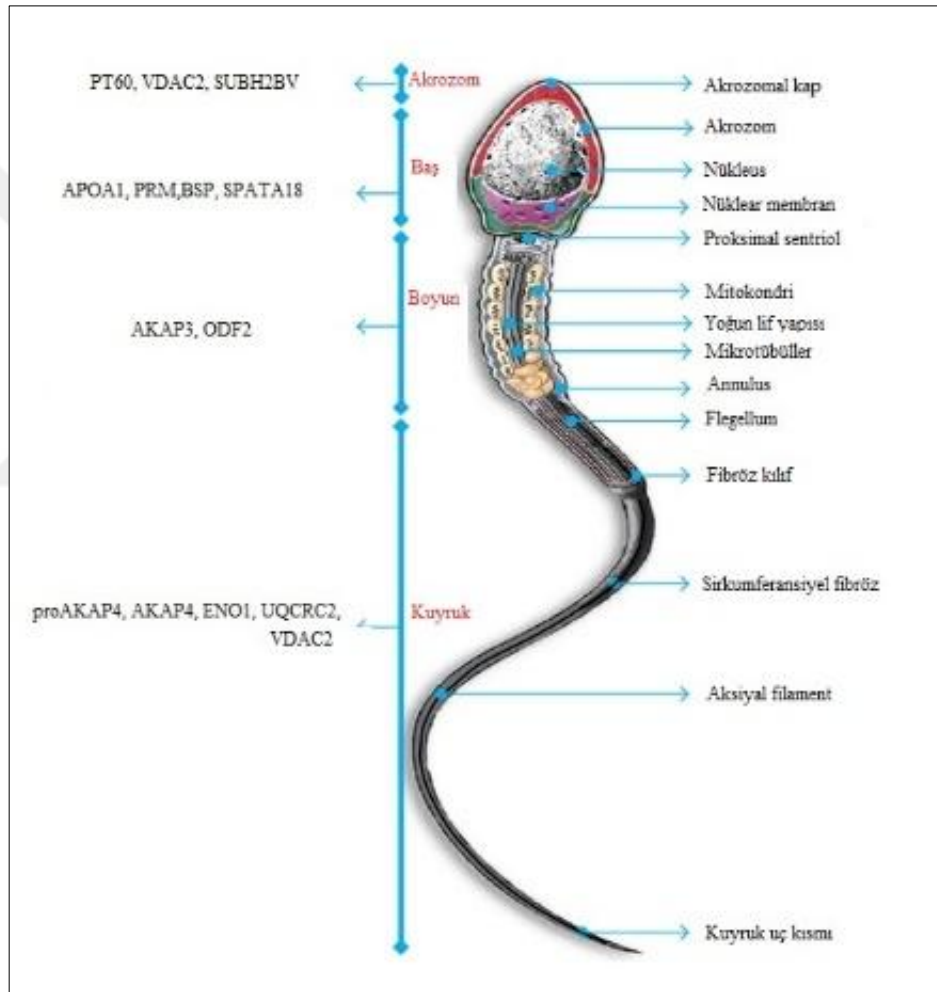
Spermatozoonun sentrozom matriksinin temel komponenti olan ODF2 spermatozoon yapısında yoğun bulunan majör protein grubundadır. Nitekim spermatozoon kuyruk yapısının aksonem orta ve uç kısmında yer alır, sitoskeleton yapının ana birleşenlerindendir. Spermatozoon kinetik fonksiyonları ile ilişkilendirilir. İnsanlarda asthenozoospermi ve infertilite olgularında, farelerde spermatozoon kuyruk anomalisi ve düşük motilite olgularında ODF2 seviyesinin düşük olduğu belirtilmiştir (Ashrafzadeh ve ark., 2013; Baker ve ark., 2009; Tarnasky ve ark., 2010; Xu ve ark., 2012).

1.5.3.1.9. Spermatogenezis ile İlişkili Protein-18 (SPATA18)

Spermatozoon yapısında ve spermatogenezis sürecinde testiste en fazla bulunan majör proteinlerden biridir. Spermatogenezis sürecinde olası bir DNA hasarına karşı, hücrel cevabın organizasyonunu sağlar. Ayrıca SPATA18, spermatogenezis sürecinde gamet hücrelerinin normal farklılaşmasının tespitinde biyobelirteç bir proteindir. İnsan ve boğa, teratozoospermi ve asthenozoospermi olgularında düşük seviyede, yüksek fertilite görülen koç spermatozoonlarında yüksek seviyededir (Bornstein ve ark., 2011; Legare ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2020).

1.5.3.1.10. Voltaj Bağılı Anyon Kanal Proteini-2 (VDAC2)

VDAC2 proteini testis dokusunda, spermatosit, spermatid ve spermatozoon yapısından izole edilen majör proteindir. Metabolik taşıma, transdüksiyon ve kapasitasyon reaksiyonunda, tirozin fosforilasyonunda rol alan bir proteindir. YF özelliği gösteren boğa spermalarında VDAC-2 protein seviyesi DF özelliği gösteren boğa spermalarına kıyasla daha yüksektir (Hinsch ve ark., 2001; Park ve ark., 2012).



Şekil 1.2. Bazı spermatozoon proteinlerinin lokasyonu (Rahman ve ark., 2013; Xu ve ark., 2012; Zhu ve ark., 2020).

1.5.3.2. Başlıca Spermatozoon Minör Proteinleri

Minör proteinler, majör proteinler ile etkileşime girerek, spermatogenezis, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, fagositoz, spermatozoonun oosit içine penetrasyonu gibi kompleks reaksiyonlarda rol alan moleküllerdir. Albumin, Aktin benzeri protein-7B (ACTL-7B), açıl koenzim-A-tiyoesteraz-9 (ACOT-9), spermatozoon ilişkin antijen-6 (SPAG-6), sistein bakımından zengin salgı proteini (SMCP), tektin-1, transmembrane proteini-5 (TM-5), kalmodulin-1 (CALM-1), fosfatidil etanolamin bağlayıcı proteinler (PEBP1 ve PEBP4), spermadhezin-Z2 (SPADH-2) minör protein seviyeleri, yüksek fertilite görülen boğa spermalarında yüksek olduğu tespit edilmiştir (Peddinti ve ark., 2008; Somashekar ve ark., 2017). Önde gelen diğer minör proteinler Çizelge 1.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 1.2. Başlıca spermatozoon minör proteinleri.

Protein Adı	Sembol	Moleküler fonksiyonu	Kaynak
Açıl-koenzim-A-tiyoesteraz-9	ACOT9	Motilite	Peddinti ve ark., 2008
A-kinaz bağlayıcı proteini-3	AKAP3	Motilite	D’Amours ve ark., 2017
Aktin Benzeri Protein-7B	ACTL7B	Sitoskeleton yapı proteini	Peddinti ve ark., 2008
Albumin	ABL	Kapasitasyon	Westfalewicz ve ark., 2017 ve Moura ve ark., 2010
Anneksin-A2	ANXA-2	Kapasitasyon	Peddinti ve ark., 2008 Westfalewicz ve ark., 2017
ATPaz alt birim beta-5	ATP-5B	ATP bağlayıcı, Motilite	D’Amours ve ark., 2017.
ATPaz alt birim-O	ATP-5O	Oksidatif fosforilasyon, Motilite	Peddinti ve ark., 2008
Klusterin	CLU	Apoptosis, Lipit metabolizması	Westfalewicz ve ark., 2017 Souza ve ark., 2012
Fosfatidil-etanolamin bağlayıcı protein 1-4	PEBP1, PEBP4	Spermatogenezis, Motilite Plazma membran bütünlüğü	Somashekar ve ark., 2017
Fosfolipaz-A2	-	Akrozom reaksiyonu	Moura ve ark., 2006
Heparin Bağlayıcı Proteinler	HBP	Akrozom reaksiyonu	Pachón ve ark., 2012

Isı şoku proteini 60kDa	HSPD1	Kapasitasyon, Tirozin fosforilasyonu	Habib ve ark. 2013
Isı şoku proteini-70kda	HSP70	Antioksidan, Motilite, Oosit penetrasyonu	Westfalewicz ve ark., 2017
Kalmodulin-1 (kalsiyum bağlayıcı protein)	CALM-1	Akrozom reaksiyonu	Somashekar ve ark., 2017
Proto-onkogen-C Bağlayıcı Proteini	MYCBP	Spermatogenezis	Selvaraju ve ark., 2018.
Ribonükleaz aktive edici protein	RNASE-4	Spermatozoon maturasyonu	Selvaraju ve ark., 2018.
Spermatozoa mitokondriyal ile ilişkili sistein bakımından zengin protein	SMCP	Spermatozoon maturasyonu ve oosit penetrasyonu	Byrne ve ark., 2012
Spermadhezin Z2	SPADH2	Motilite ve Fertilizasyon	Somashekar ve ark., 2017.
Spermatozoa ilişkin antijen- 6	SPAG6	Kapasitasyon	Byrne ve ark., 2012
Tektin-1	TEKT-1	Motilite	Byrne ve ark., 2012
Transmembrane proteini-5	-	Kapasitasyon, Akrozom reaksiyonu	Byrne ve ark., 2012
Zona pellusida spermatozoa bağlayıcı proteini-2 ve 3	ZP-2, ZP-3	Fertilizasyon, Akrozom reaksiyonu	Selvaraju ve ark., 2018.

1.5.3.3. Seminal Plazma Proteinleri

Seminal plazma, ejakülatın sıvı olan kısmıdır. Epididimal sıvı ile birlikte erkek aksesuar bezlerinin salgılarından oluşur. Boğalarda seminal vezikül, prostat, bulboüretal bezler ve ampulla olmak üzere dört adet erkek aksesuar bezi bulunur. Seminal vezikül salgıları boğa seminal plazmasının büyük oranını oluşturur. Seminal plazma esas olarak, ejakülasyon sırasında spermatozoonların taşınmasını mümkün kılan, besleyici ve koruyucu bir sıvıdır. Seminal plazma proteinleri büyük bir kısmı spermatozoonların yüzeyine bağlanır ve kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, spermatozoon-oosit etkileşimi gibi fertilizasyon aşamalarında önemli rol oynar (Juyena ve Stelletta, 2012; Kelly ve ark., 2006; Rego ve ark., 2014).

1.5.3.3.1 Sığır Seminal Plazma Proteini (BSP)

Boğalarda seminal vezikül tarafından salgılanan, asidik özellikteki sığır seminal plazma proteinleri, seminal sıvıdaki toplam protein içeriğinin ~%60 oluşturan majör proteinlerdir. Spermatogenezde görev alan, seminal plazmadan spermatozoon membranına bağlanan proteinlerdir. Çeşitli kaynaklara göre sınıflandırılması değişmekle birlikte, boğalarda 4 farklı BSP proteini bulunmaktadır. Bunlar; BSP-1, BSP-2, BSP-3 ve BSP-30 kDa (kilo Dalton) olarak adlandırılmaktadır. Her dört protein de jelatin, heparin, apolipoprotein-A1, glikozaminoglikanlar, kolin fosfolipidler ve düşük dansiteli lipoproteinlere bağlanma gibi benzer biyokimyasal özelliklere sahiptir. BSP-3 hariç bütün proteinler glikoprotein yapısındadır (Kumar ve ark., 2012; Moura ve ark., 2007; Wah ve ark., 2002).

Bu proteinler plazma membranındaki fosfolipidlerin fosforilkolin gruplarına bağlanarak membranı kaplamakta ve stabilize etmektedir. BSP-1, BSP-2 ve BSP-3 spesifik olarak fosforilkolin gruplarına bağlanırken, BSP-30 kDa'un daha geniş bir bağlanma spesifitesi bulunmaktadır (Juyena ve Stelletta, 2012). Olası bir erken akrozom reaksiyonunu engelleyen bu durum, spermatozoonun dışı genital kanaldaki yüksek dansiteli proteinler (HDL) ile karşılaşmasına kadar devam etmektedir. BSP, HDL ile kompleks oluşturmak için plazma membranından ayrılırken, aynı zamanda kolesterol ve belirli fosfolipidlerin de çıkışına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak spermatozoon membranının permabilitesi, kolesterol/fosfolipid oranı değişimi nedeniyle bozulmakta ve fosfolipaz-A2 enziminin aktivasyonu için, hücre içine kalsiyum girişini sağlamaktadır. Fosfolipaz-A2, fosfolipidleri, membran destabilizasyona neden olan lizofosfolipidlere dönüştürmekte bu da akrozom reaksiyonunu başlatmaktadır. Bu nedenle membrana BSP proteinlerinin bağlanması dekapasitasyonu sağlarken, membrandan ayrılması ise kapasitasyonu tetiklemektedir (Çil ve Akçay, 2017; Kutty ve ark., 2014).

BSP proteinleri içerisinde en belirgin proteomik karakterizasyon çalışması BSP-3 proteini ile ilgilidir. Roncoletta ve ark. (2006), boğa spermatozoon

membranında 27 minör protein belirlemiş, majör protein olarak belirlenen BSP-3, düşük fertilitateye sahip boğaların spermatozoon membranında 2,5 kat daha yüksek oranda olduğunu tespit etmiştir. Habib ve ark. (2013), BSP-3 protein seviyesinin, normospermi gösteren dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermatozoonlarında, anormal baş yapısı gösteren spermatozoonlara kıyasla daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Dolayısıyla düşük fertilitate yeteneğine sahip boğa spermatozoonlarının plazma membranlarında yüksek konsantrasyonda BSP-3 proteinleri bulunmaktadır. Seminal plazmada bol miktarda bulunan BSP1 proteinin ise doza bağlı bir şekilde, büyük bir olasılıkla Ca^{+2} ATPaz aktivasyonu yolu ile motiliteyi arttırdığı düşünülmektedir (Sanchez ve ark., 2004).

1.5.3.3.2. Diğer Seminal Plazma Proteinleri

Laktoferrin, klusterin, lipokalin-tip-prostaglandin-D-senteaz, osteopontin, asidik seminal sıvı proteini (aSFP), ubikuitin ve 25 kDa protein beta (P25b) başlıca seminal plazma majör proteinleridir. Yüksek fertilitate özelliği gösteren boğa spermalarında, lipokalin-tip-prostaglandin-D-senteaz, klusterin ve osteopontin proteinlerinin daha yüksek seviyede olduğu, düşük fertilitate özelliği gösteren boğa spermalarında, P25b seviyesinin düşük, ubikuitin seviyesinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Çil ve Akçay, 2017; Juyena ve Stelletta, 2012; Kumar ve ark., 2012; Moura ve ark., 2006). Kriyoprezervasyon sürecinde, boğa sperma sulandırıcılarına ilave edilen laktoferrin proteinin, dondurulmuş-çözdürülmüş spermatozoon kinetik değerlerine olumlu etki yaptığı belirtilmiştir (Kobayashi ve ark., 2007).

Kauda epididimisten sentezlenen, sığır beta-defensin 126 (BBD126) proteini, spermatozoonların kuyruk ve post akrozomal bölgesinden absorbe olur. Epididimal sıvı ve servikal mukus içerisinde spermatozoonların motilite ve dışı genital kanaldaki göçünde önemli rol oynadığı belirtilmesine rağmen fertilitate üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca makaklardan izole edilen BBD126 ile muamele edilen boğa spermatozoonlarının, hareket yeteneklerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Bu durum, aynı proteinlerin türler arasında farklı metabolik

reaksiyonlar ile aktive olduğu hipotezini desteklemektedir (Fernandez ve ark., 2016; Tollner ve ark., 2008; Whiston ve ark., 2017).

İleri teknoloji analiz tekniklerinin içerisinde sperma proteinlerinin moleküler identifikasyonu ile fertilite yeteneğinin tespiti, son dönemde ön plana çıkan bir analiz yöntemidir. Sperma fertil yeteneğinin tespitinin yanı sıra, idiopatik erkek fertilite bozukluklarının etiyolojisinin belirlenmesinde ve bu olguların tedavi prognozu açısından da sperma proteinlerinin moleküler analizi önem arz etmektedir (Delehedde ve ark., 2019; Sergeant ve ark., 2019).

Spermatozoonun fertilizasyon sürecinde gerçekleştirdiği bir dizi kompleks reaksiyonlar, tek bir analiz yöntemi ile sperma fertilitesinin kapsamlı değerlendirilmesine henüz izin vermemektedir. Gelişen teknoloji akabinde spermanın proteomik analizleri, fertilite için potansiyel proteinlerin tanımlanmasına imkan sunan, hızla gelişen ve ileri teknoloji odaklı bir analiz tekniğidir. Boğa sperma kalitesinin biyobelirteç proteinler ile analizinin, kısa süre içerisinde rutin androloji testlerine eklenmesi birçok bilim insanı tarafından öngörülmektedir (Carrell ve ark., 2016).

Belirtilen bilimsel öngörüler doğrultusunda, bu çalışmanın amacı yaygın kullanılan spermatozoon morfolojik analizlerine ek olarak 3 saat süresince uygulanan spermatozoon termorezistans testi ile spermatozoon kinematik diyagnozunun ve prognozunun moleküler bir biyobelirteç olan proAKAP4 protein analizi ile araştırılmasıdır. Ayrıca bu amaçla kullanılan yeni bir ileri analiz tekniği olan proAKAP4 ELİZA tespit kitinin, androloji laboratuvarlarına adaptasyonunun ve standardizasyonunun araştırılmasıdır. Çalışma sonucunda suni tohumlama uygulamalarında kullanım standartlarına sahip dondurulmuş boğa spermalarının, sahip olması gereken proAKAP4 seviyesinin tespit edilmesi ve gelecek çalışmalara bir öngörü oluşturması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Tez çalışmasında, yetkili laboratuvar tarafından, “Sunı Tohumlama Uygunluk” raporu alınmış 6 farklı simental ırkı boğaya ait 30 farklı üretim tarihli 0,25ml payetler içerisindeki, dondurulmuş boğa spermaları kullanılmıştır. Dondurulmuş sperma numuneleri özel bir firmadan (GENOVET) temin edilmiştir. Çalışma prosedürü, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylanmıştır (Etik Kurul Onayı Karar Sayısı: 27, Karar Tarihi: 03/07/2019). Etik kurul onayı ekte sunulmuştur.

