

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr. İrfan Kamuran İLERİ

SPERMA-SERVİKAL MUKUS PENETRASYON TESTİNDE FARKLI ISI
VE SÜRELİ İNKÜBASYONLARIN ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Veteriner Hekim
Muzaffer TAŞ

İSTANBUL – 2003

138225

1.	İÇİNDEKİLER	Sayfa No:
2.	TEŞEKKÜR	
3.	GİRİŞ VE AMAÇ.....	1-3
4.	GENEL BİLGİLER.....	4-23
4.1.	Boğalarda Spermatolojik Özellikler.....	4
4.2.	Spermanın Dondurulması ve Eritilmesi.....	7
4.3.	Eritme Sonrası Dış Faktörlerin Spermatolojik Özelliklere Etkisi.....	8
4.4.	Spermanın Potansiyel Fertilitésinin Belirlenmesi.....	10
4.5.	Dişi Genital Organlarında Spermatozoonların Transportu	13
4.6.	Sperma-Mukus Etkileşimi.....	15
4.6.1.	Servikal Mukusun Kimyasal Özellikleri.....	15
4.6.2.	Sperma ile Servikal Mukus Arasındaki Etkileşim.....	17
4.7.	Farklı Test Metotlarının Sperma Servikal Mukus Penetrasyon Test Sonuçları Üzerine Etkisi.....	22
5.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	24-32
5.1.	Spermanın Dondurulması.....	24
5.2.	Servikal Mukusun Toplanması.....	24
5.3.	Servikal Mukusun Değerlendirilmesi.....	24
5.4.	Servikal Mukusun Saklanması.....	25
5.5.	Servikal Mukus Penetrasyon Testi.....	25
5.6.	Grupların Oluşturulması.....	26

5.7 Spermatolojik Özelliklerin İncelenmesi.....28

5.7.1. Motilite Muayenesi.....28

5.7.2. Morfolojik Muayene.....28

5.8 Sun’i Tohumlama Uygulamaları.....30

5.9. Verilerin Değerlendirilmesi.....31

6. BULGULAR.....33-43

7. TARTIŞMA.....44-56

8. ÖZET.....57-58

9. YABANCI DİLDE ÖZET.....59-60

10. KAYNAKLAR.....61-70

11. ÖZGEÇMİŞ.....71

2. TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde bilimsel tecrübesinden, bilgisinden ve önerilerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof.Dr. İ.Kamuran İLERİ'ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında mesleki tecrübesini, yakın ilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof.Dr. Kemal AK'a saygı ve minnettarlığımı içtenlikle sunarım.

Çalışmanın değişik aşamalarında bilimsel ve mesleki deneyimleriyle destek olan Sayın Prof.Dr.Serhat PABUÇCUOĞLU'na, Prof.Dr. Sema BİRLER'e, Doç.Dr. Serhat ALKAN'a, Yard.Doç.Dr. Alper BARAN'a ve Araş.Gör.Dr.Mithat EVECEN'e,

Çalışmam boyunca büyük özveri ile bana yardımcı olan Sayın Araş.Gör.Dr. Ümüt CİRİT'e ve Araş.Gör.Dr. Süleyman BACINOĞLU'na,

İstatistiksel verilerin değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Araş.Gör.Dr. Ömür KOÇAK'a ve Araş.Gör.Dr. Bülent EKİZ'e,

Saha çalışmalarımda büyük desteklerini gördüğüm başta Sayın Veteriner Hekim Hüseyin HÜSEYİN olmak üzere İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftliği sığırcılık ünitesi personeline ve sun'i tohumlama uygulamalarında büyük destek sağlayan Sayın Veteriner Hekim Yüksel SEZER'e katkı ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bugüne kadar tüm yaşamım süresince benden hiçbir desteklerini esirgemeyen başta babam Sayın Abdullah TAŞ, annem Sayın Zeliha TAŞ ve eşim Emine TAŞ'a en içten saygı ve sevgilerimi sunuyorum

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Döl verimi hayvan yetiştiriciliğinin verimliliğini belirlemede hayati bir önem taşımaktadır. Sütçü bir işletmeden maksimum verimin alınabilmesi, ineklerden düzenli olarak yılda bir buzağı elde edilmesine bağlıdır (8, 16, 61, 71, 76, 86, 89). Çünkü, üreme olmadan ekonomik verimlerin sürekliliği mümkün değildir (35). Bu olgu erkeklerde dişilere nazaran daha büyük bir önem taşır (23, 34, 35). Bir boğanın çiftleşme yoluyla yılda 100-150 dişiye dölleyebilmesine rağmen dondurulmuş sperma yöntemiyle 20.000-50.000 dişinin tohumlanabildiği göz önüne alındığında, potansiyel fertilesi düşük bir boğanın tohumlamada kullanılması durumunda neden olacağı ekonomik kayıpların büyük olacağı muhakkaktır (81). Bu nedenle gerek boğanın ve gerekse dondurulmuş spermanın tohumlamada kullanılmadan önce fertilitate gücünün tahmin edilmesi büyük ekonomik değer taşımaktadır (34, 30).

Spermanın fertilitate gücünün belirlenmesinde spermatozoonların plazma zarının yapısal bütünlüğünü inceleyen çeşitli analiz yöntemleri geliştirilmiştir (18, 35, 51). Spermatozoonun makroskobik, mikroskobik ve fizikokimyasal analizleri rutin olarak yapılmaktadır (45, 78, 93). Spermanın değerlendirilmesinde kullanılan testlerin pek çoğu sperma hücrelerinin canlılık oranı, motilitesi ve morfolojisi ile ilgilidir (18). Gün geçtikçe spermatozoonların potansiyel fertilitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin arttığı ve bu analizlerin tek başlarına yeterli olmadıkları bildirilmektedir (10, 17, 18, 20, 46, 47, 51, 79, 91).

Aşım sonrası spermatozoonların vaginadan fertilizasyon bölgesine doğru giderken karşılaştıkları ilk fiziksel bariyer servikstir (18, 20, 26, 46) ve spermatozoonların serviks içerisindeki göçü yeterli miktardaki ve kalitedeki servikal mukusa bağlıdır (51). Spermatozoonun servikal mukusa penetre olmasından sonra, morfolojik olarak sağlam ve motil hücre oranının serviksin kranialinde kaudaline göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (5, 20, 91). Araştırmacılar servikal mukusun doğal olarak anormal morfolojiye sahip spermatozoonları filtre etme özelliğine sahip olduğunu (5, 20, 27, 51) ve serviksin anatomik yapı bozukluklarının veya servikal mukus sekresyonundaki

anormalliklerin %5-%10 oranında kısırlığa sebebiyet verdiğini bildirmektedirler (51). Bu nedenle, sperma ile servikal mukus arasındaki etkileşimin belirlenmesi fertilite değerlendirilmesi açısından büyük önem arz etmektedir (20, 26, 51,55,75, 87, 91).

Spermatozoon ile servikal mukus arasındaki etkileşimi değerlendirmek için in vivo olarak Post Koital Test (PCT) uzun bir dönem yaygın olarak kullanılmıştır (27, 46, 51, 52). Ancak PCT sonuçlarının yorumları üzerindeki anlaşmazlıklar ve testin standardize edilememesini de içeren birçok zorluklarla karşılaşılması bu alandaki çalışmaları başka test metotlarına kanalize etmiştir (51). Sperma ile servikal mukus arasındaki etkileşimin değerlendirildiği testleri standardize etmek amacıyla “slayt testi” ve “sperm servikal mukus kontakt testi” gibi değişik in vitro test metotları geliştirilmiştir (26, 51, 52).

Bir çok araştırmacı sperma ile servikal mukus arasındaki etkileşimi değerlendirmek için içi servikal mukus ile dolu heparinize olmamış cam kapillar tüpleri sperma ile belirli ısı ve sürelerde inkübasyona tabi tutarak değerlendirmişlerdir (5, 6, 23, 33, 52, 55, 63). Zamanla testin in vitro uygulaması ile ilgili farklı teknikler ve değerlendirme kriterleri ortaya çıkmıştır (55, 91).

İnsan hekimliğinde yapılan bir çok çalışmanın neticesinde spermatozoonların fertilizasyon kapasitesinin servikal mukus penetrasyonu ile korelasyonlu olduğu tespit edilmiştir (11, 18, 26, 27, 51, 52, 68). Bu nedenle insanlarda erkek hastaların infertilite değerlendirilmesinde servikal mukus penetrasyon testinin (SMPT) kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Ne var ki boğa spermatozoonlarının mukusa penetre olma yetenekleri ile in vivo fertilite arasındaki ilişkinin değerlendirildiği sınırlı sayıdaki çalışmaların geneli mukusa penetrasyon kabiliyeti ile in vivo fertilite arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı şeklindedir (18, 33, 63, 68, 88). Çalışmaların büyük çoğunluğunda mukus içerisindeki öncü spermatozoonun kat ettiği mesafe baz alınmıştır (4, 5, 53, 68, 87, 91). Bununla beraber araştırmacılar, SMPT’de yalnızca öncü spermatozoonun almış olduğu mesafenin değil, aynı zamanda mukus örneğine penetre olabilen spermatozoon sayısının da tespit edilmesinin gerektiğini ve in vivo fertilitenin

daha kesin tahmin edilebilmesi için farklı test sistemlerinin kombine edilmesinin zorunlu olduğunu ileri sürmüşlerdir (26, 88).

SMPT'de cam kapillar Tüp metodunda elde edilen sonuçların bir laboratuvarından diğerine ve kişiden kişiye farklılık gösterebildiği ve standardize edilememesi gibi sakıncalarının olduğu bildirilmektedir (74). Bunun sebebi, kapillar tüpler içerisindeki sıvı derinliğinin değişken olması nedeni ile, hareketsiz veya hareketli olduğu halde tüp çeperine yakın olmayan spermatozoonların mikroskopik bakıda tespit edilememesine bağlanmaktadır. Sadece çepere yakın hareketli spermatozoonların belirlenebilmesi, kapillar tüp içerisinde belirli mesafelerdeki spermatozoon sayılarının tam olarak tespit edilememesi sonucunu doğurmaktadır (74).

Çalışmada Servikal Mukus Penetrasyon Testin'de kullanılan kapillar tüp yerine 0.25ml'lik payetler kullanılmış ve inkübasyon bitiminde sıvı azot buharında örnekler dondurularak tespit edilmiştir. Payetten belirli aralıklarda (1,5-1,75, 3,25-3,5 ve 5-5,25 cm.) örnekler alınarak spermatozoon sayıları belirlenmiştir. Yeni oluşturulmaya çalışılan SMPT'de farklı ısı (37°C, 39°C ve 41°C) ve sürelerle (15 ve 45dk.) dayanan inkübasyon teknikleri ve penetrasyon aralıkları araştırılmış, toplam 3537 sun'i tohumlama uygulamasından elde edilen %NR oranları ve eritme sonrası spermatolojik özellikler değerlendirilerek önerilebilir inkübasyon tekniği ve penetrasyon aralığını saptayabilmek amaçlandı.

4.GENEL BİLGİLER

Evcil hayvanlarda sun'i tohumlama alanındaki ilk bilimsel çalışmalar 1780 yılında İtalyan filozof L. Spallanzani tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacı kızgınlık gösteren dişi köpeğe vücut ısısındaki köpek spermasını enjektör yardımıyla uterus içerisine bırakmış ve uygulama sonrası sağlıklı yavrular elde etmiştir. Uygulamalara yönelik ilk ciddi çalışmalar 1922 yılında Rus araştırmacı E. İ. İvanoff tarafından başlatılmıştır. İvanoff, atlarda gerçekleştirdiği sun'i tohumlamalardan doğal aşımaya göre daha yüksek gebelik oranları elde etmiştir. Araştırmacı diğer hayvan türlerinden kanatlı, sığır ve koyunlarda da bu tekniği başarı ile uygulamıştır (71).

Sun'i tohumlama endüstrisi alanındaki gelişmeler hızla ilerlemiş ve bu yöntem, hayvancılığı gelişmiş ülkeler tarafından yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (93). Türkiye gibi düşük verimli ırkların fazla, kültür ve melez ırkların ise yetersiz olduğu ülkelerde sun'i tohumlamanın ayrı bir önemi vardır. Uygulamaların yaygınlaşması için suni tohumlama tekniğinin getireceği yararların çok iyi anlatılmasının yanı sıra, yetiştiricilerin bu tekniğe olan güvenini kazandırmak zorunludur. Bu güven ancak tohumlamalar sonrasında yüksek gebelik oranlarının elde edilebilmesi ile sağlanabilir (90).

Boğa spermasının dondurulmasında ulaşılan başarılı sonuçlar ve tohumlamalardan elde edilen nispeten yüksek gebelik oranları bu gelişmelere hız vermiştir. Nitekim sun'i tohumlama uygulamaları hayvancılığı gelişmiş ülkeler tarafından sığır popülasyonlarının %80-90'ında uygulanır hale gelmiştir (44).

4.1. Boğalarda Spermatolojik Özellikler

Memeli spermatozoonu temel olarak baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur (38, 78, 93). Baş; akrozom, nükleus, hücre iskeleti ile ilgili yapıları ve sitoplazmayı içerir. Akrozom bir membran ile çevrilidir ve hidrolitik enzimleri içermektedir. Nükleus ise her bir kromozom çiftini ve yoğun kromatini içerir. Kuyruk; baştan uca kadar uzanan, dış yoğun fibriller ile çevrili sentral bir

aksonemadan oluşmuştur ve plazma membranı ile sıkı sıkıya sarılmıştır . Akrozom spermatozoonun ovum ile fertilizasyonu için gerekli enzimleri taşıırken, kuyruk enerji kaynaklarını içermekte ve motilitenin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (9, 45, 78, 93).

Spermatozoonun baş, orta ve kuyruk kısımlarında hücrenin fonksiyon ve yaşamında değişik görevler üstlenen bölgeler vardır (18, 64, 72). Bu yapısal komponentler, donma sırasındaki ısı ve ozmotik şoklara değişik yanıtlar verirler. Komponentler arasındaki makrotübüler permeabilite ve spesifik protein permeabilitesindeki değişimler, hücrenin her kısmını belirleyebilmeyi mümkün kılar (64).

Elmore (28), sun'i tohumlamalarda kullanılan boğaların sağlık ve sperma kontrollerinin sürekli yapılması gerektiğini bildirmiştir.

İleri ve ark. (45), spermatolojik incelemeleri makroskopik ve mikroskopik muayeneler olmak üzere iki grupta toplamışlardır. Erişkin bir boğa spermasında hacmin 2-8 ml. arasında olduğunu, rengin süt beyazından koyu kreme kadar değiştiğini, sulu süt kıvamında olan spermanın kendine has aromatik bir kokuya sahip olduğunu bildiren çalışmacılar, mikroskopik özelliklerden %70-80 motilite, 1×10^9 / ml spermatozoon yoğunluğu ve %20 morfolojik bozuklukların normal değerler içerisinde yer aldığını açıklamışlardır.

Anderson (3), sperma kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerin dört grup altında toplanabileceğini bildirmiştir. Bunlar;

a-) Mikroskopik Yöntemler: Motilite, spermatozoon yoğunluğu, ölü-canlı muayenesi ve anormal spermatozoon oranı,

b-) Biyokimyasal Yöntemler: pH, metilen mavisi redüksiyon testi gibi metabolik yöntemler,

c-) Dayanıklılık Testleri: Düşük ısıda saklama, yüksek ısılarda yaşayabilirlik,

d-) Fiziksel ve Diğer Metotlar: Çeşitli elektrik akımları uygulayarak yapılan testlerdir.

İleri ve Ak (43), spermatolojik incelemelerde asıl amacın o sperma ile yapılan tohumlamalardan elde edilecek fertilite oranlarını doğru olarak tahmin etmek olduğunu, spermanın potansiyel fertilitesi olarak adlandırılan bu testlerde, canlılık ve morfolojik bütünlük olmak üzere iki ana unsurun değerlendirmeye alındığını ifade etmişlerdir. Çalışmacılar, sperma hücresinin morfolojik olarak değerlendirilmesindeki kriterlerin araştırmacılara göre değişmekle birlikte akrozom morfolojisi ile fertilite sonuçları arasında yüksek bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında akrozom bozukluğu ile motilite arasında bir ilişkinin olmadığını kaydetmişlerdir.

Spermanın kalitesi ile fertilite ilişkisinin birçok defa araştırıldığı, ancak sonuçların çoğunun fertilite tahmininde yanlış ya da yetersiz kaldığı ifade edilmiştir (18, 26, 52, 62, 64, 72, 79, 87). Fertilite ile morfoloji arasındaki ilişki ilk defa 1927 yılında Williams ve Sagave tarafından doğal aşımında kullanılan boğalarda kanıtlanmıştır. Lagerlöf, 1934 yılında morfolojik bozukluklar ile fertilite arasındaki korelasyonu daha iyi belirleyen bir sınıflandırma sistemi geliştirmiş, düşük fertilitelere sahip boğa testislerindeki histopatolojik değişiklikler ile taze spermadaki anormal morfoloji insidensi arasında korelasyon bulmuştur. Belirtilen çalışmalar, 1971 yılında damızlık boğalarda çalışan Rao tarafından desteklenmiş ve bu çalışma sperma kalitesinin belirlenmesinde morfolojik değerlendirmelerin bir test olarak kabul edilmesinde temel teşkil etmiştir. Yakın zamanlarda Wood ve ark. kıvrılmış kuyruk yüzdesinin ve proksimal damlacık yüzdesinin, fertilitenin en iyi tahminini sağladığını rapor etmişlerdir (82).

Özkoca (70), morfolojik olarak anormal spermatozoon sayısı az olan boğaların sperması ile tohumlanan ineklerdeki gebelik yüzdesinin, anormal spermatozoon sayısı fazla olanlara nispeten yüksek olduğunu bildirmiştir.

Boğalarda rutin olarak yapılan reproduktif değerlendirmelerde, incelenen kriterlerin hiç birisinin spermatozoon morfolojisi kadar fertilite ile yakın ve tutarlı bir bağlantı sergilemediği bildirilmiştir (1, 28, 84). %35-%40 gibi yüksek oranda

anormal morfolojiye sahip sperma ile yapılan tohumlamalarda genellikle düşük gebelik oranları elde edileceğini açıklayan Elmore, morfolojik incelemeleri; normal, primer ya da sekonder bozukluklar olmak üzere üç sınıfa ayırmıştır. Primer bozuklukların (anormal baş, orta kısım anomalisi, proksimal protoplazmik damlacık ve sıkıca kıvrılmış kuyruk) seminifer epiteldeki spermatogenesisten kaynaklandığını, sekonder bozuklukların ise (distal protoplazmik damlacık, ayırık baş, bükük ya da tersine dönmüş kuyruk anomalileri) spermanın kanal sisteminde ilerlerken olgunlaşma aşamasında meydana geldiğini bildirmiştir (28).

Spermatolojik özellikler ile fertilité arasındaki korelasyon diğer hayvanlara göre boğalarda daha iyi aydınlatılmıştır (78). Taze boğa spermasında kabul edilebilir gebelik oranları elde etmek için spermatozoon sayısının $500 \times 10^6/\text{ml}$., motilitenin %50, morfolojik bütünlüğe sahip spermatozoon oranının ise %80'den fazla olması gerektiğini bildiren Hafez (39), motilitenin sağlıklı bir spermatozoonun temel koşulu olduğunu fakat anormal spermatozoonun da normal hareket edebileceğini bildirmiştir. Araştırmacı, dişi genital kanalındaki spermatozoonun fertilizasyon bölgesine ulaşmasında motilitenin önemli bir rolü olduğunu, bununla birlikte hücrenin oosit yüzeyindeki kumulus hücrelerini ve zona pellusida'yı geçişinde de etkili olduğunu açıklamıştır.

Boğa sperması üzerinde çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, boğa spermasının etkin olarak değerlendirilmesinin sun'i tohumlama endüstrisinin en önemli problemlerinden biri olduğu kimi araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (75).

4.2. Spermanın Dondurulması ve Eritilmesi

Dondurmak için hazırlık işlemleri tamamlanmış, yani sulandırılmış, gliserol ilave edilmiş ve ekilibre edilmiş 5°C 'deki sperma, yine 5°C 'lik ortamda birer tohumlama dozu halinde payetlere doldurulur. Payetler içerisindeki sperma sıvı azot buharında -110°C ile -120°C 'de dondurulmaktadır. Dakikada $17-18^{\circ}\text{C}$ 'lik bir soğutma hızının donma sonrasında oluşan kristallerin yapısı

bakımından optimal olduğu kabul edilmektedir. Payetler içerisinde dondurulmuş sperma -196 °C'lik ortamda sıvı azot tanklarında muhafaza edilir (45, 78).