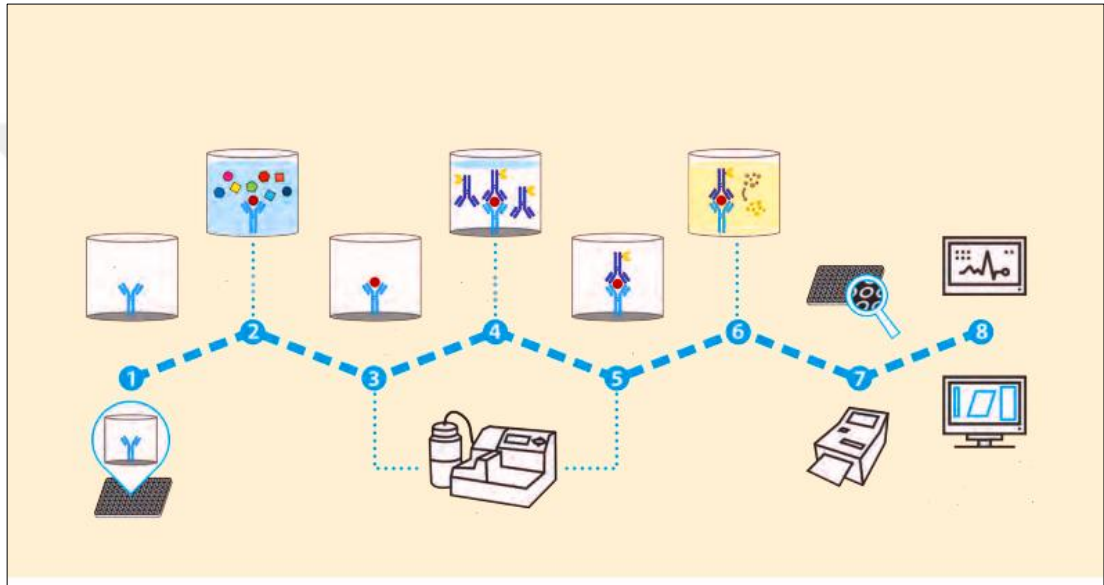
Çalışmanın, dondurulmuş-çözdürülmüş boğa sperması proAKAP4 proteini seviyeleri, ELİZA analizi ile özel bir biyoteknoloji firmasının (DİAGEN A.Ş.) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Sperma numunelerinin hipo-ozmotik şişme testi (HOST), Hankok solüsyonu ile morfolojik değerlendirme ve 0.-3. saat kinetik analizleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sunı Tohumlama Laboratuvarında bulunan alet ve ekipmanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1.Dondurulmuş-Çözdürülmüş Boğa Spermalarının ELİZA Yöntemiyle proAKAP4 Protein Seviyelerinin Tespiti

Boğa spermalarının proAKAP4 protein seviyeleri, ticari olarak temin edilen Bull 4MID[®] Kit, (4BioDx, Fransa) ELİZA test kiti kullanılarak tespit edildi. Bu analiz yönteminde, spermatozoon üzerinde bulunan proAKAP4 hedef antijenin, iki antikor molekülü arasına sıkıştırılması esas alınır. Mikroplaka yüzeyinde proAKAP4 antijenine özgü yakalama antikoru bulunur ve bu antikora spermatozoon üzerinde bulunan proAKAP4 antijeni bağlanır. Daha sonra antijene özgü yaban turpu

peroksidazından (horseradish peroxidase) elde edilen proAKAP4 tespit antikorunu eklenir. Tespit antikorunu, hedef antijen ve yakalama antikorunu ile birlikte kovalent bağ oluşturur. Oda sıcaklığında, belirtilen inkübasyon süresinde bekletildikten sonra renk reaksiyonunun başlatılması için substrat madde eklenir. Mikroplaka yüzeyinde oluşan renk yoğunluğunun, ELİZA okuyucu cihazı (Biotek 800TS, ABD) ile ölçümünden yararlanarak spermatozoon proAKAP4 protein seviyeleri tespit edilir. ProAKAP4 ELİZA testinin uygulama aşamaları, Şekil 2.1’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.1. ProAKAP4 ELİZA testinin uygulama aşamaları; yüzeyinde antikor bulunan mikroplaka (1), mikroplakaya sperma numunesinin eklenmesi (2), mikroplaka yıkama işlemi (3-5), tespit antikorunun eklenmesi (4), substrat maddenin eklenmesi ve renk reaksiyonunun oluşması (6), ELİZA okuyucu cihaz ve uygun programlar ile sonuçların hesaplanması (7-8) (Baydemir, 2019; Ruelle ve ark., 2019).

ELİZA Kitinin İçeriği:

Antikor ile kaplı 96 kuyulu mikroplaka,

Yıkama solüsyonu (washing buffer solution),

Liyofilize standart kimyasal (lyophilized standart),

Tampon solüsyonu (dilution buffer),

Spermatozoon lizis solüsyonu (lysis buffer),

Tespit Antikoru (detection antibody),

Substrat solüsyonu (substrate solution),

Reaksiyonu sonlandırıcı solüsyonu (stop solution),

Pozitif kontrol solüsyonu (positive control).

2.2.1.1. ELİZA Testinin Uygulanması

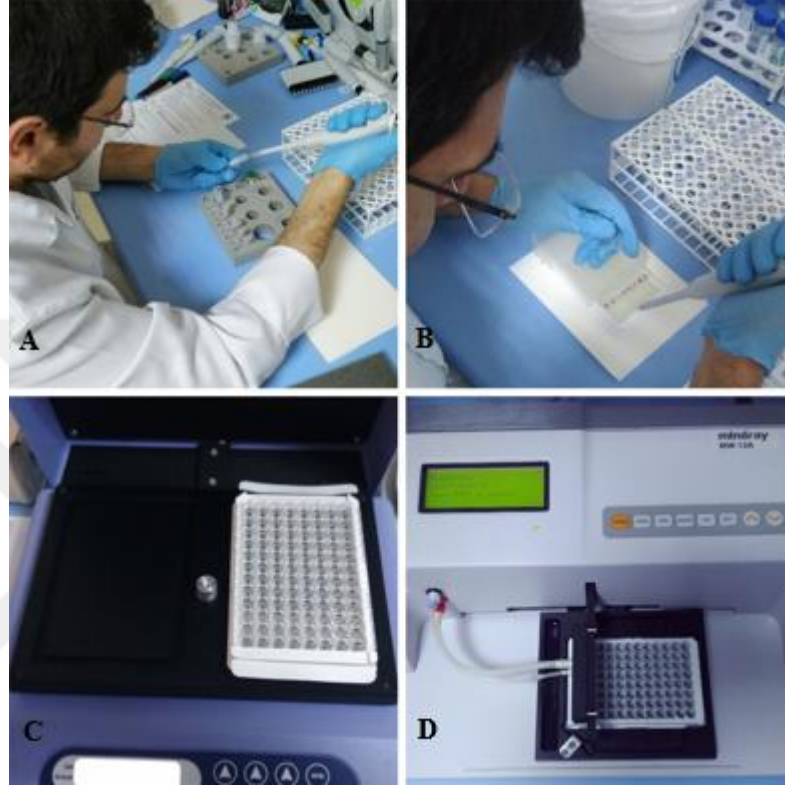
Test kiti, saklama sıcaklığı olan +4°C muhafaza edildi. Tespit antikoru dışındaki kit içeriğindeki ürünlerin, uygulamaya başlamadan önce ısısının oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.

Liyofilize standart kimyasalına 1 ml tampon solüsyonu eklenerek, standart stok solüsyonu elde edildi. Stok standart solüsyonundan 10 µl ve tampon solüsyonundan 1990 µl eklenerek en yüksek standart konsantrasyon hazırlandı. Ayrı bir tüp içerisine, 400 µl en yüksek standart konsantrasyonu ile 600 µl tampon solüsyonu eklenerek 600 ng/ml proAKAP4 kontrol solüsyonu elde edildi (tüp no:1). İçerisinde 500 µl tampon solüsyonu eklenen 6 farklı tüpe, ardışık olarak 500' er µl standart solüsyonu eklenerek farklı proAKAP4 yoğunluklarında kontrol solüsyonları elde edildi (tüp no: 2, 3, 4, 5, 6, 7). Ayrı bir tüpe ise sadece 500 µl tampon solüsyonu eklenerek negatif kontrol solüsyonu elde edildi (tüp no:8), (Şekil 2.2).

Elde edilen kontrol solüsyonlarının her birinden 100'er µl solüsyon ikişer mikrolaka kuyularına eklendi (A₁- H₁ ve A₂-H₂). A₃ ve A₄ mikrolaka kuyularına ise analiz kiti içerisinde bulunan pozitif kontrol solüsyonu eklendi.

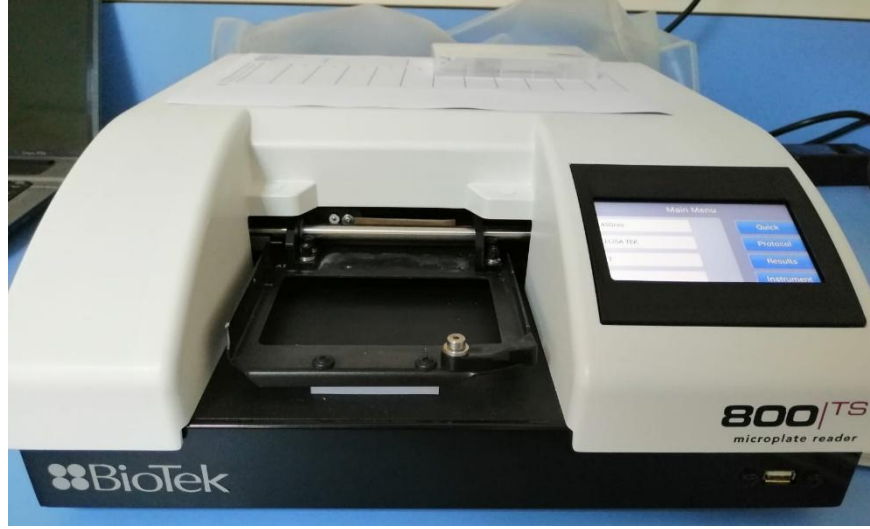
Her farklı üretim tarihinden 2'şer payet sperma numunesi, 37°C'de 30sn çözdürüldükten sonra bir ependorf tüp içerisine aktararak, vorteks ile homojen karışması sağlandı. İçerisinde 125 µl spermatozoon lisis solüsyonu bulunan, ayrı bir ependorf tüp içerisine, 25 µl sperma numunesi eklenerek 1 dakika süresince

vortekslendi. Bu karışıma son olarak 150 µl tampon solüsyon eklenerek, 1 dakika vortekslendi ve sperma numunesi ELİZA analizi için hazır hale getirildi. Her bir üretim tarihinden hazırlanan sperma numunelerinden ikişer mikrolaka kuyularına 100'er µl sperma numunesi eklendi.



Şekil 2.2. ProAKAP4 ELİZA testinin uygulanışı. A: farklı yoğunluktaki kontrol solüsyonlarının hazırlanması. B: dondurulmuş-çözdürülmüş sperma numunelerinin mikrolakalara eklenmesi. C: çalkalayıcı cihazında inkübasyon süreci. D: mikrolaka yıkama cihazında yıkama işleminin gerçekleştirilmesi.

Sperma numuneleri eklenen mikrolaka, oda sıcaklığında 90 dakika süresince çalkalayıcıda (250 rpm) inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 300 µl yıkama solüsyonu ile mikrolaka yıkama cihazında üç defa yıkama işlemi gerçekleştirildi. 60 µl tespit antikoru, 12 ml tampon solüsyonu ile seyreltilerek, mikrolaka yüzeyindeki bütün kuyulara 100'er µl eklendi. Daha sonra oda sıcaklığında, çalkalayıcıda (250 rpm) 30 dakika inkübe edildi.



Şekil 2.3. ELİZA okuyucusunda mikrolakanın değerlendirilmesi.

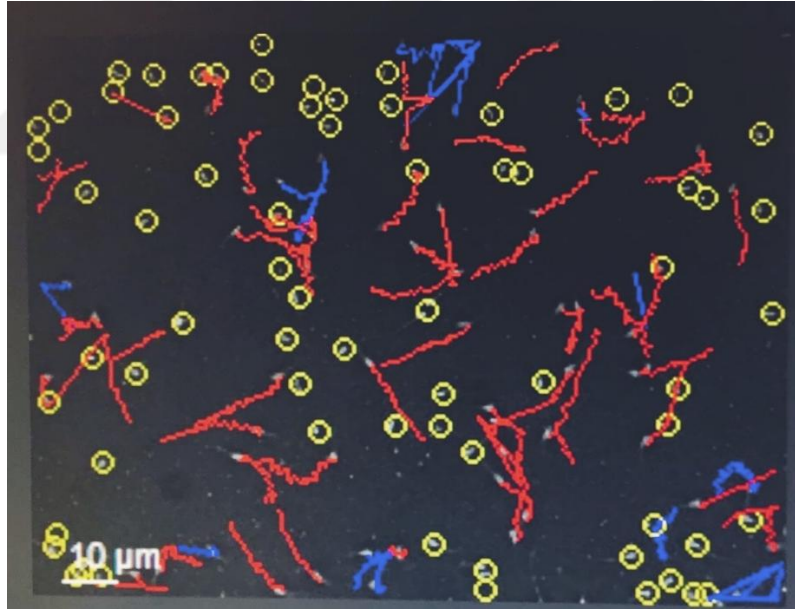
İnkübasyon sonrası tekrar, mikrolaka yıkama cihazında yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından bütün kuyulara ışıktan sakınarak, 100 µl substrat madde eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika süresince, çalkalayıcıda (300 rpm) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bütün kuyulara 50 µl reaksiyon sonlandırıcı solüsyon eklendi ve 2 dakika çalkalayıcıda (200 rpm) inkübe edildi. Son olarak mikrolaka, sonuçların değerlendirilmesi için ELİZA okuyucusuna yerleştirildi ve analiz sonuçları ELİZA okuyucusunda (Biotek 800TS, ABD) 450 nm dalga boyunda okutularak, kit prosedürüne göre belirlendi (Şekil 2.3).

2.2.2. Spermatozoon Termorezistans Testi

Sperma numunelerin yaşam süresinin tespiti için termal stres testi uygulandı. Her farklı üretim tarihinden 2'şer payet sperma numunesi, 37°C'de 30sn çözdürüldükten sonra bir ependorf tüp içerisine aktarılarak, vortekslendi. Her farklı numuneden 50 µl sperma numunesi ayrı bir ependorf tüp içerisinde, önceden sıcaklığı 37°C'de sabitlenen inkübatör (Uniterm, Türkiye) içerisinde 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon öncesi ve sonrası spermatozoon CASA analizleri uygulandı (Ntemka ve ark., 2016).

2.2.3. Motilite, Progresif Motilite ve Spermatozoon Hareket Özellikleri

Dondurulmuş spermaların çözüm sonu motilitelerinin ve hareket özelliklerinin değerlendirilmesi için CASA, *Sperm Class Analyzer* (SCA® v.4.2, İspanya) kullanıldı (Şekil 2.4). Her bir örnekten 5 µl alınarak lam üzerine damlatıldı ve üzeri 22x22 lamel ile kapatılarak; sisteme bağlı faz-kontrast mikroskopta (Nikon ECLIPSE 50i, Japonya) 10x10'luk büyütmede kamera (Basler®, Almanya) eşliğinde her bir örnek için, en az 5 farklı alandan alınan görüntüler analiz edildi. Analizde sırasıyla; spermatozoon toplam motilitesi (TM, %), progresif motilite (PM, %), eğrisel hız (VCL, µm/s), doğrusal hız (VSL, µm/s), ortalama yol hızı (VAP, µm/s), çizgisellik (LIN= VSL/VAP), doğrusallık (STR=VSL/VAP), yalpalama (WOB=VAP/VCL), kaput spermatozoonun ortalama yoldan laterale sapma uzaklığı (ALH, µm) ve çapraz geçiş frekans ritmi (BCF, Hz) değerleri tespit edildi (Tekin, 2017).



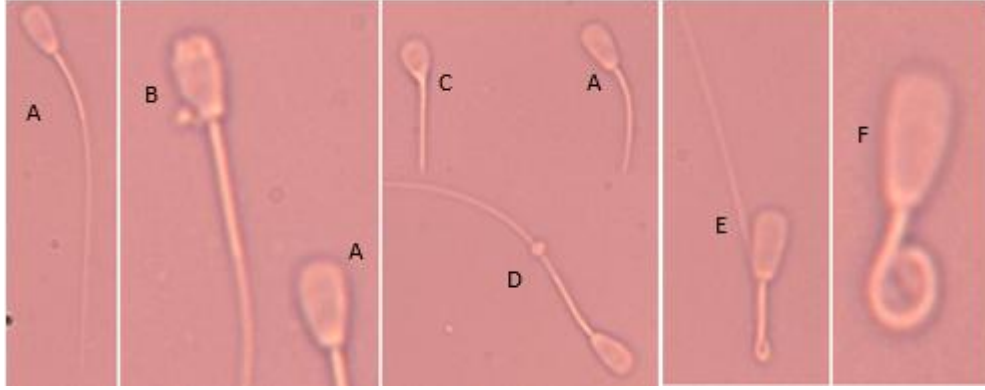
Şekil 2.4. Spermatozoon CASA analizi görüntü diyagramı. Sarı: immotil spermatozoon. Kırmızı: progresif motil spermatozoon. Mavi: motil spermatozoon.

2.2.4. Anormal Spermatozoon Oranı

Hancock tespit solüsyonu Çizelge 2.1’de belirtildiği gibi hazırlandı. Hazırlanan Hancock tespit solüsyonundan 1 ml ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma numunesinden 5 µl örnek, bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve vorteksle homojen karışması sağlandı. Elde edilen karışımdan 5 µl örnek lam üzerine konulup lamel ile kapatıldı. Kapatılan lamel üzerine bir damla sedir yağı damlatılarak, 100 x büyütme ile ışık mikroskopunda değerlendirildi. En az 200 spermatozoon incelenerek yapısal olarak, akrozom, baş, boyun ve kuyruk anomalileri, % olarak değerlendirildi (Akal ve ark., 2017; Tekin ve Daşkın, 2016). Hancock solüsyonu ile analiz edilen normal ve morfolojik anomalisi olan spermatozoon mikroskop görüntüleri Şekil 2.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Hancock solüsyonu hazırlanışı (Alemdar, 2018; Schafer ve Holzmann, 2000).

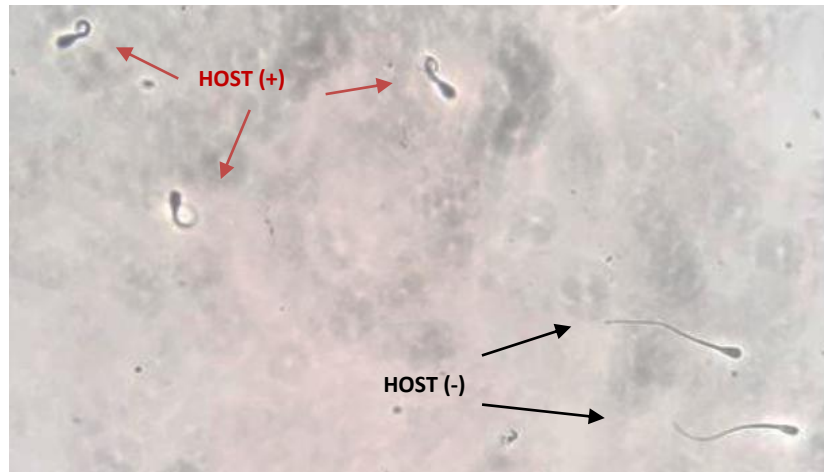
	Hazırlanışı	Solüsyonun Toplam Hacmi	Hancock solüsyonu için eklenecek miktar
Sodyum Salin Solüsyonu	9,01 g NaCl’ye 500 ml bidistile su	500 ml	150 ml
Buffer Solüsyonu	Buffer1 – 21,682 g Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O ve 500 ml bidistile su Buffer2 – 22,254 g KH ₂ PO ₄ ve 500 ml bidistile su 200 ml Buffer1 ile 80 ml Buffer2 karıştırılır	280 ml	150 ml
Formalin	% 37’lik	62,5 ml	62,5 ml
Bidistile Su	-	-	500 ml



Şekil 2.5. Normal ve anormal spermatozoonların morfolojik mikroskop görüntüleri. A: normal spermatozoon. B: anormal akrozom. C: anormal baş yapısı. D: distal droplet. E: anormal boyun. F: anormal kuyruk.

2.2.5. Spermatozoon Plazma Membran Bütünlüğü

Hipo-ozmotik şişme testi (HOST) uygulanarak spermatozoon plazma membran bütünlüğü analiz edildi. Bu amaçla 100 mOsm/l'tik bir solüsyon (9 g früktoz + 4,9 g sodyum sitrat, 1 lt distile su içerisinde çözöldü) kullanıldı. 50 µl dondurulmuş-çözdürölmüş sperma örneğı, 500 µl 100 mOsm hipo-ozmotik solüsyonu içerisinde 37°C' de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bu karışımından 5 µl örneğ, lam üzerine alınıp lamel ile kapatılarak, 400 x büyütme ile ışık mikroskopunda değeriendirildi. En az 200 spermatozoon incelendi, şişmiş veya kuyruğı kıvrılmış spermatozoonlar HOST-pozitif olarak değeriendirildi (Şekil 2.6) (Akal ve ark., 2017; Nur ve ark., 2012).



Şekil 2.6. HOST (+) ve HOST (-) spermatozoonların mikroskop görüntüsü.

2.2.6. Spermatozoon Yoğunluğunun Tespiti

Spermatozoon yoğunluğu hemositometrik yöntemle saptandı. Bu amaçla 10 µl sperma örneğine 990 µl Hayem solüsyonu (1g NaCl, 5g Na₂SO₄, 0,5g HgCl₂ ve 200ml distile su) eklenerek 1/100 oranında sulandırıldı. Üzeri daha önceden lamelle kapatılan Thoma lamının her iki sayım kamarası kapillar pipet yardımıyla birer damla sperma içeren solüsyon ile dolduruldu. Spermatozoonların çökmesi için yaklaşık 5 dakika beklendi ve Thoma lamında orta büyüklükte on kareye düşen spermatozoonlar mikroskobun ×400 büyütmesinde sayılarak kaydedildi. Bulunan hücre sayısı ve sayılan kareler, büyük karenin hacmine bölünmesi ve 1000’le çarpılmasıyla, ml’deki spermatozoon sayısı elde edildi (İnanç ve ark., 2014; Prathalingam ve ark., 2006; Sönmez, 2010).

2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm değişkenler için tanımlayıcı istatistikler hesaplanarak “Aritmetik Ortalama ± Standart Hata” şeklinde gösterimde bulunuldu. Önemlilik testlerine geçilmeden önce veriler, parametrik test varsayımlarından normal dağılıma uygunluk yönünden Shapiro Wilk, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. İlgili değişkenlere grup, zaman temel etkileri ile grup*zaman etkileşim teriminin etkisinin araştırılmasında karma (mixed) modellerden yararlanıldı. Kurulan modelde, hayvan, rastgele etki (random effect), grup, zaman ve grup*zaman etkileşim terimleri ise sabit (fixed) etki olarak yer aldı. Etkileşim teriminin anlamlı bulunduğu durumlar için Bonferroni düzeltmeli basit etkiler analizi (simple effect) uygulandı. Sperma numunelerinin, proAKAP4 seviyesi, toplam motilite, progresif motilite, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF, hiperaktivite, plazma membran bütünlüğü, spermatozoon yoğunluğu, normal ve anormal spermatozoon değerleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayısı ile incelendi. Gruplar arasında HOST-pozitif ve HOST-negatif spermatozoonların değerlendirilmesi, parametrik test varsayımları sağlayanlar için ANOVA ile sağlamayanlar için ise Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde p<0.05 kriterinden

yararlanıldı. Tüm analizler Stata 12/MP4 (Lisans No: 50120500264) istatistik paket programı aracılığı ile gerçekleştirildi.



3. BULGULAR

Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma numunelerine ait proAKAP4 seviyeleri (ng/10x10⁶ spermatozoa), Çizelge 3.1’ de belirtilmiştir. Sperma numuneleri spermatozoon proAKAP4 seviyelerine göre üç grup altında (grup I: proAKAP4<25ng/10x10⁶s., grup II: 25ng/10x10⁶s.≤ proAKAP4<40ng/10x10⁶s., grup III: proAKAP4≥40ng/10x10⁶s.) değerlendirildi.

Çizelge 3.1. Dondurulmuş-çözdürülmüş boğa spermalarının proAKAP4 seviyeleri (Arit. Ort. ± SH).

n	Parametre	Ort. ± SH	En Düşük	En Yüksek
30	proAKAP4 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	38,92±20,71	10,98	90,44

Gruplar arasında 0. saatte uygulanan, toplam motilite (TM₀) ve spermatozoon hareket özellikleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamasına rağmen (p>0,05), progresif motilite (PM₀) farklılıkları istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (p<0,05). Ayrıca 37°C de 3 saat inkübasyon periyodu sonrası yapılan CASA analizlerinde, proAKAP4 gruplarına göre spermatozoon TM₃ ve PM₃ değerleri arasındaki farklılıklar, istatistiksel açıdan anlamlı (p<0,05), spermatozoon hareket parametreleri arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamsız bulundu (p>0,05). Spermatozoon hareket özelliklerinden VAP, VSL, LIN, STR, WOB, BCF parametrelerine, zaman etkisi bakımından var olan farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05). Spermatozoon VCL, ALH ve hiperaktivite parametrelerine, zaman etkisi istatistiksel açıdan anlamsız bulundu (p>0,05). Spermatozoon proAKAP4 gruplarına göre 0. saat ve 3. saat toplam motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket özellikleri bulguları Çizelge 3.2, 3.3 ve 3.4’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. ProAKAP4 seviyelerine göre 0. ve 3. saat spermatozoon toplam motilite ve progresif motilite değerleri (Arit. Ort. $\pm$ SH).

			Zaman		P		
	Grup	n	0. saat	3. saat	Grup	Zaman	G*Z
Toplam Motilite (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	63,64 ± 6,38 ^a	44,84 ± 3,94 ^{b, B}	0,048	<0,001	0,003
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	62,49 ± 4,26 ^a	54,46 ± 3,28 ^{b, AB}			
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	66,56 ± 5,47 ^a	60,36 ± 3,03 ^{b, A}			
Progresif Motilite (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	19,32 ± 3,49 ^{a, AB}	8,22 ± 1,42 ^{b, B}	<0,001	<0,001	<0,001
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	17,38 ± 2,56 ^{a, B}	11,49 ± 1,34 ^{b, B}			
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	22,97 ± 1,29 ^{a, A}	20,23 ± 1,23 ^{b, A}			

a,b: Her bir değişken için aynı satırdaki farklı harfler istatistik açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p< 0,05).

A,B: Her bir değişken için aynı sütundaki farklı harfler istatistik açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0,05).

G: Grup. Z: Zaman. G*Z: Grup zaman etkileşimi.

Çizelge 3.3. ProAKAP4 seviyelerine göre 0. ve 3. saat spermatozoon CASA doğrusal hareket değerleri (Arit. Ort. $\pm$ SH).

			Zaman			P		
	Grup	n	0. saat	3. saat	Grup	Zaman	G*Z	
VCL (µm/s)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	117,44 ± 2,13	114,21 ± 1,49	0,149	0,193	0,759	
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	117,91 ± 2,37	117,43 ± 1,3				
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	120,61 ± 2,05	118,49 ± 1,13				
VAP (µm/s)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	76,15 ± 4,3 ^a	72,13 ± 3,81 ^b	0,328	<0,001	0,784	
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	77,88 ± 2,03 ^a	74,01 ± 1,83 ^b				
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	79,06 ± 1,76 ^a	76,34 ± 1,58 ^b				
VSL (µm/s)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	50,34 ± 3,14 ^a	46,07 ± 1,12 ^b	0,409	0,012	0,551	
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	48,98 ± 2,41 ^a	47,58 ± 2,1 ^b				
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	52,69 ± 2,09 ^a	50,09 ± 1,82 ^b				
ALH (µm)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	5,04 ± 0,35	5,40 ± 0,22	0,945	0,120	0,921	
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	5,08 ± 0,29	5,41 ± 0,19				
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	5,2 ± 0,25	5,4 ± 0,16				

a,b: Her bir değişken için aynı satırdaki farklı harfler istatistik açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0,05).

G: Grup. Z: Zaman. G*Z: Grup zaman etkileşimi.

Çizelge 3.4. ProAKAP4 seviyelerine göre 0. ve 3. saat spermatozoon CASA çizgisel ve hiperaktif hareket değerleri (Arit. Ort. $\pm$ SH).

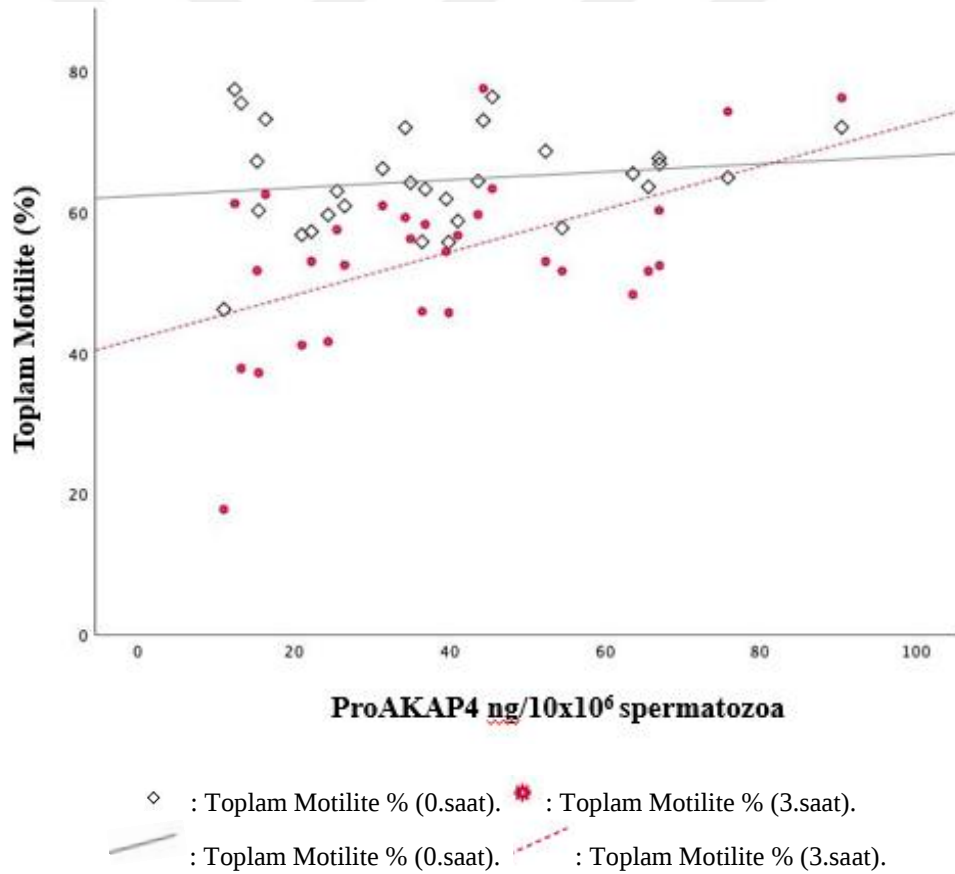
			Zaman			P		
	Grup	n	0. saat	3. saat	Grup	Zaman	G*Z	
STR (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	56,18 ± 1,33 ^a	54,60 ± 1,27 ^b	0,590	<0,001	0,282	
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	59,72 ± 1,55 ^a	53,96 ± 1,38 ^b				
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	58,83 ± 1,32 ^a	54,72 ± 1,2 ^b				
LIN (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	38,2 ± 2,16 ^a	35,69 ± 1,65 ^b	0,460	<0,001	0,347	
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	42,8 ± 2,04 ^a	35,04 ± 1,77 ^b				
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	42,25 ± 1,74 ^a	36,94 ± 1,53 ^b				
WOB (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	65,22 ± 1,63 ^a	62,95 ± 1,32 ^b	0,781	<0,001	0,440	
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	67,60 ± 1,68 ^a	62,58 ± 1,35 ^b				
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	67,47 ± 1,45 ^a	62,96 ± 1,15 ^b				
Hiperaktif (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	12,31 ± 1,17	13,51 ± 0,6	0,937	0,132	0,937	
	25ng/10x10 ⁶ s. ≤ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	12,41 ± 1,14	13,55 ± 0,7				
	proAKAP4 ≥ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	12,3 ± 0,98	13 ± 0,61				

a,b: Her bir değişken için aynı satırdaki farklı harfler istatistik açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0,001).

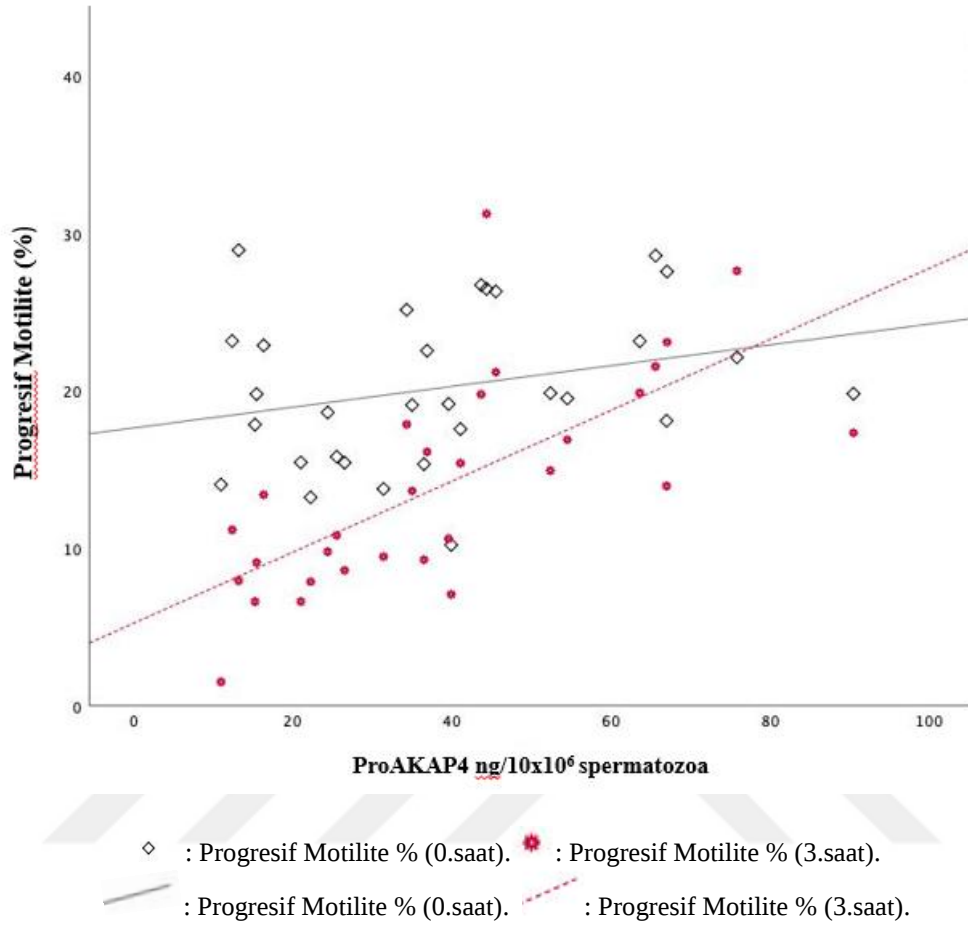
G: Grup. Z: Zaman. G*Z: Grup zaman etkileşimi.

Çalışmada sperma numunelerinin, proAKAP4 seviyesi, toplam motilite, progresif motilite, plazma membran bütünlüğü, spermatozoon yoğunluğu, normal ve anormal spermatozoon değerleri arasındaki korelasyon Çizelge 3.7’ de özetlenmiştir. Spermatozoon proAKAP4 seviyesi ile spermatozoon yoğunluğu, TM_0 , PM_0 , hasarlı akrozom, baş boyun ve plazma membran bütünlüğü arasında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki tespit edilmemiştir. ProAKAP4 seviyesi ile morfolojik açıdan hasarlı kuyruk yapısına sahip spermatozoon oranı arasında kuvvetli negatif korelasyon ($p<0,01$), TM_3 ve PM_3 değerleri arasında kuvvetli, normal spermatozoon oranı arasında orta dereceli pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($p<0,01$). Spermatozoon 0. ve 3. saat TM, PM ve proAKAP4 değerlerinin korelasyon grafiği Şekil 3.5 ve 3.6’da sunulmuştur.

Şekil 3.5. Spermatozoon 0. ve 3. saat toplam motilite ve proAKAP4 değerleri, korelasyon grafiği.



Şekil 3.6. Spermatozoon 0. ve 3. saat toplam motilite ve proAKAP4 değerleri, korelasyon grafiği.