İleri ve Ak (43), boğa spermasının dondurulması ve -196°C'de saklanması günümüzde standart bir yöntem olarak kabul edildiğini, herhangi bir nedenle donmuş spermada sıkça meydana gelebilen ısı değışikliklerinin kristalizasyon olaylarını etkileyerek hücrenin mekanik açıdan zarar görmesine neden olabildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar sperma hücresinin donma ve eritme sırasında oluşan ısı değışimlerine karşı oldukça duyarlı olduğunu açıklamışlardır. Spermatozoonların yaşama yeteneklerinin ve morfolojik bütünlüklerinin korunmasında eritme tekniklerinin ayrı ve önemli bir yeri olduğunu vurgulayan çalışmacılar, birçok araştırmacının payetlerde dondurulmuş spermayı değışik ısı ve sürelerde erittiğini belirtmişlerdir. Avuç içinde, havada, 25°C'de, 15°C'de ve özellikle 5°C gibi düşük ısılarda yapılan eritmelere kıyasla, 37°C sıcaklıktaki su banyosunda gerçekleştirilen eritmelerde daha başarılı sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir.

4.3. Eritme Sonrası Dış Faktörlerin Spermaya Etkisi

Dünyada ve ülkemizde payetlerde dondurulmuş spermaların 37°C'de 30 saniyede eritilmesi tekniğı yaygın olarak kullanılmakta ve çok başarılı sonuçlar elde edilmektedir (19). Ancak eritme bittikten sonra tohumlama işlemi başlayana kadar geçen süre uygulayıcının deneyimine ve saha koşullarına göre oldukça değışmektedir. Örneğin eritme işleminin yapıldığı yer ile tohumlanacak hayvanın bulunduğu yer arasındaki uzaklık süreyi belirleyen önemli faktörlerdendir. Belirtilen süre içerisinde eritilmiş sperma farklı ısılara maruz kalabilmekte ve özellikle soğuk kış günlerinde çevre ısıları geçen süreye bağlı olarak spermada ani ısı düşüşlerine neden olabilmektedir (90). Tohumlama sonrasında ise sperma dışı genital organlarında tekrar vücut ısısına yükselmektedir. Bu ani ısı değışiklikleri neticesinde spermatozoonlarda soğuk şoku meydana gelebilmekte, özellikle akrozomda olmak üzere geri dönüşümü olmayan değışiklikler oluşmaktadır. Bunun sonucunda spermatozoonlar fertilizasyon yeteneğini kaybedebilmektedirler (15, 21, 90, 94).

Correa ve ark. (90), spermatozoonların donma-eritme sırasında hipertonic ortama, in-vitro koşullardaki yıkama prosedürlerinde ve/veya tohumlama sonrası genital kanal sıvılarında ise izotonik ortama maruz kaldıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ozmotik basınçtaki ani değışimlerin ozmotik şoka, sperma canlılığında azalmaya ve spermatozoon membranında hasarlara neden olduğunu ifade etmişlerdir.

Elmore (28), olumsuz çevresel şartlar ve hastalıkların boğalardaki spermatozoonların morfolojisini önemli ölçüde etkileyebildiğini ve vücut ısısında meydana gelen artışın morfolojik anormalliklerde geçici bir yükselmeye, gebelik oranlarında ise bir gerilemeye yol açacağını bildirmiştir. Araştırmacı, vücut ısısındaki artış takiben yaklaşık iki hafta sonra anormal spermatozoon oranının yükseldiğini, bu oranın bir ay boyunca artmaya devam ettiğini ve spermatozoon morfolojisinin normale dönmesinin yaklaşık üç ay aldığını belirtmiştir.

Kaya ve ark. (50), yanlış eritmenin fertilite azalmasına neden olarak önemli ekonomik kayıplara yol açtığını ve dondurulmuş spermanın çözündürülmesindeki amacın payet iç ısısının kısa bir süre içerisinde +20°C'ye ulaşması olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmacılar, payetlerin eritildiği ortamın (su, hava vb.) ısısının ve çözdürme süresinin önemli olduğunu ve spermatozoonda meydana gelen hasarların, özellikle spermatozoonların çözdürme esnasında ve sonrasındaki ani ısı değışikliklerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Pace ve ark. (73), eritme hızının yükselmesi ile paralel olarak donmuş spermanın hayatta kalma oranının da arttığını ve eritme sonrası canlılığın dondurma hızı, eritme hızı ve gliserol konsantrasyonundan etkilendiğini bildirmişlerdir. Spermayı çeşitli ısılarda erittikleri çalışmalarında en iyi sonuçların 37°C'de alındığını ve bu ısının spermatozoon bütünlüğü üzerine faydalı etki yaptığını saptamışlardır.

Farklı araştırmacılar saha koşullarında spermanın eritilmesi ile tohumlama arasındaki zaman aralığının ve çevre ısılarının fertiliteye etkilerini incelemişlerdir. Eritme sonrası düşük çevre ısılarının ve tohumlamaya kadar

geçen sürenin uzun olmasının fertilitiye olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir (37, 43, 90).

4.4. Spermanın Potansiyel Fertilitésinin Belirlenmesi

Sun'i tohumlama endüstrisinin en önemli sorunlarından biri spermanın değerlendirilmesidir (75). Bu değerlendirme sun'i tohumlama laboratuvarlarında kullanılacak damızlık boğaların seçiminde olduğu kadar, dondurulan spermaların fertilitiye gücünün belirlenmesinde de büyük önem taşımaktadır (45, 78, 93).

Spermatolojik özelliklerin incelenerek, spermanın dölleme yeteneği hakkında bilimsel olarak bilgi edinilebildiği bildirilmekte ve buna da "Spermanın Potansiyel Fertilitesi" adı verilmektedir (45). Bir çok araştırmacı, eritme sonrasında saptanan özelliklerin o sperma ile yapılacak tohumlamalar sonrasındaki gebelik oranları hakkında büyük ölçüde fikir verebileceğini bildirmişlerdir (13, 45, 78).

Spermanın canlılık tespitine ve potansiyel fertilitésinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan incelemelerde kullanılan en yaygın kriter motilitedir (66). Ancak sperma değerlendirilmesinin daha iyi yapılabilmesi için, başta akrozom olmak üzere tüm morfolojik incelemelerin motilitiye ile birlikte değerlendirilmesinin gerektiği bildirilmektedir (7, 70, 92).

Söderquist ve ark. (82), taze spermanın morfolojisi ile eritilmiş spermanın fertilitesi arasındaki ilişkinin daha önce araştırıldığını fakat, morfolojinin fertilitiye tahmininde yanlış veya yetersiz sonuçlar verebildiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, akrozomal ve diğer morfolojik bozukluklar ile canlı spermatozoon oranı gibi özelliklerin potansiyel fertilitiye hangi ölçülerde etkilediğinin ortaya konması için daha fazla çalışılması gerektiğini açıklamışlardır.

Linford ve ark. (90), boğalarda spermatolojik özellikler ile fertilitiye arasındaki ilişkiyi araştırmışlar, bu amaçla payetlerde dondurdukları sperma ile yaptıkları tohumlamalardan elde ettikleri gebelik oranlarını incelemişlerdir (NRR). Araştırmacılar, eritme sonrası morfolojik bozukluklardan proksimal

stoplazmik damlacıklı spermatozoon oranı ile fertilité arasında önemli korelasyon saptadıklarını bildirmişlerdir.

Akrozom bozukluklarının boğalarda infertiliteden sterilitéye kadar varan dölverimi problemleri yaratacağını bildiren Anderson ve ark. (3), 95 boğa kullanarak yaptıkları çalışmada en çok rastladıkları akrozom bozukluklarını;

a-) Şişmiş apikal kenar

b-) Düzleşmiş apikal kenar

c-) kısmen şişmiş ve kıvrılmış apikal kenar olarak sınıflandırmışlardır.

Motilité, konsantrasyon ve morfoloji gibi rutin sperma analizleri genelde subjektif olarak gerçekleştirilmektedir. Kullanılan malzemelerin sıcaklık ve kalitesindeki değişiklikler analiz sonuçlarını etkileyebilmekte ve uzmanlık gerektiren bu testler spermanın potansiyel fertilitésinin belirlenmesinde yetersiz kalabilmektedir (18, 56, 64, 72).

Bazı araştırmacılar erkeklerde fertilitenin tahmini için kullanılan rutin sperma analizlerinin; konsantrasyon, motilité ve morfoloji gibi birkaç parametreye dayalı olduğunu ifade etmişler, ancak, bunlarında belli kısıtlamalar içerdiğini ve fertilizasyonun tahmini için yeterli olmadığını spermatozoonun servikal mukus penetrasyonu, akrozomal membran bütünlüğü gibi değişik sperma parametrelerinin ölçülmesi için farklı analizlerin geliştirilmekte olduğunu belirtmişlerdir (18, 49, 82).

Paul ve arkadaşları (75), insanlarda erkeğin infertilitesini değerlendirmek için rutin sperma analizlerinin gerekli olduğunu fakat tek başına yeterli olmadığını bildirmişlerdir. Bu amaç için sperma servikal mukus penetrasyon testinin; kolay, geliştirilebilir, daha ucuz ve hamster yumurtası penetrasyon (HZA) deneylerinden çok daha kolay yorumlanabilen bir test olduğu belirtilmektedir (75, 77).