Çalışmada sperma numunelerinin proAKAP4 seviyesi ile 0. ve 3. saat spermatozoon kinetik parametreleri (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF, hiperaktivite) arasındaki korelasyon Çizelge 3.8' de özetlenmiştir. Spermatozoon kinetik parametrelerinden VCL₃ ve VSL₃ değerleri ile proAKAP4 arasında pozitif yönlü zayıf korelasyon bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer spermatozoon kinetik parametreleri (VCL₀, VAP₀, VAP₃, VSL₀, ALH₀, ALH₃, BCF₀, BCF₃, STR₀, STR₃, LIN₀, LIN₃, WOB₀, WOB₃, Hiperaktivite₀, Hiperaktivite₃) ile proAKAP4 seviyesi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Çizelge 3.5. Spermatozoon proAKAP4 seviyesi ile spermatozoon motilite, yoğunluk ve morfolojik parametreleri arasındaki korelasyon tablosu.

	proAKAP4	S. Yoğunluğu	TM ₀	TM ₃	PM ₀	PM ₃	Normal S.	H. Akrozom	H. Baş	H. Boyun	H. Kuyruk	Host (+)	Host (-)
proAKAP4	1												
S.	0,080	1											
Yoğunluğu													
TM ₀	0,166	-0,112	1										
TM ₃	0,524**	-0,003	0,627**	1									
PM ₀	0,275	0,229	0,669**	0,306	1								
PM ₃	0,694**	0,245	0,471**	0,701**	0,683**	1							
Normal S.	0,471**	-0,164	0,276	0,696**	0,119	0,524**	1						
H. Akrozom	0,058	0,306	-0,112	-0,280	0,101	-0,005	0,014	1					
H. Baş	-0,275	0,242	-0,200	-0,433*	-0,101	-0,352	-0,246	-0,289	1				
H. Boyun	0,198	0,027	-0,167	-0,076	-0,080	0,048	-0,074	-0,301	-0,009	1			
H. Kuyruk	-0,727**	-0,090	-0,088	-0,553**	-0,128	-0,625**	-0,666**	-0,042	0,331	-0,180	1		
Host (+)	0,093	-0,322	0,306	0,439*	0,180	0,371*	0,418*	-0,302	-0,627**	-0,028	-0,096	1	
Host (-)	-0,121	0,226	-0,359	-0,480**	-0,252	-0,458*	-0,457*	0,296	0,598**	0,050	0,126	-0,974**	1

** : p<0,01, * : p<0,05, o : 0. saat, 3 : 3. saat, S. : Spermatozoa, H. : Hasarlı.

Çizelge 3.6. Spermatozoon proAKAP4 seviyesi ile spermatozoon kinetik değerleri arasındaki korelasyon tablosu.

	pAKAP4	VCL ₀	VCL ₃	VAP ₀	VAP ₃	VSL ₀	VSL ₃	ALH ₀	ALH ₃	BCF ₀	BCF ₃	STR ₀	STR ₃	LIN ₀	LIN ₃	WOB ₀	WOB ₃	Hiper ₀	Hiper ₃
pAKAP4	1																		
VCL ₀	0,100	1																	
VCL ₃	0,335*	0,135	1																
VAP ₀	0,109	0,386*	0,363*	1															
VAP ₃	0,310	0,033	0,415*	0,689**	1														
VSL ₀	0,214	0,092	0,272	0,554**	0,449*	1													
VSL ₃	0,337*	0,240	0,330	0,520**	0,556**	0,680**	1												
ALH ₀	-0,035	0,508**	0,116	-0,108	-0,224	-0,454*	-0,115	1											
ALH ₃	-0,061	-0,263	-0,039	-0,106	0,025	-0,110	-0,208	0,145	1										
BCF ₀	-0,210	-0,239	-0,075	0,164	0,069	0,395*	0,077	0,740**	-0,196	1									
BCF ₃	-0,044	0,092	0,306	0,158	0,067	0,114	0,304	0,022	-0,447*	0,013	1								
STR ₀	0,183	-0,370*	0,190	0,197	0,163	0,402*	0,038	0,569**	-0,169	0,352	0,272	1							
STR ₃	0,069	-0,101	-0,009	0,183	0,230	0,039	0,252	-0,061	-0,280	-0,141	0,554**	0,194	1						
LIN ₀	0,294	-0,283	0,277	0,309	0,335	0,617**	0,336	0,624**	-0,279	0,345	0,370*	0,908**	0,224	1					
LIN ₃	0,261	-0,015	0,089	0,217	0,326	0,333	0,582**	-0,182	0,447**	-0,046	0,568**	0,154	0,818**	0,365*	1				
WOB ₀	0,215	-0,268	0,282	0,388*	0,416*	0,625**	0,325	0,634**	-0,202	0,386*	0,311	0,834**	0,225	0,947**	0,318	1			
WOB ₃	0,131	-0,060	0,049	0,275	0,356	0,283	0,370*	-0,222	-0,393*	0,038	0,526**	0,251	0,804*	0,390*	0,867**	0,430*	1		
Hiper ₀	-0,115	0,507**	-0,022	-0,252	-0,350	-0,700**	-0,329	0,918**	0,061	0,679**	-0,008	0,621**	-0,089	-0,711	-0,261	0,716**	-0,279	1	
Hiper ₃	-0,195	-0,313	-0,043	-0,403*	-0,323	-0,476**	0,749**	0,197	0,753*	-0,215	0,422**	-0,112	-0,399*	-0,350	0,649**	-0,323	0,530**	0,261	1

** : p<0,01, * : p<0,05, Hiper.: Hiperaktif, 0: 0. saat, 3: 3. saat.

Çalışmada ortalama spermatozoon yoğunluğu $62,2 \pm 3,30 \times 10^6/\text{ml}$ belirlendi. Çözüm sonu proAKAP4 gruplarına göre spermatozoon morfolojik analizlerinde, akrozom, baş, boyun anomalileri ve spermatozoon yoğunluğu arasında, istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$). Spermatozoon proAKAP4 gruplarına göre, yapısal olarak normal spermatozoon oranı ve kuyruk anomalisi olan spermatozoon oranı arasındaki farklılıklar, istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$). ProAKAP4 gruplarına göre spermatozoon morfolojik analiz bulguları Çizelge 3.9’da özetlenmiştir.

Çizelge 3.7. Spermatozoon morfolojik analiz bulgularının proAKAP4 grupları arasında karşılaştırılması (Arit. Ort. $\pm$ SH).

	Grup	n	Ort. $\pm$ SH	P
Normal (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	64,44 $\pm$ 2,44 ^A	0,012
	25ng/10x10 ⁶ s. $\leq$ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	72 $\pm$ 1,99 ^B	
	proAKAP4 $\geq$ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	72,17 $\pm$ 1,32 ^B	
Anormal Akrozom (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	8,56 $\pm$ 1,27	0,426
	25ng/10x10 ⁶ s. $\leq$ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	7,78 $\pm$ 1,46	
	proAKAP4 $\geq$ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	10 $\pm$ 1,24	
Anormal Baş (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	6,44 $\pm$ 0,69	0,446
	25ng/10x10 ⁶ s. $\leq$ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	5,67 $\pm$ 0,65	
	proAKAP4 $\geq$ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	5,25 $\pm$ 0,57	
Anormal Boyun (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	6,89 $\pm$ 0,42	0,256
	25ng/10x10 ⁶ s. $\leq$ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	8,67 $\pm$ 0,69	
	proAKAP4 $\geq$ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	8,25 $\pm$ 0,99	
Anormal Kuyruk (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	13,11 $\pm$ 0,9 ^A	<0,001
	25ng/10x10 ⁶ s. $\leq$ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	5,89 $\pm$ 1,03 ^B	
	proAKAP4 $\geq$ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	4,33 $\pm$ 0,28 ^B	

A.B: Her bir değişken için aynı sütundaki farklı harfler istatistik açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ($p < 0,05$).

Spermatozoon HOST bulguları Çizelge 3.10'da sunulmuştur. Spermatozoon proAKAP4 grupları ile plazma membran bütünlüğü değerleri (HOST pozitif ve HOST negatif) arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 3.8. Spermatozoon HOST bulgularının proAKAP4 grupları arasında karşılaştırılması (Arit. Ort. $\pm$ SH).

	Grup	n	Ort. $\pm$ SH	P
HOST pozitif (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	44,22 $\pm$ 3,82	0,808
	25ng/10x10 ⁶ s. $\leq$ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	42,67 $\pm$ 3,92	
	proAKAP4 $\geq$ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	45,92 $\pm$ 3,12	
HOST negatif (%)	proAKAP4 < 25 ng/10x10 ⁶ spermatozoa	9	56,89 $\pm$ 3,54	0,680
	25ng/10x10 ⁶ s. $\leq$ proAKAP4 < 40ng/10x10 ⁶ s.	9	57,33 $\pm$ 3,92	
	proAKAP4 $\geq$ 40ng/10x10 ⁶ spermatozoa	12	53,25 $\pm$ 3,61	

4. TARTIŞMA

Boğa spermasının kalitesinin değerlendirilmesinde, geçmişten günümüze birçok analiz tekniği geliştirilmiştir. Fakat henüz sperma fertilitasını tek başına öngörebilen bir analiz tekniği bulunamamıştır (Kaya ve Memili, 2016). Suni tohumlama endüstrisi, boğanın ve dolayısıyla spermasının fertilita yeteneğini, kısa sürede, uygun maliyet ve yüksek doğruluk oranı ile önceden tahmin etme ihtiyacındadır (Daşkın, 2005). Ülkemizde ithal ve yerli üretim dondurulmuş boğa spermalarının kullanım izni amacıyla, Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yetkilendirilmiş laboratuvarlarda, spermanın fiziksel ve morfolojik analizleri yapılmaktadır. Son dönemde hızla gelişen proteomik teknolojisi, sperma fertilitasının değerlendirilmesinde büyük bir beklenti uyandırmaktadır (Kasimanickam ve ark., 2019). Bu çalışmanın amacı proteomik analiz tekniğini ELİZA testi ile adapte eden Bull 4MID® proAKAP4 analiz kitinin, konvansiyonel sperma analiz teknikleri ile karşılaştırarak, uygunluğunun ve standardizasyonunun araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda tespit edilen spermatozoon proAKAP4 seviyeleri ile spermatozoon motilite, progresif motilite, spermatozoon hareket parametreleri, spermatozoon yoğunluğu, anormal spermatozoon oranı ve plazma membran bütünlüğü arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır.

Spermatozoon baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç ana kısımdan oluşur. Baş kısmında akrozom ve nükleus, boyun kısmında dıştan içe doğru; plazma membranı, mitokondri, aksonem ve dış-yoğun fibriller (outer dense fibres) bulunur. Kuyruk bölgesi esas ve son kısım olmak üzere iki bölümde sınıflandırılır. Esas kısımda flagellum ve bu yapı içerisinde dıştan içe doğru; plazma membranı, yoğun fibröz kılıf, mikrotübül çiftlerinden oluşan aksonem ve dış-yoğun fibrilleri bulunur. Kuyruk esas kısmının çapı, distale doğru gittikçe incilir ve kuyruk son kısmını oluşturur. Kuyruk bölgesinin son kısmında ise; plazma membranı, dış-yoğun fibrilleri ve santral mikrotübül çifti bulunur (Pereira ve ark., 2017).

AKAP4 proteini, ilk olarak insan X kromozomunun, Xp 11.22 lokusunda bulunan gen tarafından sentezlendiği tespit edilmiş ve 82 kDa atomik kütlesinde olduğu için AKAP82 olarak ifade edilmiştir. Ancak farklı memeli türlerinde gerçekleştirilen daha sonraki çalışmalarda, farklı büyüklükte olmasına karşın yüksek oranda homolog yapıda olduğu için AKAP4 olarak isimlendirilmiştir (Luconi ve ark., 2011; Moss ve ark., 1999; Turner ve ark., 1998). Son çalışmalarda AKAP4 protein seviyesi ile sperma kalitesi arasındaki bağlantıyı araştıran birçok çalışma bulunmaktadır (Legare ve ark., 2017; Miki ve ark., 2002; Pierra ve ark., 2017; Rahamim Ben-Navi ve ark., 2016). AKAP4 proteini spermatogenezis sürecinde, oval spermatidlerin gelişimi aşamasında prokürserü olan proAKAP4 proteini ile sentezlenmektedir. Bu gerekçe ile geçmiş çalışmalarda olgun spermatozoon hücresinde AKAP4'ün bulunmasına rağmen proAKAP4'ün bulunmayacağı düşünülmektedir (Luconi ve ark., 2011). Ancak farklı hayvan türlerindeki güncel çalışmalar, olgun spermatozoon yapısında AKAP4'ün yanı sıra proAKAP4'ün de bulunduğunu belirtmektedir. Blommaert ve ark. (2019), dondurulmuş aygır sperması ile yaptıkları çalışmada AKAP4 ve proAKAP4 protein seviyelerini farklı yöntemlerle (western blotlama, ELİZA ve akış sitometrisi) tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda AKAP4 ve proAKAP4 seviyeleri arasında pozitif korelasyon olduğunu ayrıca immunofloresan ve elektron mikroskopuyla yaptıkları incelemelerde flagellum fibröz iskeletinde hem proAKAP4 hem de AKAP4'ün bulunduğunu belirtmişlerdir. Farklı hayvan türlerinde ve insan sperması ile yapılan benzer çalışmalarda olgun spermatozoon yapısında da proAKAP4 proteinin bulunduğunu ispatlar niteliktedir (Delehedde ve ark., 2018; Jumaev ve ark., 2018; Le Couazer ve ark., 2019; Teijeiro ve Marini, 2012; Xu ve ark., 2012).

Sperma kompozisyonunda fertilite ile ilişkili yaklaşık beş bin protein olduğu tahmin edilmektedir (Jodar ve ark., 2017). Bu protein moleküllerinden izole edilen ve motilite ile ilişkili olduğu tespit edilenlerden başlıcaları: BSP, ODF2, ACOT9, AKAP3, AKAP4, proAKAP4 ATP-5O, SPADH2, TEK1-1, GAPDHS, aSFP, FMP, HBP, HSP, fosfolipazlar ve interlokinlerdir. Bu proteinlerin çoğunluğu seminal plazma kökenlidir. Seminal plazma kompozisyonu birey, beslenme, sağım sıklığı gibi çeşitli dış faktörlere göre değişkenlik göstermektedir. Ayrıca kriyoprezervasyon

sürecinde spermanın kriyoprotektan ajanlarla yoğun olarak sulandırılması, dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın kalite analizlerinde seminal plazma proteinlerinin bir biyobelirteç olarak tespitini güç kılmaktadır (Byrne ve ark., 2012; Çil ve Akçay 2017; D'Amours ve ark., 2017; Kasimanickam ve ark., 2019; Peddinti ve ark., 2008). Bu sebeplerle dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın kalite analizlerinde seminal plazma proteinlerinin yerine spermatozoon yapı proteinlerinin biyobelirteç olarak kullanılmasının daha güvenilir olduğu düşünülmektedir. ProAKAP4, spermatozoon flagellum yapısının majör komponenti olması ve ELİZA yöntemi ile hızlı tespit edilebilmesi nedeniyle diğer yapı proteinlerine kıyasla biyobelirteç bir protein olarak ön plana çıkmaktadır (Delehedde ve ark., 2019; Sergeant ve ark., 2019).

Spermatozoon flagellum yapısının ritmik hareketleri, spermatozoonun motilite veya progresif motilite karakterindeki kinetik davranışında önemli rol oynar. Ancak fertilizasyon için motilite tek başına yeterli değildir (Kaya ve Memili, 2016). Bu fiziksel migrasyon rheotaksis, termotaksis, kemotaksis biyokimyasal yönlendirme mekanizmaları ve kapasitasyon, akrozom reaksiyonlarının paralelinde sürmelidir (Ömür, 2014; Suarez, 2016). İneklerde östrus süresi ort. 12 saat sürmektedir, ovulasyon ise östrus bitiminden ort. 12 saat sonra gerçekleşmektedir. Bu zaman periyotları içerisinde spermatozoon canlılığını korumak ve fertil yeteneğini kazanmak için kapasitasyon reaksiyonunu gerçekleştirmek zorundadır (Daşkın, 2005). Rekto-vaginal suni tohumlama tekniği ile korpus uteriye bırakılan spermatozoonların, önce 2,5-4cm uzunluğundaki korpus uteriye ve 20-40 cm uzunluğundaki kornu uteriye geçerek uterotubal bağlantıya ulaşması gerekmektedir. Bu süreç spermatozoon yüzme hızına göre ortalama bir saat sürmektedir (Hunter ve Wilmut, 1984; Suarez, 2016). İneklerde uterotubal bağlantı oldukça dar ve mukozal kıvrımlı yapısı ile spermatozoon geçişinde anatomik ve müköz bariyer oluşturmaktadır. Bu uterotubal bağlantının dar lümeni serviks uteri gibi filtrasyon görevini üstlenmekte morfolojik olarak anormal spermatozoon ve motilitesi düşük spermatozoonların geçişini engellemektedir. Linear motil veya progresif motil spermatozoonlar, asimetrik flagellar dalgalanma nedeniyle dairesel veya nonlinear hareket karakteri gösteren spermatozoonlara kıyasla uterotubal bağlantıdan daha

başarılı bir şekilde geçmektedir (Gaddum-Rosse, 1981; Suarez, 2016). Bu anatomik yapıyı geçerek ovidukta ulaşan spermatozoonlar, spermatozoonları yönlendiren rheotaksis, termotaksis ve kemotaksis biyokimyasal mekanizmalarının yoğun etkisinde migrasyon gösterir. İstmus tuba uterinanın mukuslu ve dar lümeni spermatozoonları yavaşlatarak epitel yüzeyine bağlanma imkanını artırır ve spermatozoonlar için rezervuar işlevi görür (Coy ve ark., 2012; Gualtieri ve Talevi 2003).

Kapasitasyon spermatozoonun, oositi tanıyabilir ve penetre olma yeteneğini yani fertil potansiyeli kazandıran fizyolojik değişikliklerdir (Liu, 2016). Plazma membran modifikasyonu ve hiperaktivasyon kapasitasyonun temel aşamalarıdır. Spermatozoon plazma mebran modifikasyonu ile membran lipid ve proteinleri yeniden düzenlenir kolesterol uzaklaştırılır. Bu modifikasyonun uyarılmasında spermatozoonların ovidukt epitel yüzeyi ile teması etkilidir (Lefebvre ve Suarez, 1996). Bu durum flagella üzerindeki katyon kanallarını (CatSper) uyarır ve hücre içi Ca^{+2} iyonu geçişini artırır. Bu hücre içi sinyalizasyon dinamiği cAMP/PKA bağımlı sinyal yolağının regülasyonunda gerçekleşir. Böylece flagellumun dalga genliği genişler ve spermatozoonların hiperaktif karakterde, kuvvetli şekilde sıvı akımına karşı yüzmesini sağlar. Bu reaksiyonlar rheotaksis mekanizmasının temelini oluşturur. Rheotaksis ampulla tube uterinadan isthmus tuba uterinaya doğru oluşan sıvı akım gradyanı içerisinde spermatozoonların yön bulmalarını sağlayan biyokimyasal mekanizmadır (Li ve Winuthayanon 2017; Miki ve Claphan, 2013; Olson ve ark., 2011). Bu nedenlerle tez çalışmada hiperaktif spermatozoon oranı açısından proAKAP4 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı düşünülmektedir.

Spermatozoonun kararlı hareket için gereksinim duyduğu yoğun enerji glikoliz ve oksidatif fosforilasyon yoluyla adenozin trifosfat (ATP) tarafından karşılanmaktadır. Plazma membran yapısının yeniden düzenlenmesi hücre içi kalsiyum seviyesini artırır. Bu durum adenozin trifosfat (ATP) hidrolizi sonucu, açığa çıkan fosfat grubunun, PKA enzimleri aracılığı ile AKAP4'e bağlanarak tirozin fosforilasyonunu uyarmakta ve hücre içi cAMP seviyesinin artışına neden olmaktadır

(Balbach ve ark., 2018; Ickowicz ve ark., 2012; Mohanarao ve Atreja 2011). Spermatozoonun hareket kabiliyeti, sitoskeleton yapı, metabolik yollar ve regülatör mekanizmalar ile biyokimyasal enerjinin mekanik enerjiye dönüştüğü kompleks bir olgudur. Hücre sinyal yollarından cAMP/PKA, AKAP4 ve prekürsör proteinin rol aldığı, spermatozoon motilitesi, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunda etkin rol oynayan bir metabolik yoldur (Balbach ve ark., 2018; Huang ve ark., 2005).

Bu araştırmada, numunelerin 37°C'de 3 saat inkübasyon periyodu sonrasında yapılan CASA analizlerinde toplam motilite ve progresif motilite değerleri ile proAKAP4 seviyeleri arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ve pozitif korelasyon tespit edildi. Bu sonuç proAKAP4'ün spermatozoon fibröz iskelet proteini olmasının yanı sıra, AKAP4'ün siklik-AMP (cAMP), protein kinaz A (PKA) bağımlı fosforilasyonda, motilitenin devamlılığı ve hücre sinyalizasyonunda görev aldığını destekler niteliktedir. Buna bağlı olarak, eksternal kalsiyum düzeylerinin regülasyonunda ve motilite hareketlerinin düzenlenmesinde AKAP4 ve proAKAP4'ün önemli rol oynadığı araştırmacılar tarafından düşünülmektedir (Delehedde ve ark., 2019; Gadella ve Luna, 2014; Luconi ve ark., 2006; Moretti ve ark., 2007; Pierra ve ark., 2017; Xu ve ark., 2012).