Ejaküle olmuş spermanın, vaginadan ductus fallopi'ye doğru olan yolculuğunda karşılaştığı ilk fiziksel bariyer serviks olup (5, 20, 27, 52)

spermanın serviks içerisindeki göçü, yeterli miktarda ve kalitede servikal mukusa bağlıdır (26, 46, 51). Serviks'in anatomisinin ve servikal mukus anomalilerinin, fertilitede %5-%10 arasında bir düşüşe sebebiyet verdiğini ifade eden araştırmacılar, sperma ile servikal mukus arasındaki etkileşimlerin tespit edilmesinin infertilite tayini açısından çok önemli olduğunu vurgulamışlardır (51). Çalışmacılar Postkoital testin (PCT), spermanın servikal mukusla arasındaki etkileşimi göstermek için uzun süre kullanıldığını, ancak PCT sonuçlarının yorumu üzerinde anlaşmazlıkların bulunduğunu ve bir standardizasyonun şart olduğunu, bu nedenle çalışmaların başka test metotlarına kanalize edildiğini bildirmişlerdir (27, 46, 52). Sperma ile mukus etkileşimini standardize etmek için; slayt testi, sperma-servikal mukus kontakt testi (SCMC) ve kremer kapillar penetrasyon testi gibi birçok in-vitro teknikler kullanıldığı bildirilmektedir (26, 51, 52). İlk başlarda sperma-servikal mukus penetrasyon test (SMPT) sonuçları, rutin sperma analizi sonuçları ile paralel bulunmuştur. Bu da testin çok önemli bir klinik bulgu olmadığı kanısını ortaya çıkarmıştır. Ancak veriler daha dikkatli incelendiğinde, SMPT'nin rutin sperma analizlerden daha hassas olduğu görülmüştür. Örneğin konsantrasyonu düşük ve motilitesi zayıf olan örneklerin mukus penetrasyon test sonuçlarının zayıf olması beklenirken, örneklerin önemli bir bölümünde sonuçlar normal bulunmuştur. Bununla birlikte örneklerin küçük bir bölümünün düşük test sonuçlarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Rutin sperma analizleriyle spermatozoonların fonksiyonel işlevleri hakkında önemli bilgilerin tam olarak sağlanamayacağı ancak SMPT ile sağlandığına dair sonuçların elde edildiği bildirilmektedir (10, 17, 18, 20, 26, 52, 62, 68, 79, 87).

Eggert Krause ve ark. (26), SMPT'nin insanlarda yalnızca spermatozoonların penetrasyon mesafesini değil aynı zamanda mukus örneğine penetre olan spermatozoonların sayısını, motilitesini ve fertilité gücü hakkında önemli bilgiler sağladığını bildirmişlerdir.

İnfertilite araştırmalarında yeni bir test olarak kullanılan HZA, spermatozoonları fonksiyonel olarak inceleyen ve spermatozoonların insan yumurtasında zona pellusidaya bağlanma yeteneğini değerlendiren bir

yöntemdir (17, 58, 80). HZA'nın IVF ile önemli derecede korelasyonlu olduğu yapılan çalışmalar neticesinde ortaya çıkmıştır (80). SMPT ile karşılaştırıldığında HZA, gerek çalışma süresi bakımından çok zaman alması ve gerekse uzmanlaşmış teknisyene ve pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyması nedeniyle servikal mukus penetrasyon testine ciddi anlamda bir alternatif olamamıştır (80). Oysa ki SMPT, basit ve pahalı olmayan bir laboratuvar testidir (75, 87). Sperma-mukus etkileşim testleri diğer sperma analizlerini tamamlamada faydalı bir yöntemdir (36). İnsanlarda özellikle, hormonal olarak standardize edilmiş hasta eşlerinde servikal mukusun kullanılmasıyla yapılan SMPT'nin, fertilite için prognostik değeri olan önemli bir değerlendirme yöntemi olduğu ifade edilmiştir (11, 18, 26, 27, 51, 52, 63, 68, 75, 87). Araştırmacılar, insanlarda spermanın servikal mukusa penetre olma yeteneğinin gerek in-vivo ve gerekse in-vitro olarak test edilmesinin klinik önemini belirlemek için PCT (Post-Coital Test) ve Sperma-Servikal Mukus Penetrasyon Testlerini karşılaştırmışlar, sonuç olarak SMPT'nin gebelik tahmininde PCT'ye kıyasla daha iyi bir yöntem olduğunu belirlemişlerdir (27, 51, 52).

Correa ve ark. (18), farklı fertilite oranlarına sahip boğalarda spermanın konsantrasyonu ve motilite gibi parametre ortalamalarının benzer olduğunu fakat spermanın fonksiyonel parametrelerini ölçen test sonuçlarının, fertilite oranlarına göre değiştiğini belirtmişler, spermaların SMPT'de 30 dakikalık inkübasyonda 20mm'nin üzerinde skor alan grubun potansiyel fertilitelerini yüksek, 20mm'nin altında skor alan grubun ise düşük olduğunu saptamışlardır.

4.5. Dişi Genital Organlarında Spermatozoonların Transportu

Çiftleşme sonucunda sperma insan, sığır, koyun ve tavşanda vaginaya, kısırak, domuz ve kemiricilerde ise uterusu bırakılır (45, 78). Spermanın bırakıldığı yer ve bırakılan spermatozoon miktarı arasında türler arasında farklılıklar bulunurken (Örneğin: Boğa 4.8×10^9 , Aygır 8.4×10^9 , Köpek 1.25×10^9) ovidukta ulaşan spermatozoonların sayısının az olduğu bildirilmektedir (38).

Vaginadan ovidukta kadar olan yolculuk boyunca spermatozoonlar birçok bariyer ve olumsuz ortamlarla karşılaşır (20, 26, 27, 46, 51, 52) ve sayıları giderek azalır.

Türlere göre değişmekle birlikte ortalama pH'sı 6.2-7.8 olan vagina spermatozoonların yaşaması için uygun bir ortam değildir. Vagina mukozasının salgıladığı laktik asit pH'nın düşmesine ve spermatozoonların hareketlerinin engellenmesine sebebiyet vermektedir (85).

Serviks vaginayı uterusu bağlar. Servikal kanal düzensiz durum ve kıvrımlardan oluşmuş olduğundan epitel yüzeyinde derin kriptler mevcuttur (41). Spermatozoonlar serviksteki bu kriptler sayesinde lökositlerden ayrılarak fagositozdan korunurlar (36, 41). Serviksin epitel yüzeyinde mukus salgılayan hücreler mevcut olup östrus döneminde bu salgı çoğalarak vaginada toplanmaktadır (12, 36, 41, 93). Ovulasyon öncesinde olduğu gibi östrojen seviyesi yüksek, progesteron seviyesi düşük olduğunda servikal mukus sulu bir kıvamdadır. Bu durum spermatozoonların servikal kanaldan daha rahat geçmesini sağlar. Siklusun lüteal devresinde olduğu gibi yüksek progesteron seviyesinde ise mukus visköz bir hal aldığından spermatozoonların uterusu girişine engel teşkil eder (36, 41, 52).

Uterus spermatozoonlar için aktif bir bariyer değildir. Ancak uterusun lümenindeki granülositler ve antikor hücreleri spermatozoonları fagositte ettiğinden sperma hücreleri için uygun bir ortam değildir (41). Farklı türler üzerinde yapılan araştırmalarda, spermatozoonların uterusun distalinden oviduktlara birkaç dakika gibi kısa bir zaman diliminde ulaştığı bildirilmektedir (36). Bu durum spermatozoonların taşınmasında ana faktörün uterus kontraksiyonları ve endometriyumdan salgılanan sıvılar olduğunu göstermektedir (7, 36, 41, 45, 54).

Son olarak utero-tubal geçiş bölgesinde spermatozoonlar önemli bir engelle karşılaşır (36, 41). Bu bölgenin morfolojisi hayvan türleri arasında farklılık gösterir. Özellikle kemiriciler ve domuzlarda utero-tubal geçiş bölgesi büyük bir engel teşkil ettiğinden, bu türlerde büyük miktarlarda sperma direkt

olarak uterus lümenine bırakılır (41). Engeli aşan spermatozoonlar ovidukt içerisinde önemli ölçüde bu organların kontraksiyonları ve ovidukt salgısı ile daha ileriye transfer edilirler (48, 78).

4.6. Sperma-Mukus Etkileşimi

Hareketli spermatozoonlar servikal mukus iplikçikleri tarafından servikal kriptlere yönlendirilirler ve burada tutularak yavaş yavaş uterus ve fallop tüplerine doğru salınırlar (32, 36). Mukus içerisindeki sperma hücreleri her zaman bir sıvı ortam içinde bulunur. Spermatozoonların dışı üreme kanalı sekresyonları ile etkileşimi, hücrelerin yaşamı ve fonksiyonel yeteneği için kritik bir önem taşımaktadır (36). Uterus ve tuba sıvılarının spermatozoonlar üzerindeki etkilerini değerlendirmek için halen pratik bir yöntem bulunamamıştır (31). Fakat servikal mukus üzerinde çalışılmakta ve özellikleri belirlenebilmektedir (4, 5, 6, 18, 20, 23, 32, 55, 63, 65, 67, 68, 79, 91).

4.6.1. Servikal Mukusun Kimyasal Özellikleri

Serviks'in epitel hücreleri değişik tipte salgı hücreleri içermekte ve bu hücrelerden salgılanan sıvılar servikal mukusun temelini teşkil etmektedir (36, 93). Ovaryumdan salgılanan hormonlar servikal mukusun sekresyonunu düzenlemekte; östrojenin etkisi ile östrus döneminde serviks mukozasının salgısı çoğalmakta ve yumurta akı görünümüne dönüşerek vaginada toplanmaktadır (24, 67, 85, 93). Bu salgı özellikle kızgınlık döneminde vaginadan bol miktarda boşalır ve ineklerde önemli östrus semptomlarından (45, 78, 85, 93). Salınan servikal mukus miktarı siklik değişiklikler göstermektedir (36, 52, 60). Servikal mukus; elektrolitler, lökositler, hücresel artıklar, organik bileşikler ve çözünür proteinler içeren düşük ve yüksek viskoziteli komponentlerden oluşan bir hidrojeldir (12, 36). Viskozitenin yüksek olması musin yoğunluğuna bağlıdır. Servikal musin, bir peptid çekirdek ve oligosakkarid yan zincirler şeklinde alt birimlerden oluşan bir fibriler sistemdir. Servikal mukusun kimyasal yapısında sodyum, potasyum klorür ve az miktarda da kalsium ve inorganik fosfor bulunmaktadır (11, 12, 14, 23, 63). İnekte serviko-vaginal sıvının en önemli elementi mucoid'tir. Bu element focose,

galaktose, glucosamine, sialic asit ve bazı amino asitler içermektedir. Sialic asit miktarı östrus döneminde azalmakta, gebelik döneminde ise çoğalmaktadır. İneğin vaginal sıvısında az miktarda şeker bulunmaktadır. Fakat uterus ve duktus fallopide bu miktar daha fazlalaşmakta ve sperma için enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (36). Servikal mukus %90'ın üzerinde su içeren heterojen bir sekresyon olup yoğunluk ve kristalleşme gibi sıvılara özgü bazı özellikler göstermektedir (32, 59, 63, 67). Yoğunluk servikal mukusun moleküler düzeninden, protein ve iyon konsantrasyonlarından etkilenmektedir. Mukus yoğunluğu, proöstrusda ve östrusun hemen başında yüksek bir viskoziteye sahiptir. Mukusun ovulasyondan önceki bu yoğunluğu giderek daha sulu bir kıvama dönüşmekte ve ovulasyon anında en düşük yoğunluğa ulaşmaktadır. Ovulasyonu takiben mukusun viskozitesi tekrar artmaya başlamaktadır (12, 36).

Servikal mukus bileşenlerinde oluşan siklik değişiklikler spermatozoonun penetrasyon yeteneğini ve yaşamını etkileyebilir. Spermatozoonlar, insan servikal mukusuna dışide 28 gün süren normal siklusun yaklaşık dokuzuncu gününde penetre olmaya başlamakta ve penetrasyon yeteneği ovulasyona kadar giderek artmaktadır. Ovulasyon sonrasında henüz mukusta büyük değişiklikler görülmeden spermatozoonların penetrasyon kabiliyeti azalmaya başlamaktadır (22, 36, 52). Sperma hücrelerinin servikal mukusun pH'sındaki değişikliklere karşı hassas olduğu belirtilmektedir (85). Alkalın karakterli mukus motiliteyi artırırken, asit karakterli mukus spermatozoonların hareketini durdurmaktadır. Bununla birlikte, servikal mukusun aşırı alkali olması (pH'nin 8.5'ten yüksek olması) canlılığını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Spermatozoonların migrasyonu ve yaşamlarının sürekliliği için gerekli olan optimal pH aralığı 7.0-8.5 ve bu değer siklus ortasındaki normal servikal mukusun pH değeridir. Bununla birlikte 6.0 ile 7.0 arası pH değerlerinin de spermatozoon penetrasyonu için uygun olduğu görüşü vardır (12, 36, 52)

Bozkurt ve Demirci (12), ineklerde östrusun farklı devrelerinde elde edilen vagina ve serviks akıntılarında ortalama viskozite 2.3 ± 0.09 , pH 7.46 ± 0.06 , kuru madde $\%1.62 \pm 0.06$, su $\%98.37 \pm 0.07$, Ca 10.06 ± 0.06 mg/100ml,

Na 12.11 ± 0.05 mEq/1, K 118.04 ± 0.66 mEq/1 ve Mg 3.96 ± 0.03 mg/100ml değerlerini saptamışlardır.

Dev ve arkadaşları (22), östrusun ortasında alınan servikal mukusa spermatozoonların daha iyi penetre olduğunu saptamışlar. Bu safhada alınan mukusun yüksek düzeyde Na ihtiva ettiği ve diğer safhalarda alınan mukuslara nazaran daha düşük düzeyde protein içerdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar gerek potasyum, gerekse kalsiyum ve magnezyum değerleri arasında önemli bir farklılık gözlenmediğini bildirmişlerdir.

4.6.2. Sperma ile Servikal Mukus Arasındaki Etkileşim

Araştırmacılar serviks ve servikal mukusun;

- a) Ovulasyon anında veya ovulasyona yakın zamanda spermatozoon penetrasyonunun sağlanması,
- b) Spermatozoonların vagina içerisinde fagositoza karşı korunması ve enerji gereksiniminin karşılanması,
- c) Filtrasyon (farklı motilite ve morfolojik özelliklere bağlı olarak spermatozoon seçimi),
- d) Kısa süreli spermatozoon depo görevini görmesi ve
- e) Spermatozoonlarda kapasitasyonun başlatılması şeklinde sıralanabilecek özellikleri olduğunu bildirmişlerdir (36, 52).

Daha önce de belirtildiği gibi servikal mukus siklusun sınırlı bir döneminde spermatozoon migrasyonuna izin vermektedir (36, 52). Spermatozoonların servikal mukusa penetre olma zamanı bir kadından diğerine, aynı kadında bir siklustan diğerine farklı olmaktadır (36). Sperma ile servikal mukus arasındaki etkileşimin detaylı olarak incelenmesi, penetrasyon testleri kullanılarak yapılmaktadır (2, 4, 5, 6, 20, 23, 26, 32, 52, 53, 63, 68, 74, 75, 79, 87). Sperma-servikal mukus etkileşim testleri ile servikal mukus örneklerinin kalitesini karşılaştırmak amaçlandığında; optimum sayı, hareketlilik

ve sağlam morfolojiye sahip tek bir sperma rneği, farklı sperma örneklerinin kalitesini değerlendirmek amaçlandığında ise aynı servikal mukus rneği kullanılmaktadır (36).

Servikal mukusun sıvı kısmının %85 ile %98 arasında değiştiği, bu sıvı kısım %95'in altına indiğinde servikal mukusun yoğunlaştığı ve spermatozoon migrasyonunun hızla azaldığı bildirilmektedir (23).

Matousek ve ark. (63), çalışmalarında kullandıkları servikal mukusları süperovulasyon uygulanan ve uygulanmayan ineklerden almışlar ve bu mukuslara spermatozoonların penetre olma yeteneğinde bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Servikal mukusun içindeki kristallerin yapısının ve servikal mukusun protein konsantrasyonunun SMPT'yi belirgin bir şekilde etkilediğini ifade eden çalışmacılar, mukus içerisindeki kristalleşmenin (puberizasyon) olmaması ve yüksek düzeyde protein bulunması durumunda spermatozoonların kapillar tubul içerisindeki hareketlerinin yavaşladığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda servikal mukusun spermatozoonların hareketini yavaşlatarak, enerjisini ovidukt ampullasına ulaşacak kadar dengeli kullanmasını sağladığını da ifade etmişlerdir.

Kırşan ve ark. (54), spermatozoonların hareketinin uterustaki mukuslu akıntının tersi yönünde olduğunu, uterus kontraksiyonlarının durması veya yetersizliği durumunda sperma hücrelerinin genital kanaldaki ilerleme hızlarının yavaşladığını veya en azından ovidukt ampullasına ulaşma süresinin uzadığını bildirmişlerdir.

Eggert-Krause ve ark. (26), spermatozoonlar ile mukus arasındaki etkileşimin, sperma ve mukusa ait çeşitli özellikler tarafından etkilendiğini, bunlardan en önemlilerinin; hormonal, mikrobiyel ve immunolojik faktörler olabileceğini açıklamışlardır. Serviksin spermatozoonların fertilizasyon bölgesine transportuna yardım eden ve bariyer görevi gören en önemli organ olduğunu ifade eden çalışmacılar, in-vitro penetrasyon testinin tekrarlanabilir ve standardize edilebilir olduğunu, bununla birlikte spermatozoon ile mukus

arasındaki etkileşimin gözlemlenmesine de rahatlıkla olanak sağladığını bildirmişlerdir.

Bazı yazarlar spermanın kalitesi ve mukusa olan penetrasyon yeteneği arasındaki ilişkileri aşağıdaki başlıklar altında toplamışlardır;

1. Mukusa penetre olabilme özelliğinde en önemli faktör spermanın motilitesidir (26, 46, 51, 68 74, 87, 91).
2. Spermanın morfolojik özellikleri de önemlidir fakat çalışmadan çalışmaya farklılık gösterir. Çünkü bu özellik araştırmacılara göre farklı sınıflandırmalara maruz kalmakta ve sonuçta değişik bulgular ortaya çıkmaktadır (5, 6, 20, 46, 52).
3. Spermatozoon konsantrasyonunun önemi daha azdır (74).

Serviks normal spermatozoonları seçmek için doğal bir bariyerdir (20, 26, 27, 52). Serviks'in bu görevine ilişkin Jeulin ve ark. (46), in-vivo ve in-vitro olarak farklı iki metot üzerinde çalışma yapmışlardır. İn-vitro olarak Sperma-Servikal Mukus Penetrasyon Testi, in-vivo olarak ise Post Koital Testinde (PCT) çalışan araştırmacılar, morfolojik olarak anormal başa sahip spermatozoonların servikal mukus penetrasyon testinde önemli bir düşüş gözlemlediklerini, serviks'in bir bariyer meydana getirerek morfolojik olarak anormal başlı spermatozoonları elediğini ve bu hücrelerin transportuna izin vermediğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar çoğunlukla bir spermada birden fazla anomalite varsa hangisinin en önemli olduğuna karar vermede ve değerlendirmelerinde güçlükler yaşayabilmektedirler. SMPT'de pozitif sonuç veren sperma örneklerinin normal morfolojiye sahip hücre yüzdeleri çok geniş bir varyasyon göstermektedir (%3-%66) (46). Buna rağmen SMPT de iyi sonuç veren hücreler incelendiğinde, normal formdaki spermatozoon oranının hiç de az olmadığı bildirilmektedir (5, 6, 20, 46, 52). Spermatozoonların baş kısmına ait bir ya da birden fazla morfolojik bozukluk olması, servikal mukustaki migrasyonu etkilememektedir. Ancak baş bozukluğuna orta kısım veya kuyruk

bozukluğunun da eklenmesi halinde, hücrenin servikal mukusa penetrasyonun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Servikal mukustaki seleksiyonun, hücrenin motor (orta kısım ve kuyruk) kısımlarının morfolojik bütünlüğüne yani motilite yeteneğine dayandığı açıklanmıştır. (46).

İnsanlarda in-vitro olarak spermatozoonların servikal mukusa penetre olma yeteneklerinin değerlendirilmesi, spermatozoon fertilitésinin belirlenmesinde önemlidir (11, 26, 27, 51, 52, 63, 68, 73, 75, 87). Ayrıca SMPT sonuçları ile progresif motilite sonuçlarının birbirleri ile önemli derecede korelasyonlu olduğu bildirilmektedir (5, 23, 26, 51, 68, 74, 91).

Keel ve Schalue (52), spermatozoon konsantrasyonu, motilite ve SMPT değerleri arasında önemli bir ilişkinin olduğunu bulmuşlardır ($p < 0.01$). Çalışmacılar normal yoğunluğa ve motiliteye sahip spermatozoonların, SMP'de normal sonuçlar gösterdiğini belirtmişlerdir. Normal spermatozoon sayısına sahip ejakulatların %68'inin iyi bir SMPT sonucu gösterdiğini saptayan araştırmacılar, spermatozoon motilitesi ile SMPT sonuçları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde spermatozoon sayısına oranla motilitenin SMPT ile daha yüksek korelasyonlu olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar SMPT sonuçları ile gebelik oranları arasındaki ilişkiyi de incelemişler ve SMPT ile gebelik sonuçları arasında önemli bir bağlantının olduğunu ve SMPT sonuçları yüksek olan 69 erkek hastanın %59'undan başarılı sonuçlar alındığını bildirmişlerdir.