İsthmus tuba uterinada spermatozoonlar ovulasyon gerçekleşinceye kadar viyabilitesini korumak zorundadır. Ovulasyon zamanına yakın ampulla tuba uterinada sıcaklık artışı gerçekleşmektedir. Termotaksi yönlendirme mekanizmasına göre, yaklaşık 1°C olan bu termal gradyenti algılayan spermatozoonlar ampulla tuba uterinaya doğru yönelmektedir (Ömür, 2014). Bu çalışmada da termorezistans testi uygulanarak in vivo spermatozoon rezervuar ortam sıcaklığı, in vitro ortamda taklit edilmeye çalışılmıştır.

Kapasitasyon reaksiyonu sonrası spermatozoon ve oosit zona pellusida proteinleri arasında oluşan kemotaksis, spermatozoonu yönlendiren en etkin biyokimyasal yönlendirme mekanizmasıdır. Akrozomda bulunan proteinler ve AKAP4, tirozin kinaz aktivasyonu gösterir ve cAMP sinyal iletim mekanizmasını

uyarır. Bu sinyal iletim mekanizması zona pellusida proteinleri için reseptör görevi görür ve spermatozoonu oosite doğru yönlendirerek akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesinde rol oynar (Balbach ve ark., 2018; Wertheimer ve ark., 2013). Sperma proteinleri gibi oosit yapısındaki fertilizasyon ile ilişkili proteinler (ZP2, HSPA2, HBP vb.), spermatozoon yüzey proteinleri ile etkileşime girerek, oosit zona pellusidasının spermatozoon tarafından tanınmasını ve akrozom reaksiyonunun uyarılmasını sağlamaktadır. Sığır oositinden izole edilen ve fertilizasyon ile ilişkili olduğu düşünülen yaklaşık 1000 oosit proteini olduğu belirtilmektedir (Labas ve ark., 2018; Zachut ve ark., 2016). Oosit içerisine penetre olan spermatozoon, metabolik reseptörler aracılığıyla hücre içi kalsiyum seviyesini arttırarak, oosit aktivasyonunu tetikler (Parrish, 2014). Böylece fertilizasyonun son aşaması olan maternal ve paternal pronükleusların füzyonu ile zigot oluşumu gerçekleşir (Georgadaki ve ark., 2016).

Toplam motil ve progresif motil spermatozoon yüzdeleri, sperma kalitesinin değerlendirilmesinde önemli parametrelerdir. Toplam motil spermatozoon; bir spermatozoon popülasyonunda herhangi bir şekilde hareket kabiliyetine sahip spermatozoonların, hareketsiz spermatozoonlara oranıdır. Genel olarak spermatozoon popülasyonunun canlılığını ve fiziksel aktivitesini yansıtan bir parametredir. Ülkemizde dondurulmuş bir boğa spermasının ticaretinin yapılabilmesi için yasal olarak çözüm sonu ≥ 40 toplam motiliteye sahip olması gerekmektedir. Progresif motil spermatozoonlar (PM); toplam motil spermatozoonlar içerisindeki ileri yönde düzgün doğrusal hareket eden spermatozoonların oranıdır. Farklı çalışmalarda progresif motil boğa spermatozoon oranı ile in vitro ve in vivo fertilizasyon sonuçları arasında pozitif korelasyon olduğu belirtilmiştir (HAYGEM, 2019; Januskauskas ve ark., 2000; Kathiravan ve ark., 2011). Bu çalışmada kullanılan dondurulmuş boğa spermalarının çözüm sonu TM_0 değeri (%): $64,23 \pm 2,06$, TM_3 değeri (%): $53,22 \pm 1,93$, PM_0 değeri (%): $19,89 \pm 0,82$, PM_3 değeri (%): $13,31 \pm 0,78$ olarak elde edilmiştir.

Farklı memeli türlerinde proAKAP4 seviyesi ile toplam motilite ve progresif motilite değerleri arasında pozitif korelasyon olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır. Jumaev ve ark. (2018), seminal plazmadan ayrıştırılan insan spermasının, SDS-PAGE ve protein immüno blot yöntemiyle tespit edilen proAKAP4 seviyesi ile spermatozoon motilitesi arasında pozitif korelasyon olduğunu belirtmiştir. Tez çalışmasında kullanılan ELİZA tekniği ile köpek, aygır ve boğa dondurulmuş-çözdürülmüş spermalarından tespit edilen proAKAP4 seviyeleri ile 0. saatte uygulanan CASA analizlerinde, toplam motilite, progresif motilite ve BCF, LIN, VCL, VSL değerleri arasında pozitif korelasyon olduğu belirtilmiştir (Blommaert ve ark. 2019; Le Couazer ve ark., 2019; Ruelle ve ark., 2020). CASA sonuçlarına ek olarak Ruelle ve ark. (2020), tespit ettikleri korelasyonu, yaklaşık 200 bin suni tohumlama uygulamasının başarı oranları ile ilişkili olduğunu belirtmiş ve hipotezlerini desteklemişlerdir. Belirtilen çalışmalardan farklı olarak, bu çalışmada dondurulmuş-çözdürülmüş (0. saat) boğa spermalarının toplam motilite (TM₀) ve kinetik değerleri ile proAKAP4 grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamsız bulundu. Bu durumun boğa sperma sulandırıcılarında bulunan kimyasalların, spermatozoon hareket kabiliyetinde çözüm sonu oluşan kriyohasarı, kısa süre kompanse edebileceği ile ilişkilendirilmektedir (Amann ve Waberski, 2014; Bilodeau ve ark., 2001; Ntemka ve ark., 2016; Monterroso ve ark., 1995; Thomas ve ark., 1998). Bu düşünceye paralel olarak, benzer ilişki farklı sıcaklık ve süre (37°C - 40sn, 50°C - 15sn, 70°C - 5sn) kalibrasyonlarında çözdürülen boğa sperması çalışmalarında da görülmüştür. Bu çalışmaların neticesinde, spermatozoon motilite ve kinetik değerleri açısından önemli bir farklılık olmamasına rağmen, plazma membran ve akrozom bütünlüğü açısından istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirtilmiştir (Muino ve ark., 2008; Nur ve ark., 2003). Benzer sonuçlar Monterroso ve ark. (1995), yaptığı çalışmada da belirtilmektedir. Farklı sıcaklıklarda (39°C, 42°C, 43°C) inkübasyona bırakılan spermaların 1. saat analizlerinde motilite açısından belirgin farklılık görülmemesine rağmen 3. saat analizlerinde istatistiksel açıdan önemli farklılıklar gözlemlenmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, spermatozoon proAKAP4 seviyesi ile TM₃ ve PM₃ değerleri arasında kuvvetli pozitif korelasyon, VAP₃ ve VSL₃ değerleri

arasında zayıf pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu değerler dışındaki spermatozoon CASA kinetik parametreleri ile proAKAP4 seviyesi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ancak spermatozoonların 0. saatte ve 37°C'de 3 saat inkübasyon sonrası elde edilen ortalama ölçümlerinden, bazı CASA kinetik parametrelerine (TM, PM, VAP, LIN, STR, WOB, VSL, BCF) zamanın etkisi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Elde edilen değerler Malama ve ark. (2017) ve Ntemka ve ark. (2016) çalışmalarıyla benzerlik göstermiştir. Bu durumun zamana bağlı olarak in vitro ortamda spermatozoonun enerji rezervlerinin tüketimine ve artan reaktif oksijen türlerine (ROS) bağlı olarak, spermatozoonların kararlı hareketinin azalması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Bacinoğlu ve ark., 2008; Gürler ve ark., 2016; Ntemka ve ark., 2016).

Tez çalışmasında, spermatozoon proAKAP4 seviyesi en yüksek 90,44 ng/10⁶ spermatozoa, en düşük 10,98 ng/10⁶ spermatozoa, ortalama 38,92±20,71 ng/10⁶ spermatozoa bulundu ve spermatozoa yoğunluğu ile proAKAP4 seviyesi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı. Elde edilen proAKAP4 değerleri, Le Couzer ve ark. (2019) köpeklerde, Blommaert ve ark. (2019) aygırlarda ve Ruelle ve ark. (2019)'nın elde ettiği sonuçlarla paralellik göstermektedir. Ruelle ve ark. (2019), Holstein ırkı boğalarda yaptıkları çalışmada, proAKAP4 eşik değerini 25 ng/10⁶ spermatozoa olarak belirlemişlerdir. Bu değer altındaki sperma numuneleri CASA (TM, BCF, LIN) ve saha ST verileri ile istatistiksel açıdan ilişkili olarak düşük kaliteli, proAKAP4 seviyesi 25-60 ng/10⁶ spermatozoa olan sperma numuneleri ise yüksek kaliteli olarak sınıflandırılmıştır. Bu araştırmacının verilerine göre bu araştırmada kullanılan dondurulmuş boğa spermaları, ort. 38,92±20,71 proAKAP4 değeri ile yüksek kaliteli sperma sınıfına girmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında Simental ırkı boğalara ait dondurulmuş sperma numuneleri kullanıldı ve proAKAP4 seviyelerine göre 3 grupta sınıflandırıldı. En iyi CASA ve morfolojik değerler III. (90-40 ng/10⁶ spermatozoa) ve II. gruptaki (25-40 ng/10⁶ spermatozoa) sperma numunelerinden elde edildi, proAKAP4 seviyesi 25 ng/10⁶ spermatozoa altında olan sperma numunelerinin 3 saat inkübasyon sonunda TM₃ ve PM₃ değerlerinin belirgin düzeyde düşük olduğu

gözlemlendi. Çalışmada elde edilen verilerin daha önceki çalışmalardan elde edilen verilere göre farklı olması, analiz amacıyla kullanılan boğa spermalarının farklı ırktan olması, bireysel biyolojik farklılıkların bulunması ve dondurma protokolündeki farklılıklarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Spermatozoon morfolojik analizleri dikkate alındığında anormal akrozom, baş ve boyuna sahip spermatozoon oranı ile proAKAP4 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. Spermatozoon flagellum yapısı mitokondri organelinin bulunduğu boyun kısmının annulus kısmından başlayarak kuyruk esas kısmının büyük bir bölümünü oluşturur. Falegellum aksonem adı verilen, silindir şeklinde 9 çift tubulin A ve B mikrotübüllerinin, merkezdeki mikrotübül çiftine sıkıca bağlandığı bir organizasyondur. AKAP4 proteini bu mikrotübül çiftleri saran fibröz kılıfın majör proteinidir (Moretti, 2007). Miki ve ark. (2002), farelerde AKAP4 gen defektinin, spermatozoon kuyruk hasarına ve kararsız motiliteye neden olduğunu yaptıkları çalışma ile ispatlamışlardır. Benzer ilişki, insan sperması ile yapılan çalışmalarda da görülmüştür (Baccetti ve ark., 2005; Mbango ve ark., 2019; Miki ve ark., 2002). Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlar, anormal kuyruğa sahip spermatozoon oranı ile proAKAP4 miktarı arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada, spermatozoon anormal kuyruk oranı ile proAKAP4 seviyesi arasında kuvvetli negatif korelasyon tespit edilmiştir. Ayrıca en yüksek anormal kuyruk oranı, grup I 'deki sperma numunelerinde tespit edilmiştir. Bu durum, AKAP4 proteini gibi proAKAP4 proteinin de kuyruk esas kısmında bulunan, flagellum ve onun fibröz iskeletinin yapı proteini olduğunu destekler niteliktedir (Blomaert ve ark., 2019; Jumeau ve ark., 2018).

Araştırmada, spermatozoon plazma membran bütünlüğü de değerlendirilen parametreler arasındadır ve elde edilen sonuçlara göre spermatozoon plazma membran bütünlüğü ile proAKAP4 seviyesi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Yarı geçirgen özellikteki spermatozoon plazma membranı ve bu membranın bütünlüğü, spermatozoon yaşam yeteneği ve fonksiyonları için oldukça önemlidir. Dondurma işlemleri sürecinde, spermatozoon çeşitli sıcaklık, pH ve ozmolarite farklılıklarına maruz kalır. Düşük sıcaklığın etkisiyle plazma

membranında, yoğun olarak bulunan fosfolipit, protein ve yağ molekülleri kendi aralarında sıkı bir bağ oluşturmaya çalışır. Hücre dışında oluşan buz kristalleri hiper ozmotik bir ortam oluşturur, bu esnada membran makro molekülleri sayesinde hücre içi su geçişi ve hücre küçülmesi gerçekleşir. Bu nedenle dondurma ve çözündürme süreçleri uygun hız ve sıcaklıklarda gerçekleşmelidir. Aksi halde, buz kristalleri tıpkı cam parçaları gibi spermatozoon plazma membranında kriyo-hasara neden olmakta ve fertil yeteneğini olumsuz etkilemektedir (Ak ve ark., 2017; Tırpan 2012). Nitekim bazı plazma membran proteinleri glikoz, fruktoz, iyonlar ve bazı çözünebilen maddelerin geçişine izin vererek, spermatozoonun motilite, kemotaksis ve kapasitasyon reaksiyonlarında önemli rol oynar. Kasımanicman ve ark. (2017), boğalarda, plazma membran integral proteini olan AQP (akuaporin) mRNA seviyesi ile spermatozoon plazma membran bütünlüğü arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Tez çalışmasında, spermatozoon plazma membran bütünlüğü ile proAKAP4 arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamasının ve güncel literatür çalışmalarında böyle bir korelasyona rastlanılmamasının, proAKAP4'ün membran yapı protein olmamasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmada plazma membran bütünlüğü ile TM₃, PM₃, STR₃, BCF₃, LIN₃ kinetik değerleri ve morfolojik olarak normal spermatozoon arasında pozitif korelasyon, baş anomolisi olan spermatozoon oranı ile negatif korelasyon tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Brito ve ark. (2003), Correa ve ark. (1997), Lodhi ve ark. (2008), Padrik ve ark. (2012) ve Zubair ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

ProAKAP4 ve AKAP4'ün spermatozoon fertilitesindeki rolü tartışmasız önemli olsa da, kompleks reaksiyonlar zinciri olan fertilizasyon tek bir makro molekül tarafından düzenlenmediği gibi tek bir protein analizi ile spermatozoon fertilitisini belirlemek de objektif değildir. Mevcut ileri değerlendirme teknikleri içerisinde en detaylı olarak CASA ile analiz edilen motilite 100-1000 spermatozoon popülasyonundan değerlendirme yapmaktadır. Bu analiz yönteminde motilite analizleri, sadece spermatozoonların video fragmanlarının bir yazılım yardımıyla değerlendirilmesi sonrasında gerçekleştirdiği, fiziksel migrasyonu belirtmektedir. Bu analiz sonuçları kullanılan sperma sulandırıcısına, analiz cihazına, ortam sıcaklığına

hatta lam ve lamelleden bile etkilenebilir (Mortimer, 1997). ProAKAP4 ELİZA kiti, spermatozoon motilite potansiyelini, spermatozoon yapı ve cAMP/PKA bağımlı sinyal iletim mekanizmasının regülatör proteini olan proAKAP4'ü moleküler düzeyde tespit ederek belirlemeyi hedeflemektedir. Bu yöntem sayesinde 100.000 spermatozoon popülasyonunun proAKAP4 moleküler analizi yapılmakta ve in vivo motilite prognozu için güvenilir bir biyobelirteç olduğu düşünülmektedir (Sergeant ve ark., 2019). Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre proAKAP4 analizi tek başına bir spermatolojik değerlendirme kriteri değildir. Ancak elde edilen sonuçlar proAKAP4 analizinin, önemli bir spermatolojik parametre olan spermatozoon motilitesinin diyagnoz ve prognozunda etkin bir biyobelirteç protein olduğunu göstermektedir. Bu proAKAP4 moleküler analiz yöntemi sayesinde, sadece kinetik değerlendirme yapan ve dış etkenlere bağlı (sperma sulandırıcısı, ortam sıcaklığı vb.) farklılık gösterebilen CASA analizlerinin ve uzun zaman alan termorezistans testlerinin yerine daha objektif bir spermatolojik kalite göstergesi olduğu düşünülmektedir.

Gelişen analiz teknikleri ve kurulan farklı hipotezler ile sadece toplam ya da progresif motilitenin önümüzdeki yıllarda fertilite belirteci olarak kullanılması olası görülmemektedir. Bu sebeple farklı disiplinlerden köken alan proteomik gibi epigenomik, transkriptomik ve metabolomik analizlerinin, boğa spermasının kalitesinin ve fertil yeteneğinin öngörülmesinde, kullanımının araştırılması ve entegrasyonunun sağlanması önem kazanmaktadır (Feugang ve ark., 2010; Jodar ve ark., 2017; Kaya ve Memili, 2016). Standardizasyonu sağlanan ileri teknoloji spermatozoon analiz teknikleri sayesinde, gelecekte ideal dondurulabilir boğa spermalarının tespiti veya infertilite olgularının patogenezisinde, moleküler analizlerin dondurulmuş sperma endüstrisi için rehber ve sperma kalite analizlerinde daha güvenilir referans olacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; proAKAP4 gruplarına göre sperma numunelerinin 0. saatte uygulanan CASA analizlerinde PM₀ değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı olmasına rağmen TM₀, ve kinetik değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık bulunmamıştır. Ayrıca 3. saatte uygulanan CASA analizlerinde, proAKAP4 seviyesi 25 ng/10⁶ spermatozoa ve üstü olan sperma numunelerinin (grup II ve III) TM₃ ve PM₃ hareket kabiliyetlerini daha iyi koruduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra spermatozoon proAKAP4 seviyesi ile kuyruk anomalisi olan spermatozoon oranı arasında negatif korelasyon, TM₃, PM₃, VAP₃ ve VSL₃ kinetik değerleri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Sonuç olarak, yeni ve sınırlı literatür bilgisi olan 4MID[®] proAKAP4 analiz kiti, dondurulmuş-çözdürülmüş boğa sperması kalitesinin değerlendirilmesi amacıyla ülkemizde ilk kez kullanılmış ve konvansiyonel analiz teknikleri ile standardizasyonu araştırılmıştır.

Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler proAKAP4 seviyesinin spermatozoon motilite prognozunda belirleyici ve kuyruğa bağlı anomalilerin tespitinde biyobelirteç bir protein olduğu yönündedir. Ancak bu analiz tekniğinin farklı sığır ırklarında ve farklı boğa spermaları için kriyoprotektan olarak kullanılan, her baz sulandırıcı için standardizasyon çalışmalarının yapılması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca sperma numunelerinin, ileri teknoloji spermatozoon analizlerine ek olarak, ovidukt sıvısında, servikal mukusta veya mezbaha uterus materyallerinde spermatozoon migrasyon analizlerinin yapılmasının, objektif kantitatif veriler sunacağı ve böylece söz konusu çalışmaların, proAKAP4 analiz kitinin androloji laboratuvarlarında yaygınlaşması için referans olacağı düşünülmektedir. Aynı amaçla farklı CASA cihazlarına ait kalibrasyonların, proAKAP4 analiz standardizasyonlarında kullanımı yararlı olabilecektir.

Tez çalışmasında cinsiyeti belirlenmemiş Simental ırkı dondurulmuş boğa sperması kullanılmıştır. Özellikle reproduktif başarı oranı cinsiyeti belirlenmemiş

boğa spermasına göre daha düşük olan cinsiyeti belirlenmiş boğa spermalarında veya östrus süresi sığırlara göre oldukça uzun olan manda spermalarında bu ileri analiz tekniğinin uygulanması ve rutin analiz prosedürlerine eklenmesinin, işletme reproduktif performanslarına olumlu katkı sağlayacağı dikkate alınmalıdır.

Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, farklı sığır ve manda ırklarına ait dondurulmuş spermaların konvansiyonel ve ileri teknoloji analiz yöntemi olan proAKAP4 seviyesi ile ilişkisinin belirlenmesinin, bu ilişkiyi fertilite sonuçları ile desteklenen çalışmaların yürütülmesinin, 4MID® proAKAP4 analiz kitinin standardizasyonuna önemli referans olacağı düşünülmektedir.



ÖZET

Dondurulmuş Boğa Sperması Kalitesinin ProAKAP4 Protein Seviye Testi ile Değerlendirilmesi

Dondurulmuş boğa spermasının suni tohumlama metoduyla kullanımı, hayvan ıslahı amacıyla kullanılan en yaygın biyoteknolojik uygulamadır. Bu uygulamanın başarılı olması ve olası ekonomik kayıpların önlenmesi için dondurulmuş boğa spermalarının, kullanım izni için uygulanan spermatolojik analizler büyük önem arz etmektedir. Bu spermatolojik analizlerin, güncel teknolojinin paralelinde geliştirilen, ileri teknoloji analiz teknikleri ile daha objektif, güvenilir ve daha pratik uygulanmasına yönelik çalışmalar her geçen gün devam etmektedir. Bu çalışmada ileri teknoloji analiz tekniklerinden biri olan proAKAP4 protein seviye testi ile dondurulmuş boğa sperması kalitesi değerlendirilmiştir. Çalışmada 6 baş Simental ırkı boğaya ait 30 farklı üretim tarihli 0,25 ml payetler içerisindeki, dondurulmuş boğa spermaları kullanılmıştır (n=30). Dondurulmuş boğa spermalarını çözüm sonu, proAKAP4 protein seviyeleri, anormal spermatozoon oranı, plazma membran bütünlüğü, spermatozoon yoğunluğu, 0. saat ve 3 saat inkübasyon periyodu sonrası toplam motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket özellikleri açısından analiz edilmiştir. Yapılan proAKAP4 ELİZA testi sonucunda dondurulmuş sperma numuneleri, proAKAP4 seviyelerine göre üç grup altında (grup I: proAKAP4<25ng/10x10⁶ spermatozoa, grup II: 25ng/10x10⁶ spermatozoa≤ proAKAP4<40 ng/10x10⁶ spermatozoa, grupIII: proAKAP4≥40 ng/10x10⁶) değerlendirildi. ProAKAP4 seviyeleri ile 3 saat termorezistans testi sonrasında elde edilen toplam motilite, progresif motilite, VSL₃, VAP₃ değerleri arasında pozitif korelasyon bulundu (p<0,05). Spermatozoon anormal kuyruk oranı ile proAKAP4 seviyesi arasında negatif korelasyon tespit edildi (p<0,01). Ayrıca, proAKAP4 konsantrasyonu 25 ng / 10⁶ spermatozoa ve üzeri olan sperma örneklerinin (grup II ve III) TM₃ ve PM₃ hareket karakterlerini daha iyi korudukları bulunmuştur. Spermatozoon plazma membran bütünlüğü, yoğunluğu, kinetik parametreleri, 0. saat toplam motilite ve progresif motilite değerleri ile spermatozoon proAKAP4 seviyesi arasında, istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamadı (p>0,05). Sonuç olarak, çözüm sonu boğa spermasının hareket yeteneğinin değerlendirilmesinde, proAKAP4 moleküler analiz yönteminin, spermatozoon toplam motilitesinin ve progresif motilitesinin diyagnozu ve prognozunda, CASA analizlerinin ve uzun zaman alan termorezistans testlerinin yerine daha objektif ve pratik bir sperma kalite analiz yöntemi olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Boğa, İleri teknoloji sperma analiz teknikleri, Proteomiks, Sperma proteinleri.

SUMMARY

Evaluation of Frozen Bull Sperm Quality with ProAKAP4 Protein Concentration Test

Using frozen bull semen on artificial insemination (AI) is the most common biotechnological method that used for animal breeding in the world. Spermatological analyzes that applied for the usage permit of frozen bull semen have great importance for this application to be successful and to prevent possible economic losses. The studies for the implementation of these spermatological analyzes continue in parallel with the latest technology and advanced technology techniques for being more advanced, reliable and practical every day. In this study, frozen bull sperm quality was evaluated with proAKAP4 concentration test, which is one of the advanced technology analysis techniques. Frozen bull semen in 0.25 ml straws with 30 different production dates belonging to six Simmental AI bulls were used (n=30). Samples were analyzed for the proAKAP4 concentration, abnormal sperm ratio, plasma membrane integrity, sperm concentration at after thawing (0h), total motility, progressive motility and sperm motion characteristics at 0h and after 3 hours of incubation (thermoresistance test) at 37°C. According to the results, samples were evaluated under three groups linked in to proAKAP4 concentration (group I: proAKAP4 <25ng / 10x10⁶ sperm, group II: 25ng / 10x10⁶ sperm ≤ proAKAP4 <40 ng / 10x10⁶ sperm, groupIII: proAKAP4 ≥40 ng / 10x10⁶). A positive correlation was found between ProAKAP4 concentration and total motility, progressive motility, VSL₃, VAP₃ values obtained after 3 hours thermoiresistance test (p <0.05). A negative correlation was found between sperm abnormal tail rate and proAKAP4 concentration (p <0.01). In addition, sperm samples (groups II and III) with proAKAP4 concentrations of 25 ng / 10⁶ spermatozoa and above were found to better retain TM₃ and PM₃ movement characteristics. There was no statistically significant relationship between sperm plasma membrane integrity, concentration, sperm kinetic parameters, 0h total and progressive motility values and sperm proAKAP4 concentration (p> 0.05). As a result of this study, proAKAP4 molecular analysis can be considered more objective and practical on diagnosis and prognosis of sperm total and progressive motility, instead of CASA analysis and long-time thermoiresistance tests in the bull semen movement evaluation.

Keywords: Advanced sperm analyses techniques, Bull, Proteomics, Sperm proteins,

KAYNAKLAR

- AK K, CİRİT Ü, SANDAL Aİ, ARICI R, ÖZMEN MF (2017). Dondurulmuş spermanın depolanması ve kullanımında saha koşullarında yapılan hatalı uygulamalar ve çözüm önerileri. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin Special Topics*, **3(1)**: 44-59.
- AKAL E, SELÇUK M, DEMİRCİ E (2017). Epididimal boğa spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların etkisi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **88(2)**: 68-81.
- AKSOY A, YAVUZ F (2011). Büyükbaş hayvan üreticilerinin suni tohumlama yaptırma kararlarını belirleyiciler üzerine bir analiz: Doğu Anadolu bölgesi örneği. *Atatürk Ü. İİBF Dergisi*, 10. *Ekonometri ve İstatistik Sempozyumu Özel Sayısı*, 33-41.
- ALEMDAR H, (2018). Ankara tekesi spermasının nanopürifiye edilerek dondurulması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- AMANN R P (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of andrology*, **10(2)**: 89-98.
- AMANN RP, WABERSKI D (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, **81(1)**: 5-17.
- ANONİM (1972). Tarım Bakanlığı, Islahı Hayvanat Komisyonu Başkanlığı. Karar esas defteri. Karar tarihi: 21.07.1972, karar no: 12.
- ANONİM (2016). Kaliteli besi materyali üretimi ve jersey ırkı geliştirilmesi projesi. Erişim adresi: <https://mardin.tarimorman.gov.tr/Duyuru/125/Kaliteli-Besi-Materyali-Uretimi-Projesi-Kapsaminda-Ilimizde-Uygulanan-Proje-Dahilinde-Yapilacak-Olan-Tohumlama-Basina-Alinacak-Ucret-Belli-Oldu>. Erişim tarihi: 19.01.2020.
- ANONİM (2019). Buzağı kayıplarının önlenmesi projesi. Erişim adresi: <https://www.haberler.com/buzagi-kayıplarına-karsi-ultrason-ve-suni-12588121-haberi/> Erişim tarihi: 19.01.2020.
- ARCELAY E, SALICIONI AM, WERTHEIMER E, VISCONTI PE (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 463–472.
- ASHRAFZADEH A, KARSANI SA, NATHAN S (2013). Mammalian sperm fertility related proteins. *International journal of medical sciences*, **10(12)**: 1649.
- ATA A, ATA N (2005). 1995- 2004 yılları burdur ili hayvancılığının ve sığırlarda suni tohumlama uygulamalarının değerlendirilmesi. 1. Burdur Sempozyumu 16-19 Kasım, Burdur.

- AUL RB, OKO RJ (2001). The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Developmental biology*, **239**(2): 376-387.
- AYTEKİN Ö (2011). Saha Şartlarında Gerçekleştirilen Suni Tohumlama Uygulamalarının Retrospektif Analizi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **(2)**: 44-49.
- BACCETTI B, COLLODEL G, GAMBERA L, MORETTI E, SERAFINI F, PIOMBONI P (2005). Fluorescence in situ hybridization and molecular studies in infertile men with dysplasia of the fibrous sheath. *Fertility and sterility*, **84**(1): 123-129.
- BACINOĞLU S, TAŞ M, CİRİT Ü, ÖZDAŞ ÖB, AK K (2008). The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Animal reproduction science*, **104**(1): 38-46.
- BAKER MA, AITKEN RJ (2009). Proteomic insights into spermatozoa: critiques, comments and concerns. *Expert review of proteomics*, **6**(6): 691-705.
- BALBACH M, BECKERT V, HANSEN JN, WACHTEN D (2018). Shedding light on the role of cAMP in mammalian sperm physiology. *Molecular and cellular endocrinology*, **468**: 111-120.
- BAYDEMİR T (2019). Üç boyutlu baskı teknolojisi ile medikal testler daha ulaşılabilir. *Bilim ve Teknik Dergisi*, **621**: 38-41.
- BAYRAM HL, CLAYDON AJ, BROWNRIDGE PJ, HURST JL, MILEHAM A, STOCKLEY P, HAMMOND DE (2016). Cross-species proteomics in analysis of mammalian sperm proteins. *Journal of proteomics*, **135**: 38-50.
- BILODEAU JF, BLANCHETTE S, GAGNON C, SIRARD MA (2001). Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, **56**(2): 275-286.
- BLOMMAERT D, SERGEANT N, DELEHEDDE M, FRANCK T, LEJEUNE JP, SERTEYN D (2018). Significant correlation between the proAKAP4 concentration and the total and progressive motility in stallion sperm after thawing. *Journal of Equine Veterinary Science*, **66**: 43.
- BLOMMAERT D, SERGEANT N, DELEHEDDE M, JOUY N, MITCHELL V, FRANCK T, SERTEYN D (2019). Expression, localization, and concentration of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa. *Theriogenology*, **131**: 52-60.
- BORNSTEIN C, BROSH R, MOLCHADSKY A, MADAR S, KOGAN-SAKIN I, GOLDSTEIN I, ROTTER V (2011). SPATA18, a spermatogenesis-associated gene, is

a novel transcriptional target of p53 and p63. *Molecular and cellular biology*, **31(8)**: 1679-1689.

BÜYÜKLEBLEBİCİ S (2012). Farklı sulandırıcılar ile dondurulan boğa spermasında in vitro ve in vivo değerlendirmeler. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.

BYRNE K, LEAHY T, MCCULLOCH R, COLGRAVE ML, HOLLAND MK (2012). Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics*, **12**: 23-24, 3559-3579.

CARRELL DT, ASTON KI, OLIVA R, EMERY BR, DE JONGE CJ (2016). The “omics” of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach. *Cell and tissue research*, **363(1)**: 295-312.

CASTELLINI C, DALBOSCO A, RUGGERİ S, COLLODEL G (2011). What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertil Steril* **96**: 24-27.

CİRİT Ü, ÖZMEN MF, AK K (2017). Suni tohumlamanın başarısını etkileyen faktörler, sahada tohumlama uygulamalarında sıkça yapılan hatalar ve çözüm önerileri. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin Special Topics*, **3(1)**: 30-43.

COMHAIRE FH, HUYSSSE S, HINTING A, VERMEULEN L, SCHOOJANS F (1992). Objective sperma analysis: Has the target been reached? *Hum Reprod*, **7**: 237-241

CORREA JR, PACE MM, ZAVOS PM (1997). Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, **48(5)**: 721-731.

COY P, GARCIA-VÁZQUEZ FA, VISCONTI PE, AVILÉS M (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction (Cambridge, England)*, **144(6)**: 649.

ÇİL B, AKÇAY E (2017). Boğalarda Seminal Plazma Proteinlerinin Fertilité ve Kriyoprezervasyon Açısından Önemi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **57(2)**: 118-126.

ÇOLAK M, JAVORKA L (2017). Cumhuriyetin Kuruluş Yıllarında Türkiye’de Hayvancılık Politikası ve Bir Macar Uzmanı Oszkar Wellman. 1. Baskı. Bölüm 2.

D’AMOURS O, FRENETTE G, BOURASSA S, CALVO E, BLONDİN P, SULLIVAN R (2017). Proteomic markers of functional sperm population in bovines: Comparison of low-and high-density spermatozoa following cryopreservation. *Journal of proteome research*, **17(1)**: 177-188.

DAŞKIN A (2005). İneklerde Uygulamalı Suni Tohumlama. 1. Baskı. Bölüm 3-5. Aydan yayınevi.

- DAŞKIN A (2011). Sığırcılık İşletmelerinde Reprodüksiyon Yönetimi ve Suni Tohumlama. 2. Baskı. Bölüm 1. Aydan yayınevi.
- DAVID G, SEVERS S, JOUANNET P (1981). Kinematic of human spermatozoa. *Gamete Res*, **4**: 83-86.
- DAVIS RO, GRAVANCE CG (1993). Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil Steril*, **59**: 412-417.
- DELEHEDDE M, BLOOMAERT D, JOUY N, SCABELLO J, MIERSMAN H, FRANCK T, SERGEANT N (2018). Concentration of proAKAP4 as a pertinent read-out of sperm quality in mammals. *Animal Reproduction Science*, **194**: 24.
- DELEHEDDE M, CARRACEDO S, SELLESLAGH M (2019). ProAKAP4 polypeptide as a biomarker of sperm functionality and male fertility disorders. *Int J Gynecol and Reprod Sci*, **2(1)**: 13-19.
- DEMİR P, ARAL Y, SARIÖZKAN S (2014). Kars ili süt sığırcılık işletmelerinin sosyo-ekonomik yapısı ve üretim maliyetleri. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **25(1)**: 1-6.
- DOĞAN S, VARCOVIC P, DE OLIVEIRA R, BELSER LE, KAYA A, MOURA A, MEMİLİ E (2015). Sperm chromatin structure reflects fertility phenotypes in breeding bulls. *J. Biol. Reprod*, **92**: 92-106.
- EHRENWALD E, FOOTE RH, PARKS JE (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev*. **25**: 195–204.
- ENGİNLER SÖ, ÖZDAŞ ÖB (2016). Cinsiyeti belirlenmiş yavru üretiminin ekonomiye katkısı. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin Special Topics*, **2(2)**: 9-14.
- EVİRGEN SE (2009). Aydın ilinde yaygın olarak kullanılan siyah alaca boğaların değerlendirilmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- FANNY J, JULIEN S, FRANCISCO-JOSE F-G, SABIHA E, SOPHIE D-D, LUC B, VALÉRIE M (2018). Gel electrophoresis of human sperm: a simple method for evaluating sperm protein quality. *Basic and clinical andrology*, **28**: 10.
- FARRELL PB, PRESICCE GA, BROCKETT C, FOOTE RH (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, **49(4)**: 871-879.
- FERNANDEZ-FUERTES B, NARCIANDI F, O'FARRELLY C, KELLY AK, FAIR S, MEADE KG, LONERGAN P (2016). Cauda epididymis-specific beta-defensin 126 promotes sperm motility but not fertilizing ability in cattle. *Biology of reproduction*, **95(6)**: 122.

- FEUGANG JM, RODRÍGUEZ-OSORIO N, KAYA A, WANG H, PAGE G, OSTERMEIER GC, MEMİLİ E (2010). Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. *Reproductive biomedicine online*, **21(3)**: 312-324.
- FICARRO S, CHERTIHIN O, WESTBROOK VA, WHITE F, JAYES F, KALAB P, VISCONTI PE (2003). Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *The Journal of biological chemistry*, **278(13)**: 11579–89.
- GADDUM- ROSSE P (1981). Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *American Journal of Anatomy*, **160(3)**: 333-341.
- GADELLA BM, LUNA C (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, **81(1)**: 74-84.
- GALLARDO BOLANOS JM, MIRÓ MORÁN Á, BALAO DA SILVA CM, MORILLO RODRIGUEZ A, PLAZA DÁVILA M (2012). Autophagy and Apoptosis Have a Role in the Survival or Death of Stallion Spermatozoa during Conservation in Refrigeration. *Plos One*, **7(1)**: e30688.
- GENÇ SV (2011). Demokrat Parti dönemi hayvancılık politikaları ve veteriner hekimliği hizmetleri. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- GENÇ SV, ÖZGÜR A (2017). Demokrat Parti dönemi hayvancılık politikaları ve veteriner hekimliği hizmetleri. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **88(2)**: 38-50.
- GEORGADAKI K, KHOURY N, SPANDIDOS DA, ZOUMPOURLIS V (2016). The molecular basis of fertilization. *International journal of molecular medicine*, **38(4)**: 979-986.
- GILLIAN L, EVANS G, MAXWELL WMC (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, **63(2)**: 445-457.
- GINSBURG KA, ARMANT DR (1990). The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measurements obtained by manual and videomicrographic analysis. *Fertil Steril*, **53**: 882-887.
- GITLITS VM, TOH BH, LOVELAND KL, SENTRY JW (2000). The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. *Eur. J. Cell Biol.* **79**: 104–111.
- GLORIA A, WEGHER L, CARLUCCIO A, VALORZ C, ROBBE D, CONTRI (2018). Factors affecting staining to discriminate between bull sperm with greater and lesser mitochondrial membrane potential. *Anim Reprod Sci.* **189**: 51–59.