Anilkumar ve Devanathan (5), bir çok araştırmacının spermatozoonların servikal mukusa penetre olmasında rol oynayan önemli 3 kriter (eritme sonrası motilite, normal morfoloji oranı ve sağlam akrozom oranları) üzerinde durduklarını, kendi çalışmalarında ise penetrasyona sadece motilitenin önemli derecede katkıda bulunduğunu ve diğer bütün özelliklerin önemsiz olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Servikal mukusun, sadece fonksiyonel olarak en iyi olan spermatozoonların penetre olmasına izin vererek bir filtre gibi görev yapmasının yanı sıra başka özellikleride vardır. Serviks'in kaudalinde bulunan normal spermatozoon oranının, kranialine nazaran önemli derecede daha yüksek

olduğu gözlenmiştir (5, 20, 91). Bunun yanında, servikal mukusun genital kanalın daha yukarılarındaki sekresyonların immunolojik durumunu yansıtabileceği bildirilmektedir (26). Serviks içerisine salgılanmış olan antikorlar muhtemelen implantasyona engel olan endometriumdaki antikorlardır. Mukus içindeki sağlıklı olarak tanımlanabilecek ilerleme spermatozoonun sadece mukusta ilerleyebilmesini değil, aynı zamanda utero-tubal bağlantı yerinden geçmesine ve korona radiataya penetre olmasına olanak sağlamaktadır (26).

Keel ve Webster (53), yoğunluk, motilite ve hız gibi spermatolojik parametreler ile mukus penetrasyon mesafesi arasında pozitif bir korelasyon saptamışlardır ($p < 0.001$). Çalışmacılar spermanın morfolojik bozukluklarının yüzdesi ile mukus penetrasyon mesafesi arasında önemli derecede negatif bir korelasyonun olduğunu ve penetrasyon mesafesi 20mm'den az olan grupta olgunlaşmamış germ hücreleri ile kıvrık kuyruklu spermatozoon yüzdesinin, 20 mm'den fazla penetrasyon mesafesine sahip olan gruba göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Eggert-Krause ve ark. (26), spermatozoonların insan servikal mukusuna penetre olma yeteneği ile insan oositlerinin zona pellusidasına bağlanma yeteneği arasında yüksek bir korelasyon olduğunu saptamışlardır. Aynı şekilde fertilite yeteneği kanıtlanmış erkekler incelendiğinde, spermatozoonlarının gerek zonaya bağlanma testinde ve gerekse SMP testinde önemli derecede yüksek bulgular tespit etmişlerdir.

Çeşitli araştırmacılar yaptıkları farklı çalışmalarda, progresif motiliteye sahip hücre konsantrasyonunun arttırılması ile SMPT'de yüksek bulgular elde edilebildiğini ve testte kullanılan spermanın taze ya da eritilmiş olmasının sonucu etkilemediğini belirtmişlerdir (74, 91).

Anilkumar ve ark. (6), altı boğanın donmuş spermasını kullanarak yaptıkları çalışmalarında, spermatolojik özellikler ile poliacrilamid jel ve servikal mukus içerisindeki spermatozoonların penetrasyon mesafesi arasındaki korelasyonu değerlendirmişler. Jel ve mukus içerisindeki spermatozoon penetrasyonu ile eritme sonrasındaki motilite ve akrozom bütünlüğü arasında

önemli derecede pozitif bir korelasyon saptadıklarını bildiren araştırmacılar, anormal spermatozoon oranında ise önemli derecede negatif bir korelasyon bulduklarını bildirmişlerdir. Çalışmada gerek konsantrasyon, gerekse eritme sonrası canlı spermatozoon oranında ise önemli derecede bir korelasyonun olmadığı saptanmıştır.

4.7. Farklı Test Metotlarının SMPT Sonuçları Üzerine Etkisi

Sperma ile servikal mukus arasındaki etkileşimi açıklamak için in vivo PCT ile in-vitro Slayt Testi ve Sperma Servikal Mukus Kontakt Testleri uzun bir dönem yaygın olarak kullanılmıştır (26, 51, 52). Ancak bu test sonuçlarının yorumları üzerindeki anlaşmazlıklar ve testin standardize edilememesini de içeren bir çok zorluklarla karşılaşılması bu alandaki çalışmaları başka test metotlarına kanallandırmıştır (51). Kremer adlı araştırmacı ilk kez 1945 yılında içi servikal mukus ile dolu heparinize olmamış kapillar tüpler ve kalibre edilmiş penetrasyon metresini kullanmıştır (55). Daha sonraları Kremer Kapillar Tüp Metodu olarak adlandırılan ve bir çok araştırmacı tarafından benimsenen bu yöntemin temeli, içi servikal mukus ile dolu olan kapillar tüplerde spermanın belirli süre ve ısılarda inkübasyona tabi tutulması ve mikroskop altında belirli mesafedeki spermatozoonların sayısının belirlenmesi esasına dayanmaktadır (18, 20, 23, 26, 32, 51, 52, 79).

In vitro penetrasyon testinde yumurta akı ile sığır servikal mukusunu ayrı ayrı kullanarak spermatozoonların penetrasyon kabiliyetini karşılaştıran Engel (29), servikal mukus içerisindeki spermatozoonların penetrasyon yeteneğini, motilitelerini ve hızlarını, yumurta akı kullanılanlara nazaran önemli derecede yüksek bulmuştur.

Mukus Penetrasyon Testinde mukus içerisindeki kristallerin yönünün spermatozoonların hareket kabiliyeti üzerinde pozitif bir etkisinin olduğunu tespit eden François (32), testte kullanılan kapillar tüplerin çapını daraltarak mukus içerisindeki fibrillerin tüp eksenine paralel bir hal almasını ve spermatozoonların tüp içerisinde daha kolay yönelmesine olanak sağlayarak hızlarını arttırdığını saptamıştır.

Paul ve arkadaşları (75), sperma yıkama (swim-up) tekniğinin SMPT üzerine olası etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada normal ve anormal spermaların yıkama öncesi ve sonrası SMPT değerlerini inceleyen araştırmacılar, 30 mm'den fazla penetrasyon gösterenleri normal, 30 mm'den az penetrasyon gösterenleri anormal olarak değerlendirmişler ve konu üzerinde çalışan diğer araştırmacıların ve kendilerinin 30 mm'yi referans kabul ettiklerini belirtmişlerdir. Fertilitesi normal sperma örneklerinin penetrasyon ortalamasının değişmediği, yıkama öncesi 58 mm iken yıkama sonrası 55 mm bulunduğu ifade edilmiştir. Fertilitesi normalin çok altında olan vericilerin spermasında ise yıkama öncesi 18 mm olan penetrasyon mesafesinin yıkama sonrası 27 mm'ye yükseldiği saptanmış ve bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.025$).

Yıkama prosedürü uygulanmamış spermada penetrasyon ortalama değerinin yıkananlardan daha büyük olduğunu bildiren Shoham ve ark. (79), ayrıca, yıkanan ve yıkanmayan örnekler için her bir santimetredeki penetrasyon yoğunluklarını karşılaştırarak ilk 3 cm'deki farkların önemli ($p < 0.001$), 4. ve 5.cm'deki farkların ise önemsiz olduğunu saptamışlar.

Oda ısısındaki değişikliklerin SMPT sonuçlarında önemli değişikliklere sebebiyet verdiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. SMPT'nin eleştiri alan önemli noktalarından biri, aynı örnekler üzerinde belli bir sürede çok yönlü testler uygulandığında oldukça farklı sonuçlar elde edilmesidir. Bunun sebebinin kullanılan spermanın kalitesi veya ortam ısısının değişkenliğine bağlanabileceği bildirilmiştir (51).

Galli ve arkadaşları (33), Servikal Mukus Penetrasyon Testin de dondurulmuş boğa sperması kullanarak, penetrasyon mesafelerini 90 dakika süreyle 37°C ve 21°C'de sırasıyla 28.5 mm ve 18.1 mm saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmacılar spermatozoonların migrasyon değerleri arasındaki bu farklılığı testin değişik ısılarda yapılmış olmasına bağlamışlardır.

Yogev ve arkadaşları (91), değişen inkübasyon ısısının spermatozoonun hızını arttırarak daha iyi bir penetrasyona yol açtığını bildirmişlerdir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada payet yöntemine göre dondurulmuş on boğaya ait spermalar kullanıldı.

5.1. Spermanın Dondurulması

Çalışmada, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı'nda barındırılan Holstein ırkı boğalardan çeşitli tarihlerde haftada iki kez sperma alındı. Sperma alma zamanı boyunca boğalar beslenme, ışık ve ısı yönünden kontrol altında tutuldu. Alınan spermalar Laiciphos W488 sulandırıcısı ile sulandırıldı. Sperma tekniğine uygun olarak payet yöntemine göre dondurularak donma kazanına aktarıldı. Her bir boğa için ortalama olarak 70-80 payet rastgele alınarak tüm çalışma boyunca aynı saha konteynerinde (9 litre) depolandı. Kalanlar da sahaya sun'i tohumlamalar için nakledildi. Konteynerdeki sıvı azot seviyesi haftada iki kez kontrol edildi ve en az 2/3 oranında dolu olması sağlandı.

5.2. Servikal Mukusun Toplanması

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliğinde östrustaki sağlıklı ineklerden düzenli olarak mukus alındı. Bu amaçla, vulva ve perianal bölge nemli bir sünger yardımı ile temizlendi ve spekulum ile servikse ulaşıldı. Tek kullanımlık steril sun'i tohumlama pistole kılıfına 50 ml'lik enjektör adapte edildi. Mukus, serviksin kaudalinden veya vaginanın kranialinden aspire edilerek steril bir cam küvete aktarıldı (4, 5, 6, 79). Toplanan mukus örnekleri en kısa zamanda +4°C'lik soğuk zincir içinde laboratuvar ortamına taşındı.

5.3. Servikal Mukusun Değerlendirilmesi

Servikal Mukus Penetrasyon Testinde, tohumlama zamanına yakın ineklerden alınan servikal mukus örnekleri kullanıldı (12, 36). Toplanan mukusların homojen ve bir örnek olmasına özen gösterildi.

Servikal mukustaki hücresel birikintiler ve lökositler spermatozoonların migrasyonunu engellediğinden, toplanmış olan servikal mukusun enfekte olup

olmadığını belirlemek amacıyla çalışmada kullanılmadan önce mukus White-Side testine tabi tutuldu (4).

White Side Testi:

Bir ml servikal mukus ve 1 ml %5'lik NaOH solüsyonu, bir test tüpü içerisinde kaynama noktasına kadar ısıtıldı. Isıtma işlemi sonrası numunede sarı rengin görülmesi, enfeksiyonun veya kontaminasyonun pozitif göstergesi olarak kabul edildi ve enfekte olarak değerlendirilen mukuslar çalışmada kullanılmadı (4).

5.4. Servikal Mukusun Saklanması

Toplanan mukus örnekleri steril cam küvetlere konuldu. Dehidrasyondan korumak için bir tıkaç ile cam küvetin ağzı sıkıca kapatıldı. Mukus örnekleri buzdolabında +4°C'de üç güne kadar saklanabilmesine rağmen (5, 55, 79), toplandıktan sonra 24 saatten daha fazla süre geçmiş olan mukus örnekleri çalışmada kullanılmadı.

5.5. Servikal Mukus Penetrasyon Testi

Test için kullanılacak servikal mukus, enjektör ve plastik bir hortum vasıtasıyla oluşturulan negatif basınç yardımıyla 0.25 ml hacmindeki şeffaf payetlerin kapalı olan arka ucuna kadar çekildi (Şekil 1. 2) ve 37°C'de 5 dakika dik olarak bekletildi. Bekletme sonrasında hava kabarcığı oluşan payetler kabarcığın bulunduğu noktaya göre değerlendirildi. İlk 2 cm'nin üstünde hava kabarcığı bulunan payetler değerlendirme dışı bırakıldı. İlk 2 cm'nin altında oluşan hava kabarcıkları ise ince bir tel vasıtasıyla payetin kapalı olan arka ucundan açık olan ön ucuna doğru tıpa ittilerilerek giderildi ve mukusun toplu iğne başı büyüklüğünde hafifçe payetin ucundan çıkması sağlandı. Payetten çıkan mukus non-toksik bir küvet içerisinde bulunan ve 37°C'de 30 saniyelik sürede eritilen spermayla dik (90 derecelik açı ile) bir şekilde (payetin plastik kısmı küvete değmeksizin) temas ettirilerek örnekler etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3).

5.6. Grupların Oluşturulması

Servikal Mukus Penetrasyon Testin'de (SMPT) inkübasyonlar, 15 ve 45 dakikalık iki farklı sürede ve 37°C, 39°C ve 41°C'lik üç farklı ısıda gerçekleştirildi. Farklı ısı ve sürelerle göre toplam altı grup oluşturuldu.

1. Grup

Örnekler 37°C'lik ortamda 15 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı.

2. Grup

Örnekler 37°C'lik ortamda 45 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı.

3. Grup

Örnekler 39°C'lik ortamda 15 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı.

4. Grup

Örnekler 39°C'lik ortamda 45 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı.

5. Grup

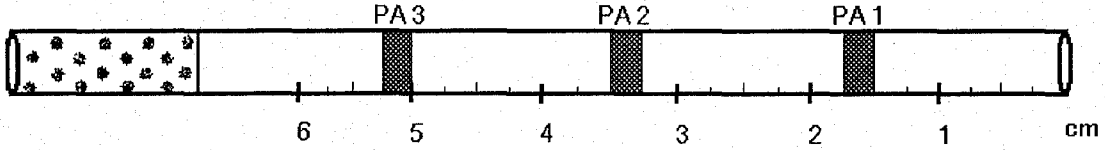
Örnekler 41°C'lik ortamda 15 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı.

6. Grup

Örnekler 41°C'lik ortamda 45 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı.

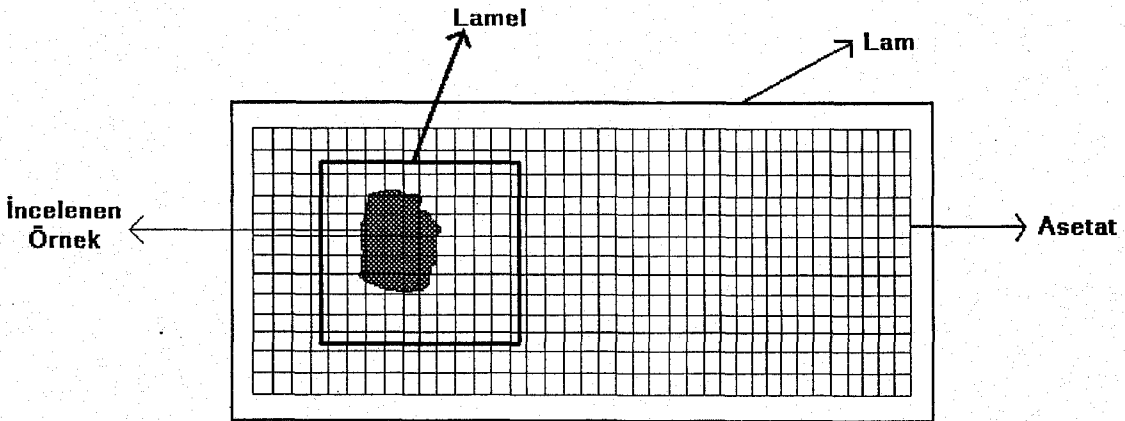
İnkübasyon sonrasında payetler inkübasyon havuzundan çıkartılarak sıvı azot buharında donduruldu. Donma sonrasında sperma örneklerini içeren payetlerin ilk 1.5 cm'lik bölüm kesilerek değerlendirme dışı bırakıldı. 1.5 cm'nin atılmasından sonra gelen 0.25 cm'lik (1.5-1.75 cm'ler arası) bölümün içeriği (1. penetrasyon aralığı), ince bir telle payetin arka ucundaki tıpaç öne doğru ittilerilerek özel olarak hazırlanmış lam üzerine alındı (Şekil 4). Ardından bir sonraki 1.5 cm atıldı ve 0.25 cm'lik bölüm (3.25-3.5 cm'ler arası) ikinci bir lama alındı (2. penetrasyon aralığı). Payetten tekrar 1.5 cm atıldı ve sonrasındaki

0.25 cm'lik bölüm (5.0-5.25 cm'ler arası) üçüncü bir lama aktarıldı (3. penetrasyon aralığı). Örnekler lamel ile kapatılmasından sonra faz-kontrast mikroskopta 200 büyütmede bölgeye ulaşabilen spermatozoon sayıları tespit edildi. Gebelik sonuçlarının etkisinde kalmamak için boğaların fertilité değerlendirmeleri çalışmanın bitiminde gerçekleştirildi.

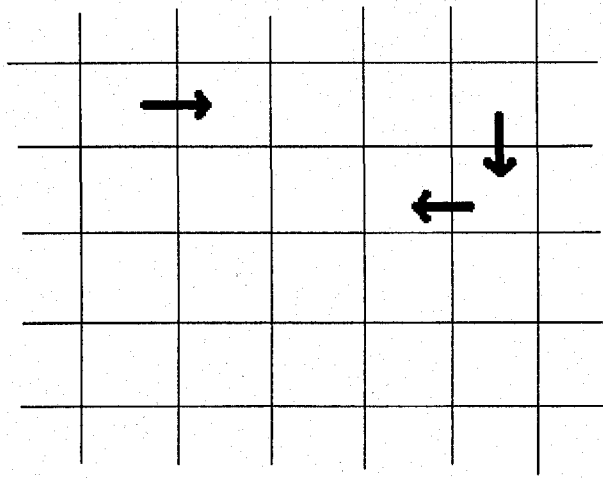


Şekil 4: Penetrasyon Aralıklarının Payet Üzerinde Şematize Görünümü

İncelemelerde sayımın sağlıklı olmasını sağlamak ve kolaylaştırmak amacıyla özel bir düzenek hazırlandı. Bu amaçla bilgisayar ortamında 0.1 mm ebatında mikro kareler çizildi. Yapılan bu çizimlerin serigrafideki film çıkışları asetata alındı ve lamin yüzeyine yapıştırılarak özel düzenek oluşturuldu (Şekil 5). Spermatozoonların sayımına damlanın lam üzerine yayıldığı en üst bölümden başlandı ve şekilde görüldüğü gibi belli bir sıra takip edilerek devam edildi (Şekil 6). Böylece hücreler, sol üst köşedeki kareden başlayarak damlanın yayıldığı en sağdaki kareye kadar sayıldı. Sonrasında bir alttaki kareye geçildi ve bu kez sol tarafa doğru sayım devam ettirildi (45).



Şekil 5: Spermatozoon Sayımında Kullanılan Özel Düzenek



Şekil 6: Spermatozoonların Sayılma Sırası

5.7. Spermatozoonların Özelliklerinin İncelenmesi

Servikal mukus penetrasyon testi öncesinde sperma 37°C'de 30 saniyede eritildi (83) ve inkübasyon için hazırlanmış sperma örneğinden birer damla alınarak motilite ve morfolojik muayene için kullanıldı (42, 45).

5.7.1. Motilite Muayenesi

Sperma örneği 37°C' deki lam üzerine konuldu. Faz-kontrast mikroskopta 200 büyütmede, ileriye doğru hareket eden hücreler dikkate alınarak motilite incelendi. Üç değişik sahadaki motilite oranlarının ortalaması alındı ve yüzde değerleri kaydedildi.

5.7.2. Morfolojik Muayene

Morfolojik muayene için Hancock solüsyonundan yararlanıldı.

Hancock'un formol salin solüsyonunun hazırlanması (40):

Formalin (%35'lik)	81 ml
NaCl ana solüsyonu	18.75 ml
Tampon ana solüsyonu	12.50 ml

Aqua bidest q.s.p.62.5 ml

NaCl ana solüsyonunun hazırlanması:

NaCl 1.13 gr

Aqua bidest q.s.p 62.5

Tampon ana solüsyonunun hazırlanması:

a) $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.71 g

Aqua bidest q.s.p 62.5 ml

b) $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 2.78 g

Aqua bidest q.s.p 62.5 ml

25 ml a + 10ml b solüsyonu karıştırılarak tampon ana solüsyonu hazırlandı.

İnkübasyon için eritilmiş spermadan bir damla sperma alınarak Hancock solüsyonuna konduktan sonra faz–kontrast mikroskopta immersiyon objektifte incelendi ve 200 hücre sayılarak yüzde değerleri kaydedildi.

Morfolojik muayeneler:

a) Akrozom bozuklukları (AB),

b) Diğer morfolojik bozukluklar (DMB),

c) Toplam morfolojik bozukluklar (TMB) olmak üzere 3 bölümde değerlendirildi.

Her grupta belirtilen tüm işlemler 10 kez tekrarlandı.