- GÖKÇEN H (2015). Türkiye’de suni tohumlamanın tarihsel gelişim süreci. Erişim Adresi: <http://www.hazimgokcen.net/mesleki-tarih/turkiyede-suni-tohumlamanin-tarihsel-gelisim-sureci/>. Erişim Tarihi: 30.08.2019.
- GÖKÇEN H (2020). Süt Sığırcılığında Sürü Yönetim İlkeleri. Bölüm 6. Erişim adresi: <http://online.fliphtml5.com/kxfdj/jvxx/?fbclid=IwAR07OJ4vJAWN8sgp1vG4R4S63P7XQPvrlvhMZmDfEQcOe6K80APELSe6lO0>. Erişim tarihi: 11.01.2020.
- GUALTIERI R, TALEVI R (2003). Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction-Cambridge-*, **125(2)**: 251-258.
- GÜL RTB (2004). Türkiye’de iki dünya savaşı arasında veteriner hekimliği hizmetleri ve hayvancılık politikaları üzerine araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Osmanlı Tarihi Araştırma ve Uygulama Merkezi Dergisi* **15(15)**: 227-255.
- GÜRLER H, MALAMA E, HEPPELMANN M, CALİSİCİ O, LEIDING C, KASTELIC JP, BOLLWEIN H (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, **86(2)**: 562-571.
- HABİB A, SHOJAEİ S, EVINE V R, ALYSHA L, GAYATHRI D, KASTELIC JP, JACOB C (2013). Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. *Journal of proteomics*, **82**: 64-80.
- HAYGEM. HAYVANCILIK GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2019). Erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/HAYGEM.pdf>. Erişim tarihi: 29.10.2019.
- HINSCH KD, ASMARINAH HINSCH E, KONRAD L (2001). VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim. Biophys. Acta* **1518**: 329-333.
- HOLT W, WATSON P, CURRY M, HOLT C (1994). Reproducibility of computer-aided sperma analysis: Comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril*, **62**: 1277-1282
- HUANG Z, SOMANATH PR, CHAKRABARTI R, EDDY EM, VIJAYARAGHAVAN S (2005). Changes in intracellular distribution and activity of protein phosphatase PP1 γ 2 and its regulating proteins in spermatozoa lacking AKAP4. *Biology of reproduction*, **72(2)**: 384-392.
- HUNTER RHF, WILMUT I (1984). Sperm transport in the cow: peri:ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev*, **24**: 597-608.

- ICKOWICZ D, FINKELSTEIN M, BREITBART H (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian journal of andrology*, **14(6)**: 816.
- İNANÇ M, DAŞKIN A (2015). Sığırlarda suni tohumlama uygulamaları yönünden genomik seleksiyonun önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **10(2)**: 139-145.
- İNANÇ M, UYSAL O, GÜRCAN İS (2014). Farklı Irklardan Tekelerde Başlıca Spermatolojik Parametreler. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **2(1)**: 13-19.
- İNANÇ ME, ÇİL B, TEKİN K., ALEMDAR H., DAŞKIN A (2018). The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **42(5)**: 452-458.
- İNANÇ ME, GÜNGÖR Ş, ATA A (2017). Spermatozoa motilitesinin değerlendirilmesinde bilgisayar destekli sperm analiz sisteminin kullanımı. *Türkiye Klinikleri Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, **3(2)**: 73-78.
- JANUSKAUSKAS A, JOHANNİSSON A, SODERQUIST L, RODRIGUEZ-MARTINEZ, H (2000). Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*, **53(4)**: 859-875.
- JEULIN C, LEWIN LM, CHEVRIER C, SCHOEVAERT- BROSSAULT D (1996). Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer- aided image analysis. *Cell motility and the cytoskeleton*, **35(2)**: 147-161.
- JODAR M, SOLER-VENTURA A, OLIVA R, MB (2017). Semen proteomics and male infertility. *Journal of proteomics*, **162**: 125-134.
- JUMEAU F, SIGALA J, DOSSOU- GBETE F, FRIMAT K, BARBOTIN AL, BUEE L, MITCHELL V (2018). A- kinase anchor protein 4 precursor (pro- AKAP4) in human spermatozoa. *Andrology*, **6(6)**: 854-859.
- JUYENA NS, STELLETTA C (2012). Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, **33(4)**: 536-551.
- KASIMANICKAM RK, KASIMANICKAM VR, ARANGASAMY A, KASTELIC JP (2017). Associations of hypoosmotic swelling test, relative sperm volume shift, aquaporin7 mRNA abundance and bull fertility estimates. *Theriogenology*, **89**: 162-168.
- KASIMANICKAM RK, KASIMANICKAM VR, ARANGASAMY A, KASTELIC JP (2019). Sperm and seminal plasma proteomics of high-versus low-fertility Holstein bulls. *Theriogenology*, **126**: 41-48.

- KATHIRAVAN P, KALATHARAN J, KARTHIKEYA G, RENGARAJAN K, KADIRVEL G (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer- aided system—a review. *Reproduction in Domestic Animals*, **46(1)**: 165-172.
- KAYA A, MEMİLİ E (2016). Sperm macromolecules associated with bull fertility. *Animal reproduction science*, **169**: 88-94.
- KELLY VC, KUY S, PALMER DJ, XU Z, DAVIS SR, COOPER GJ (2006). Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics*, **6(21)**: 5826-5833.
- KNOWLTON SM, SADASIVAM M, TAŞOĞLU S (2015). Microfluidics for sperm research. *Trends in biotechnology*, **33(4)**: 221-229.
- KOBAYASHI J, SUDA Y, TAKADA N, KOMINE K, KUROISHI T, KOHSAKA T, SATO, E (2007). 14 motility and fertility of bull spermatozoa frozen in egg yolk extender supplemented with lactoferrin. *Reproduction, Fertility and Development*, **19(1)**: 125-126.
- KOÇ A (2016). Simmental yetiştiriciliğinin değerlendirilmesi: 1. Dünyada ve Türkiye'deki yetiştiriciliği. Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi **13(2)**: 97 – 102.
- KORKMAZ F, ÇİL B (2020). Akış sitometrisinin (flow cytometry) sperma kalite analizlerinde kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* **15(1)**:76-83.
- KORKMAZ F, MALAMA E, SIUDA M, LEIDING C, BOLLWEIN H (2017). Effects of sodium pyruvate on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity of cryopreserved bovine sperm. *Animal Reproduction Science*, **185**: 18-27.
- KORKMAZ YAVAŞ T (2009). Alternatif dondurma ve saklama yöntemlerinin boğa sperması üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- KUMAR P, KUMAR D, SINGH I, YADAV PS (2012). Seminal plasma proteome: promising biomarkers for bull fertility. *Agricultural research*, **1(1)**: 78-86.
- KUTCHY NA, DOĞAN S, KAYA A, MOURA A, MEMİLİ E. (2017). Sperm chromatin dynamics associated with male fertility in mammals. *Animal Models Hum Reprod: Cell Mol Approaches Ref Hum Reprod*, 427-34.
- KUTCHY NA, MENEZES ES UĞUR MR, HÜSNA AU, ELDEBAKY H, EVANS HC, TOPPER E, KAYA A, MOURA A, MEMİLİ E (2019). Sperm cellular and nuclear dynamics associated with bull fertility. *Animal Reproduction Science*, **211**: 106203.

- KUTTY MYH, REMYA V, SHYMA VH, RADHIKA S, SHENDE AM, BHURE SK (2014). An overview on Binder of Sperm Proteins of Cattle. *International Journal of Livestock Research*, **4(4)**: 1-11.
- KWON W, RAHMAN M, RYU D (2015). Increased male fertility using fertility-related biomarkers. *Sci Rep*, **5(1)**: 56-54.
- LABAS V, TEIXEIRA-GOMES AP, BOUGUEREAU L, GARGAROS A, SPINA L, MARESTAING A, UZBEKOVA S (2018). Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry on single bovine oocyte and follicular cells combined with top-down proteomics: A novel approach to characterise markers of oocyte maturation. *Journal of proteomics*, **175**: 56-74.
- LE COUAZER D, SERGEANT N, JOUY N, MICHAUD S, LOYENS A, DELEHEDDE M, BENCHARIF D (2019). Expression of proAKAP4 in dog semen as promising marker of sperm quality. *Reproduction in domestic animals* **54**: 73-73.
- LE LANNOU D, GRIVEAU JF, LE PICHON JP, QUERO JC (1992). Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in sperm or in capacitating medium. *Hum Reprod*, **7**: 1417-1421.
- LEFEBVRE R, SUAREZ SS (1996). Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biology of reproduction*, **54(3)**: 575-582.
- LEGARE C, AKINTAYO A, BLONDIN P, CALVO E, SULLIVAN R (2017). Impact of male fertility status on the transcriptome of the bovine epididymis. *Mol Hum Reprod*. **23**: 355-369.
- LI S, WINUTHAYANON W (2017). Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J Endocrinol*, **232(1)**: R1-R26.
- LIU M (2016). Capacitation-associated glycoproteins of mammalian sperm. *Reproductive sciences*, **23(5)**: 572-594.
- LODHI LA, ZUBAIR M, QURESHI ZI, AHMAD I, JAMIL H (2008). Correlation between hypo-osmotic swelling test and various conventional semen evaluation parameters in fresh Nili-Ravi buffalo and Sahiwal cow bull semen. *Pakistan Veterinary Journal*, **28(4)**.
- LUCONI M, CANTINI G, BALDI E, FORTI G (2011). Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Frontiers in bioscience*, **16**: 1315-30.
- LUCONI M, FORTI G, BALDI E (2006). Pathophysiology of sperm motility. *Front Biosci*, **11(1)**: 1433.
- LYBAERT P, DANGUY A, LELEUX F, MEURIS S, LEBRUN P (2009). Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histol Histopathol*. **2**: 999-1007.

- MALAMA E, ZERON Y, JANETT F, SIUDA M, ROTH Z, BOLLWIN H (2017). Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology*, **87**: 79-90.
- MBANGO JFN, COUTTON C, ARNOULT C, RAY PF, TOURÉ A (2019). Genetic causes of male infertility: snapshot on morphological abnormalities of the sperm flagellum. *Basic and Clinical Andrology*, **29(1)**: 2.
- MIKI K, CLAPHAM DE (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol*, **23(6)**: 443-452.
- MIKI K, WILLIS WD, BROWN PR, GOULDING EH, FULCHER KD, EDDY EM (2002). Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Developmental biology*, **248(2)**: 331-42.
- MOHANARAO GJ, ATREJA SK (2011). Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. *Animal reproduction science*, **123(1-2)**: 40-47.
- MONTERROSO VH, DRURY KC, EALY AD, EDWARDS JL, HANSEN PJ (1995). Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. *Theriogenology*, **44(7)**: 947-961.
- MORETTI E, SCAPIGLIATI G, PASCARELLI NA, BACCETTI B, COLLODEL G (2007). Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian journal of andrology*, **9(5)**: 641-649.
- MORRIS AR, COUTTS JR, ROBERTSON L (1996). A detailed study of the effects of video frame rates of 25, 30 and 60 Hz on human sperm movement characteristics. *Hum Reprod*, **11**: 304-310.
- MORTIMER D, SHU MA, TAN R (1986). Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in sperma analysis. *Hum Reprod*, **1**: 299-303.
- MORTIMER ST (2000). CASA- Practical Aspects. *J Andrology*, **21**: 515-524.
- MORTIMER ST, SWAN MA (1999). Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. *Hum Reprod*, **14**: 997-1004.
- MOSS SB, TURNER RMO, BURKERT KL, VANSCHOY BUTT H, GERTON GL (1999). Conservation and Function of a Bovine Sperm A-Kinase Anchor Protein Homologous to Mouse AKAP82. *Biology of Reproduction*, **61(2)**: 335-342.
- MOURA AA, CHAPMAN DA, KOC H, KILLIAN GJ (2007). A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal reproduction science*, **98(3-4)**: 169-188.

- MOURA AA, KOC H, CHAPMAN DA, KILLIAN GJ (2006). Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls. *A Proteomic Approach. J Androl* **27**: 201–211.
- MOURA AA, SOUZA CE, STANLEY BA, CHAPMAN DA, KILLIAN GJ (2010). Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *Journal of proteomics*, **73(10)**: 2006-2020.
- MUINO R, RIVERA MM, RIGAU T, RODRIGUEZ-GIL JE, PENA AI (2008). Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal reproduction science*, **109(1-4)**: 50-64.
- NAAB. NATIONAL ASSOCIATION OF ANIMAL BREEDERS (2019). Amerika Birleşik Devletleri sperma üretim ve satış verileri. Erişim adresi: <https://www.naab-css.org/news/2018-naab-regular-member-unit-sales-%E2%80%93-record-year>. Erişim Tarihi: 29.10.2019.
- NAGY Á, POLICHRONOPOULOS T, GÁSPÁRDY A, SOLT L, CSEH S (2015). Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica*, **63(3)**: 370-381
- NAGY S, JANSEN J, TOPPER EK, GADELLA BM (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod.* **68**: 1828–35.
- NTEMKA A, TSOUSIS G, BROZOS C, KIOSSIS E, BOSCOS CM, TSAKMAKIDIS IA (2016). Breed differences of bull frozen- thawed semen. *Reproduction in Domestic Animals*, **51(6)**: 945-952.
- NUR Z, DOĞAN I, SOYLU MK, AK K (2003). Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue de médecine vétérinaire*, **154(7)**: 487-490.
- NUR Z, GÖKÇE E, CİRİT Ü (2017). Sperm selection for sustainable livestock and genetic progress. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin Special Topics*, **3(1)**: 22-29.
- OKO R, SUTOVSKY P (2009). Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *Journal of reproductive immunology*, **83(1-2)**: 2-7.
- OLSON SD, SUAREZ SS, FAUCI LJ (2011). Coupling biochemistry and hydrodynamics captures hyperactivated sperm motility in a simple flagellar model. *Journal of theoretical biology*, **283(1)**: 203-216.
- OSMANAĞAOĞLU Ş (2006). Karaköy tarım işletmesinin tarihsel gelişimi. *Vet. Bil. Derg.* **3-4**: 79-84.

- ÖMÜR AD (2014). Dişi Genital Kanalda Sperm Hücrelerinin İlerlemesini Sağlayan Faktörler. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **9(3)**.
- ÖNAL AR, ÖZDER M (2008). Edirne ili damızlık sığır yetiştiricileri birliğine üye işletmelerin yapısal özellikleri. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **5(2)**: 197-203.
- ÖZKOCA A (1984). Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. Bölüm 8.
- ÖZYURT A (2009). TİGEM Esmer popülasyonunda döl kontrolü (progeny testing) ve uygulama olanakları. *Tekirdağ ziraat fakültesi dergisi* **6(3)**: 257-264.
- PACHÓN DMR, RESTREPO S, MUELLER-ROEBER B, FLOREZ FB (2012). Identification of transcription regulation associated proteins in plants and stramenopiles. *Nature Precedings*, **1**: 1.
- PADRIK P, HALLAP T, JANUSKAUSKAS A, KAART T, BULITKO T, JAAKMA Ü (2012). Conventional laboratory test and flow cytometry in the prognostic testing of bull semen fertility. *Veterinary Medicine and Zootechnics*, **60**: 52-58.
- PARK YJ, KWON WS, OH SA, PANG MG (2012). Fertility-related proteomic profiling bull spermatozoa separated by percoll. *Journal of proteome research*, **11(8)**: 4162-4168.
- PARRISH JJ (2014). Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, **81(1)**: 67-73.
- PEDDINTI D, NANDURİ B, KAYA A, FEUGANG JM, BURGESS SC, MEMİLİ E (2008). Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC systems biology*, **2(1)**: 19.
- PENA FJ, BALL BA, SQUIRES EL (2018). A new method for evaluating stallion sperm viability and mitochondrial membrane potential in fixed semen samples. *Cytom Part B Clin Cytom*.**94**: 302–311.
- PEREIRA R, SÁ R, BARROS A, SOUSA M (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian journal of andrology*, **19(1)**: 5.
- PERTEGHELLA S, GAVIRAGHI A, CENADELLI S, BORNAGHI V, GALLI A, CRIVELLI B, VIGANI B, VIGO D, CHLAPANIDAS T, FAUSTINI M, TORRE ML (2017). Alginate encapsulation preserves the quality and fertilizing ability of Mediterranean Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Holstein Friesian (*Bos taurus*) spermatozoa after cryopreservation. *J Vet Sci*, **18(1)**: 81-88.
- POTHMANN H, NECHANITZKY K, STURMLECHNER F, DRILLICH M (2014). Consultancy to dairy farmers relating to animal health and herd health management on small-and medium-sized farms. *Journal of dairy science*, **97(2)**: 851-860.

- PRATHALINGAM NS, HOLT WW, REVELL SG, JONES S, WATSON PF (2006). The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *Journal of andrology*, **27(2)**: 257-262.
- RAHAMIM BEN-NAVI L, ALMOG T, YAO Z, SEGER R, NAOR Z (2016). A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. *Scientific Reports*, **6(1)**.
- RAHMAN MS, LEE JS, KWON WS, PANG MG (2013). Sperm proteomics: road to male fertility and contraception. *International journal of endocrinology* **2013**:1-11.
- REGO, J.M. CRISP, A.A. MOURA, A.S. NOUWENS, Y. LI, B. VENUS, N.J. CORBET, D.H. CORBET, B.M. BURNS, G.B. BOE-HANSEN, M.R. MCGOWAN (2014). Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim. Reprod. Sci*, **148**: 1-17.
- ROBAYO I, MONTENEGRO V, VALDES C, COX JF (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in domestic animals*, **43(4)**: 393-399.
- ROELOFS J, LÓPEZ-GATIUS F, HUNTER RHF, VAN EERDENBURG FJC, HANZEN C (2010). When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology*, **74(3)**: 327-344.
- RONCOLETTA M, MORANI EDA S, ESPER CR, BARNABE VH, FRANCESCHINI PH (2006). Fertility-associated proteins in Nellore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci*, **91**: 77-87.
- RUELLE I, CHARREAUX F, BENCHARIF D, THORIN C, MICHAUD S (2019). Assessment of the sperm specific protein proAKAP4 as a marker to evaluate sperm quality and fertility in Holstein bulls. *Rev Bras Reprod Anim*, **43(2)**: 472.
- RUELLE I, SEREGEANT N, BENCHARIF D, CHARREAUX F, THORIN C, MICHAUD S, DELEHEDDE M (2020). 145 ProAKAP4 concentrations in semen as a predictive tool of bull fertility: A preliminary study. *Reproduction, Fertility and Development*, **32(2)**: 199.
- SANCHEZ-LUENGO S, AUMULLER G, ALBRECHT M, SEN PC, ROHM K, WILHELM B (2004). Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca^{+2} - ATPase. *J Androl*, **25**: 234-44.
- SATAR DA, NARİN R (2014). Globozoospermi. *Cukurova Medical Journal*, **39(1)**:1-6.
- SCHAFER S, HOLZMANN A (2000). The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **59**: 201-211.

- SCHUSTER TG, CHO B, KELLER LM, TAKAYAMA S, SMİTH GD (2003). Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics. *Reproductive BioMedicine Online*, **7(1)**: 75-81.
- SELVARAJU S, PARTHIPAN S, SOMASHEKAR L, BINSILA BK, KOLTE AP, ARANGASAMY A, KRAWETZ SA (2018). Current status of sperm functional genomics and its diagnostic potential of fertility in bovine (*Bos taurus*). *Systems biology in reproductive medicine*, **64(6)**: 484-501.
- SERGEANT N, BRIAND-AMIRAT L, BENCHARIF D, DELEHEDDE M (2019). The Sperm Specific Protein Proakap4 as an Innovative Marker to Evaluate Sperm Quality and Fertility. *Dairy and Vet Sci J*, **11(1)**: 555803.
- SEVİNÇ A (1979). Dölerme ve Suni Tohumlama. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 356. 2. Baskı, Bölüm: 2.
- SHARMA R, MASAKI J, AGARWAL A (2013). Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. *Spermatogenesis*, **297**: 121-136.
- SOARES R, FRANCO C, PIRES E, VENTOSA M, PALHINHAS R, KOCI K, COELHO AV (2012). Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species. *Journal of proteomics*, **75(14)**: 4190-4206.
- SOMASHEKAR L, SELVARAJU S, PARTHIPAN S, PATIL SK, BINSILA BK, VENKATASWAMY M M, RAVINDRA JP (2017). Comparative sperm protein profiling in bulls differing in fertility and identification of phosphatidylethanolamine-binding protein 4, a potential fertility marker. *Andrology*, **5(5)**: 1032-1051.
- SOUZA CEA, REGO JPA, LOBO CH, OLIVEIRA JTA, NOGUEIRA FC, DOMONT GB, FIGUEIREDO JR (2012). Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of proteomics*, **75(14)**: 4436-4456.
- SÖNMEZ M (2010). Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Androloji. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi. 2. Baskı, Bölüm 20-23.
- SUAREZ SS (2016). Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell and tissue research*, **363(1)**: 185-194.
- SUTOVSKY P, MANANDHAR G, WU A, OKO R (2003). Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy research and technique*, **61(4)**: 362-378.
- ŞEKER İ, TASALI H, GÜLER H (2012). Muş ilinde sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerin yapısal özellikleri. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Derg*, **26(1)**: 09-16.
- ŞEREFOĞLU EC (2011). Bilgisayar yardımlı sperm analizi. *Türk Üroloji Seminerleri*, **2**: 8-10.

- TACHENY A, DIEU M, ARNOULD T, RENARD P (2013). Mass spectrometry-based identification of proteins interacting with nucleic acids. *Journal of proteomics*, **94**: 89-109.
- TAGEM. TARIMSAL ARAŞTIRMALAR VE POLİTİKALAR GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2019). Sektör politika belgeleri 2018-2022. Erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Duyuru/145/Sektor-Politika-Belgeleri-2018-2022>. Erişim tarihi: 29.10.2019.
- TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, HAYVANCILIK GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2019). Cinsiyeti belirlenmemiş dondurulmuş boğa sperması referans değerleri. Erişim Adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Sayfalar/Detay.aspx?Liste=Duyuru>. Erişim Tarihi: 09.10.2019.
- TARNASKY H, CHENG M, OU Y, THUNDATHIL JC, OKO R, VAN DER HOORN FA (2010). Gene trap mutation of murine outer dense fiber protein-2 gene can result in sperm tail abnormalities in mice with high percentage chimaerism. *BMC developmental biology*, **10(1)**: 67.
- TEIJEIRO JM, MARINI, PE (2012). The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro-AKAP4 phosphorylation. *Reproduction*, **143(6)**: 773-785.
- TEKİN K (2011). İki farklı sulandırıcı ile dondurulan Norduz tekesi spermasının motilite, vap, vcl, vsl parametreleri üzerinden değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- TEKİN K, DAŞKIN A. (2016). Effect of different extenders on motility and some sperm kinematics parameters in Norduz goat semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **40(4)**: 490-495.
- TEMEL M (2015). Atatürk dönemi hayvancılık politikası. Muğla Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, **24**: 1-33.
- THERIEN I, SOUBEYRAND S, MANJUNATH P (1997). Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biology of reproduction*, **57(5)**: 1080-1088.
- THIEMAN WJ, PALLADINO MA (2013). Biyoteknolojiye Giriş. Bölüm 4: Ürün olarak proteinler. Çeviri Ed.: İkinci D. s.: 101-121.
- THOMAS CA, GARNER DL, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE (1998). Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of reproduction*, **58(3)**: 786-793.
- TIRPAN MB (2012). Ankara tekesi spermasının dondurulmasında tris sulandırıcı bileşenleri yerine katılan borun (sodyum pentaborat) çözümü sonu sperma kalitesi üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

- TIRPAN MB, TEKİN N (2014). Türkiye’deki progeny test çalışmalarına genel bir bakış. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **11(3)**, 197-203.
- TOLLNER TL, YUDIN AI, TREECE CA, OVERSTREET JW, CHERR GN (2008). Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Human reproduction*, **23(11)**: 2523-2534.
- TRAVIS AJ, KOPF GS (2002). The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest*. **110**: 731–736.
- TURNER RM, JOHNSON LR, HAIG-LADEWIG L, GERTON GL, MOSS SB (1998). An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail. *The Journal of biological chemistry*, **273(48)**: 32135–41.
- TÜZEMEN N (2015). Kastamonu ilinde sığır yetiştiricilerinin durumu, sorunları ve çözüm önerileri. *Kastamonu university journal of engineering and sciences* **1(2)**: 33-51.
- UĞUR MR, SABER ABDELRAHMAN A, EVANS HC, GILMORE AA, HİTİT M, ARIFIANTINI RL, MEMİLİ E (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in veterinary science*, **6**: 268.
- VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN K (2002). Computer assisted sperma analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, **57**: 149-179.
- VHTP. VETERİNER HEKİM TARTIŞMA PLATFORMU (2018). Erişim adresi: https://www.facebook.com/groups/206763876061313/search/?query=anamoli&epa=SEARCH_BOX. Erişim tarihi: 01.01.2020.
- VINCENT P, UNDERWOOD SL, DOLBEC C, BOUCHARD N, KROETSCH T, BLONDIN P (2018). Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Animal Reproduction*, **9(3)**: 153-165.
- VON BULOW M, HEID H, HESS H, FRANKE WW (1995). Molecular nature of calicin, a major basic protein of the mammalian sperm head cytoskeleton. *Experimental cell research*, **219(2)**: 407-413.
- WAH DA, FERNÁNDEZ-TORNERO C, SANZ L, ROMERO A, CALVETE JJ (2002). Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex. *Structure*, **10(4)**: 505-514.
- WERTHEIMER E, KRAPF D, JOSÉ L, SÁNCHEZ-CÁRDENAS C, NAVARRETE F, HADDAD D, MAGER J (2013). Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *Journal of Biological Chemistry*, **288(49)**: 35307-35320.
- WESTFALEWICZ B, DIETRICH MA, MOSTEK A, PARTYKA A, BIELAS W, NIŻAŃSKI W, CIERESZKO A (2017). Analysis of bull (*Bos taurus*) seminal vesicle

fluid proteome in relation to seminal plasma proteome. *Journal of dairy science*, **100(3)**: 2282-2298.

WHISTON R, FINLAY EK, MCCABE MS, CORMICAN P, FLYNN P, CROMIE A, O'FARRELLY C (2017). A dual targeted β -defensin and exome sequencing approach to identify, validate and functionally characterise genes associated with bull fertility. *Scientific reports*, **7(1)**: 1-13.

XU W, HU H, WANG Z, CHEN X, YANG F, ZHU Z, LI Z (2012). Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. *Journal of proteomics*, **75(17)**: 5426-5436.

YENER A (2017). Konya ilinde süt sığırıcılığı yapan aile işletmelerinde yeniliklerin benimsenmesi ve yayılmasına etki eden faktörler. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya.

YIRTICI S, ŞAHİN D, KORKMAZ F, BAŞTAN İ, KİNİT H (2018). Ülkemizde üretilen ve ithalatına izin verilen dondurulmuş bo a spermalarının yoğunluk ve motilite değerlerinin karşılaştırılması. 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Hatay.

ZACHUT M, SOOD P, LEVIN Y, MOALLEM U (2016). Proteomic analysis of preovulatory follicular fluid reveals differentially abundant proteins in less fertile dairy cows. *Journal of proteomics*, **139**: 122-129.

ZHU W, ZHANG Y, REN CH, CHENG X, CHEN JH, GE ZY, ZHANG Z (2020). Identification of proteomic markers for ram spermatozoa motility using a tandem mass tag (TMT) approach. *Journal of proteomics*, **210**: 103438.

ZINAMAN M, UHLER M, VERTUNO E, FISHER S, CLEGG E (1996). Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J Androl*, **17**: 288–292.

ZUBAIR M, LODHI LA, AHMAD E, MUHAMMAD G (2013). Hypo osmotic swelling test as screening for evaluation of semen of bull. *J. Entomol. Zool. Stud*, **1(6)**: 124-128.

EKLER

Ek-1 Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

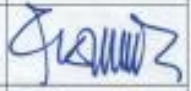
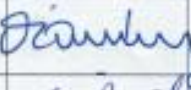
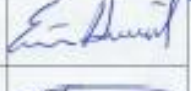
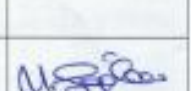


T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

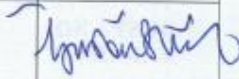
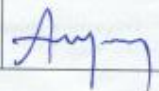
TOPLANTI TARİHİ : 10/07/2019
TOPLANTI NO : 2019-14
DOSYA NO : 2019-91
KARAR NO : 2019-14-127

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ergun AKÇAY'ın yaptığı; araştırmacı olarak Vet. Hek. İktan BAŞTAN'ın katıldığı "ProAKAP4 Protein Seviye Testi ile Dondurulmuş Boğa Spermastı Kalitesinin Değerlendirilmesi" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışma Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 7-h maddesi kapsamında değerlendirilerek Etik Kurul iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 16/07/2019-16/01/2020

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks: 0 (312) 212 60 49

Dr. Öğr. Üyesi Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : İlktan
Soyadı : BAŞTAN
Doğum yeri ve tarihi : Denizli /1989
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Evli
Askerlik durumu : Yapıldı
İletişim adresi ve telefonu : Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim
Merkezi Müdürlüğü
Ankara 0312 865 1196/105

II- Eğitimi

1995 – 2002 : Arif Yalınkaya İlköğretim Okulu / Denizli
2002 – 2006 : Kazım Kaynak Anadolu Lisesi / Denizli
2007 – 2013 : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi / Burdur
Yabancı dil : İngilizce

III- Ünvanları

2013 : Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

Ocak 2014 – Nisan 2014 : Veteriner Hekim, Ağrı Tarım İl Müdürlüğü
Nisan 2014 – Devam ediyor : Veteriner Hekim, Uluslararası Hayvancılık
Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

1. Reproduksiyon Suni Tohumlama ve Bilim Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Makaleler

1. **BAŞTAN İ**, AKÇAY E. (2020). Spermatozoon liyofilizasyonu: Hayvan genetik kaynaklarının korunması için yeni bir saklama modeli olabilir mi? Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 59 (Ek Sayı) , 130-136.
2. GÜNGÖR S, İNANÇ ME, ÖZTÜRK C, KORKMAZ F, **BAŞTAN İ**, ÇİL B, KASTELIC J (2019). Gallic and carnosic acids improve quality of frozen-thawed ram spermatozoa. Andrologia 51(10), e13393.
3. İNANÇ ME, GÜNGÖR S, ÖZTÜRK C, KORKMAZ F, **BAŞTAN İ**, ÇİL B (2019): Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. Veterinarni Medicina 64, 118–124.
4. KABAKÇI R, VARIŞLI Ö, KAYA A, **BAŞTAN İ**, ŞİMŞEK S (2019). Boğa sperması motilite parametreleri üzerine dietilheksil ftalatın etkisi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 4(2), 62-68.

Sözlü Bildiriler

1. KORKMAZ F, **BAŞTAN İ**, SAHİN D, YIRTICI S (2019). Lalahan Model in Commercial Anatolian Buffalo Semen Production. 12th World Buffalo Congress, İstanbul.
2. YIRTICI S, **BAŞTAN İ**, SAHİN D, KORKMAZ F, BAS B, STELLETTA C, BAYRAKTAROĞLU AG, KILIC B, ŞENYÜZ HH, SATILMIŞ M, KİNET H (2019). Effects of Endocrine-disrupting Chemicals Bisphenol A on Body Weights, Some Blood Values and Liver Enzymes in Neonatal Ankara Goats. I.International Livestock Science Congress, Antalya.

3. ŞAHİN D, KORKMAZ F, **BAŞTAN İ**, YIRTICI S, ÇİL B, KİNET H (2019) Effects of Semen Concentration on Motility During Collection of Bull Semen. I.International Livestock Science Congress, Antalya.
4. KORKMAZ F, ŞAHİN D, **BAŞTAN İ**, YIRTICI S, KAYA U, GRAM A (2019). The Effect of Toll Like Receptor 4 (TLR4) Inhibitor (TAK-242) on Cryopreserved Bovine. I.International Livestock Science Congress, Antalya.

Poster Sunumları

1. **BAŞTAN İ**, ŞAHİN D, TEKİN K, STELLETTA C, KİNET H, DAŞKIN A, AKÇAY E (2016). Treatment assisted autoimmune therapy of traumatic penis injury in a Bull. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni tohumlama Bilim Kongresi 5-9 Ekim, Antalya.
2. ŞAHİN D, **BAŞTAN İ**, TEKİN K, STELLETTA C, KİNET H, AKÇAY E, DAŞKIN A (2016). The Number of False Mounting Effect of Sperm Quality and Freezability in Bulls. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni tohumlama Bilim Kongresi 5-9 Ekim, Antalya
3. ŞAHİN D, **BAŞTAN İ**, ÇİL B, TEKİN K, STELLETTA C, SATILMIŞ M, AKÇAY E, DAŞKIN A (2017). Annual Control Chart of Bull Semen Freezability. Proceedings of the 33rd Meeting of the Association of Embryo Transfer in Europe (AETE); Bath, United Kingdom 8th and 9th, 2017.
4. TEKİN K, STELLETTA C, ŞAHİN D, **BAŞTAN İ**, PARILDAR O.O, DASKIN A. Ultrasound Monitoring reproductive organs in Angora bucks. Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); FozdoIguaçu, PR, Brazil, August 25th to 27th, 2016, and 32nd Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE); Barcelona, Spain, September 9th and 10th, 2016.
5. TEKİN K, ÇİL B, ŞAHİN D, **BAŞTAN İ**, STELLETTA C, DAŞKIN A (2017). Effects of Polyvinyl Alcohol on Fresh and Post-Thawing Physiological Motion Characteristics of Angora Goat Semen. Proceedings of the 33rd Meeting of Association of Embryo Transfer in Europe (AETE); Bath, United Kingdom 8th and 9th, 2017.
6. **İ BAŞTAN**, F KORKMAZ, D ŞAHİN, S YIRTICI, H KİNET, M SATILMIŞ, M

TEKERLİ (2018). İlk Ticari Amaçlı Anadolu Mandası Sperması Kryoprezervasyonu ve Rekto-vaginal Yöntemle Suni Tohumlama Uygulaması. 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Hatay.

7. D ŞAHİN, K TEKİN, Z GÜLERYÜZLÜ, **İ BAŞTAN**, S YIRTICI, F KORKMAZ, K DÜZGÜN, C STELLETTA, E AKÇAY (2018). Bir Boğada Persiste Penil Frenektomi Olgusu. 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Hatay.

8. S YIRTICI, D ŞAHİN, F KORKMAZ, **İ BAŞTAN**, H KINET. Ülkemizde Üretilen ve İthalatına İzin Verilen Dondurulmuş Boğa Spermalarının Yoğunluk ve Motilite Değerlerinin Karşılaştırılması. 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Hatay (2018).

9. F KORKMAZ, S YIRTICI, **İ BAŞTAN**, D ŞAHİN, B ÇİL, H KINET, M SATILMIŞ. Simental ve Esmer Irklara Ait Suni Tohumlama Boğalarında Reaksiyon Sürelerinin (RS) Karşılaştırılması. 9. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Hatay (2018).

10. R. KABAKÇI, Ö VARIŞLI, A KAYA, **İ BAŞTAN**, S YIRTICI. Evaluation of the Toxic Effect of Diethylhexyl Phthalate on Bovine Spermatozoa by Using Advanced Motility Analysis. MEDVET2018 - Mediterranean Veterinary Congress, Kırıkkale (2018).

11. **İ BAŞTAN**, F KORKMAZ, D SAHİN, S YIRTICI. Semen Characteristics of The Anatolian Buffalo. I.International Livestock Science Congress, Antalya (2019).

Patent Başvurusu

1. Anadolu Mandalarında ve Yerli Sığır ırklarında video destekli intra uterin suni tohumlama cihazı. Patent Başvuru No: 2019 / 21012.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri

1. Farklı Antioksidanlar ile Dondurulan Boğa Spermasının Değerlendirilmesi. (Araştırmacı), TAGEM/HAYSUD.

2. Ankara Keçilerinde Bisphenol A'nın Başlıca Androlojik Parametreler Üzerine Etkisi. (Araştırmacı), TAGEM/HAYSUD
3. Gen Bankası Oosit Saklama Modeli Oluşturulması-1: Prepubertal Ankara Keçilerinden Laparoskopik Ovum Toplama (LOPU) Yöntemiyle Elde Edilen Oositlerin Dondurulması ve Çözüm Sonu Kalitelerinin Belirlenmesi. (Araştırmacı), TAGEM/HAYSUD.

Verdiği Seminerler

1. Sperma Hücresinin Saklanması Liyofilizasyon Yöntemi. Doktora Semineri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 2017.
2. Sperma Üretim Merkezlerinin Çalışma Usul ve Esasları. HAYGEM Eğitim Semineri 12-13 Nisan 2018.
3. Sığırlarda Suni Tohumlama Uygulamalarında Güncel Yaklaşımlar. Karacabey TİGEM, “Hizmet İçi Eğitim Programı” 2018.
4. Anadolu Mandalarında Dondurulmuş Sperma Üretimi ve Suni Tohumlama Çalışmaları. Halk Elinde Hayvan Islahı Ülkesel Projesi 2019 Yılı Danışma Kurulu Toplantısı.

TV Yayını ve Programı

1. Bereket Hayvancılık TV (2017). Dondurulmuş Sperma Üretimi ve Suni Tohumlama.
2. Bereket TV (2017) Tarım Bülteni, Özel Haber. Türkiye’de İlk kez Dondurulmuş Anadolu Mandası Sperması Üretildi.

VIII- Diğer Bilgiler

Aldığı Diğer Eğitimler

1. Erasmus Öğrenim Hareketliliği, Universidad de Extremadura Cáceres / İspanya, 2011.

2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, 2015.
3. Sığırlarda Recto-Vaginal Metotla Suni Tohumlama, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, 2015.
4. Sığırlarda Embriyo Transferi, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, 2016.
5. Tarım Sektöründe Üniversite Sanayi İş Birliği Proje HazırlamaEğitimi, 19 Mayıs Üniversitesi (TUBİTAK 2237-B Proje Eğitim Etkinlikleri), 2019.
6. Dondurulmuş Aygır Sperması Üretimi. Anadolu Tarım İşletmesi, TİGEM, 2019.