5.8. Sun'i Tohumlama Uygulamaları

Çalışmada kullanılan 10 boğaya ait donmuş sperma ile Çerkezköy ve Silivri bölgelerinde halk elinde bulunan dişi sığırlar östrus belirtilerinden 10-12 saat sonra rekto-vaginal yöntemle intrauterin olarak bir kez tohumlandı.

Tohumlamalar yılın 12 ayı boyunca devam etti. Çalışmada yılın değişik mevsimlerinde;

1 no'lu boğanın spermasıyla 423,

2 no'lu boğanın spermasıyla 387,

3 no'lu boğanın spermasıyla 576,

4 no'lu boğanın spermasıyla 164,

5 no'lu boğanın spermasıyla 341,

6 no'lu boğanın spermasıyla 262,

7 no'lu boğanın spermasıyla 260,

8 no'lu boğanın spermasıyla 418,

9 no'lu boğanın spermasıyla 272 ve

10 no'lu boğanın spermasıyla 434 adet olmak üzere toplam 3537 dişi sığır veteriner hekim tarafından tohumlandı.

İneklerin kayıtları incelendi ve tohumlamadan sonraki 60-90. günlere kadar tekrar östrus belirlenmeyen inekler gebe kabul edildi.

Fertilite Gruplarının Oluşturulması:

Çalışmada kullanılan boğalara ait donmuş spermayla gerçekleştirilen tohumlamalar neticesinde elde edilen gebelik oranları boğalara göre farklılık gösterdi ($p < 0.05$). 8, 9 ve 10 no'lu boğalara göre 1, 2 ve 3 no'lu boğalarda

saptanan fertilite oranlarının önemli oranlarda yüksek olduğu saptandı (Tablo 5). Böylece;

1, 2 ve 3 no'lu boğalar 1. fertilite grubunu,

8, 9 ve 10 no'lu boğalar 3. fertilite grubunu ve

diğer 4, 5, 6 ve 7 no'lu boğalar ise 2. fertilite grubunu oluşturdu (Tablo 6).

5.9. Verilerin Değerlendirilmesi

Spermatozoonların servikal mukusa penetre olma yeteneği üzerine ısı, süre ve boğa etkilerini belirlemek amacıyla General Linear Model (GLM) prosedürü uygulandı. Alt faktörler arasındaki önem kontrolleri Contrast-test ile belirlendi.

Spermatolojik özellikler ve spermatozoon yoğunlukları yönünden gruplar arası istatistiki karşılaştırmalarda Variyans analizi metodu uygulandı ve gruplar arası önem kontrolleri Duncan-Testi ile yapıldı (Duncan, 1955). İstatistik hesaplamalar için SPSS program paketinden yararlanıldı (25, 69).

Spermatolojik özellikler ile fertilite ve spermatozoon yoğunlukları arasındaki ilişki için Pearson korelasyon yöntemi kullanıldı.

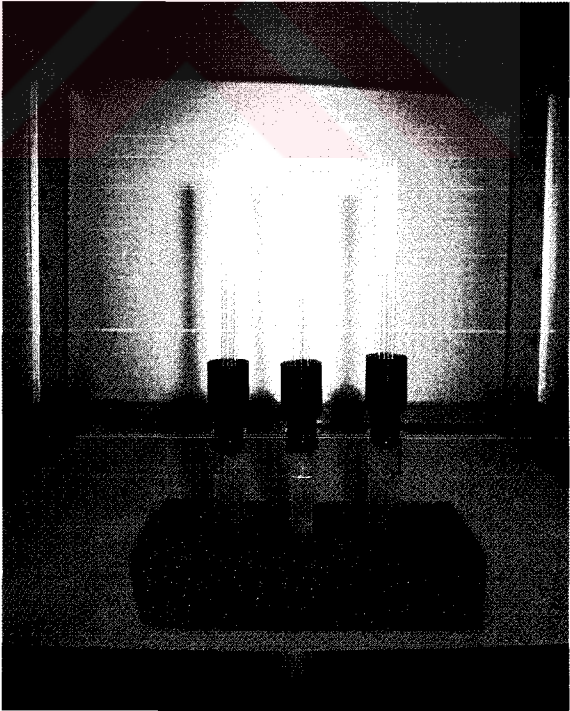
Gebelik oranları için gruplar arası istatistiki karşılaştırmalar χ^2 -Testi (chi square) ile yapıldı (57).



Şekil 1: Mukus Penetrasyon Testinde Kullanılan Malzemeler



Şekil 2: Sevikal Mukusun Payete Çekilmesi



Şekil 3: Etüv İçerisinde İnkübasyona Bırakılan Payetlerin Görünümü

6. BULGULAR

Boğaların payetlerde dondurulmuş spermaları, 37°C'de 30 saniyelik su banyosunda eritildi ve motilite, akrozom bozuklukları (AB), diğer morfolojik bozukluklar (DMB) ve toplam morfolojik bozukluklar (TMB) değerlendirildi. Boğalarda saptanan spermatolojik özellikler Tablo 1'de sunulmuştur. % motilite değerleri boğalara göre sırasıyla 63.50, 59.50, 55.51, 56.00, 52.50, 55.50, 56.00, 57.50, 54.50, ve 59.00, % AB bulguları; 2.40, 2.30, 3.85, 3.45, 3.30, 2.80, 4.50, 4.05, 3.15 ve 3.75 % DMB; 6.55, 9.90, 10.12, 9.30, 5.55, 15.10, 9.40, 12.00, 10.60 ve 13.15 ve % TMB; 8.95, 12.20, 13.97, 12.75, 8.85, 17.90, 13.90, 16.05, 13.75 ve 16.90 değerleri tespit edildi. Tüm spermatolojik değerler boğalara göre önemli farklılıklar gösterdi ($P < 0.05$).

Sperma servikal mukus penetrasyon testinde (SMPT), farklı ısı ve süre gruplarında elde edilen migrasyon yoğunlukları Tablo 2'de sunulmuştur. Süre ve boğa faktörü gözardı edildiğinde birinci penetrasyon aralığında (PA1) 37°C, 39°C ve 41°C'lik inkübasyonlarda sırasıyla ortalama 826.22, 1058.10 ve 1376.66 spermatozoon tespit edilmiş ve aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). İkinci ve üçüncü penetrasyon aralıklarında saptanan spermatozoon sayıları farklı ısı inkübasyonlarında benzer bulunmuştur. 37°C, 39°C ve 41°C'lik inkübasyonlarda sırasıyla PA2'de; 83.36, 81.90 ve 79.24, PA3'te; 33.32, 21.85 ve 10.68 spermatozoon saptanmıştır.

Isı ve boğa faktörleri göz ardı edildiğinde birinci ($p < 0.001$) ve ikinci ($p < 0.01$) penetrasyon aralıklarında inkübasyon süresinin artışına bağlı olarak migrasyon yoğunluğunda önemli bir artış görüldü. On beş ve 45 dakikalık inkübasyonların neticesinde sırasıyla PA1'de 598.35 ve 1575.63, PA2'de 42.09, 120.90 ve PA3'te; 8.77 ve 35.12 spermatozoon saptanmıştır (Tablo 2).

SMPT'de inkübasyon ısı ile süre faktörlerinin birlikte etkisi PA1'de istatistiksel olarak önemsiz, PA2 ($p < 0.05$) ve PA3'de ($p < 0.001$) ise önemli bulunmuştur. Inkübasyon süresi ile boğa faktörü arasındaki etkileşim her üç penetrasyon aralığında da önemli bulunmasına rağmen ($p < 0.05$), ısı ile boğa

arasındaki etkileşimin her üç penetrasyon aralığında önemsiz olduğu saptanmıştır (Tablo 2).

Farklı inkübasyon ısı ve sürelerinin ortalaması dikkate alındığında boğalara göre sırasıyla PA1'de 1570.18, 1274.32, 1186.43, 772.12, 1165.37, 717.08, 414.20, 1281.68, 1247.05 ve 1241.45, PA2'de 123.35, 77.70, 99.57, 49.50, 100.80, 70.33, 23.92, 97.32, 77.73 ve 94.75, PA 3'te 31.85, 36.00, 30.98, 15.37, 27.87, 9.73, 5.30, 25.17, 14.40 ve 22.78 spermatozoon saptanmıştır. Buna göre sadece 1. penetrasyon aralığında saptanan spermatozoon sayıları boğalara göre önemli farklılıklar göstermiştir ($p < 0.05$ Tablo 2).

Farklı penetrasyon aralıklarında motilite ve morfolojik özellikleri ile spermatozoon yoğunluğu arasındaki korelasyon Tablo 3 sunulmuştur. Tabloda gösterilen spermatolojik özellikler ile penetrasyon aralıklarındaki (PA1, PA2 ve PA3) spermatozoon yoğunlukları arasında önemli bir korelasyonun olmadığı saptanmıştır.

Donmuş boğa spermasında eritme sonrasında saptanan spermatolojik özellikler ile tohumlamalar sonrasında elde edilen fertilite oranları arasındaki ilişki karşılaştırılmış ve bu ilişki Tablo 4'te özetlenmiştir. Çalışmada kullanılan 10 boğaya ait spermatolojik özelliklerin ortalaması ($n=10$ boğax10 tekrar=100) ve toplam 3537 tohumlama sonrası saptanan gebelik oranları istatistiksel anlamda değerlendirilmiştir. Buna göre motilite, akrozomal bozukluklar, diğer morfolojik bozukluklar ile fertilite arasında korelasyonun olmadığı, ancak toplam morfolojik bozukluklar ile fertilite arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu ($p < 0.05$) saptanmıştır.

Tohumlamalar sonrası saptanan % gebelik oranları boğalara göre sırasıyla; 79.9, 78.6, 76.0, 75.0, 72.1, 70.3, 69.5, 69.1, 67.7 ve 67.1 olarak saptanmıştır (Tablo 5). Buna göre 1, 2 ve 3 no'lu boğalardaki gebelik oranlarının 8, 9 ve 10 no'lu boğalara göre yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu verilere göre 3 fertilite grubu oluşturulmuştur. Gebelik oranları yüksek bulunan 1, 2 ve 3 no'lu boğalar 1. Fertilite Grubunu, gebelik oranları düşük bulunan 8, 9 ve 10 no'lu boğalar 3. Fertilite grubunu oluşturmuştur. Geriye kalan 4, 5, 6 ve 7 no'lu boğalar ise 2. Fertilite grubu içerisinde değerlendirilmiştir (Tablo 6).

Böylece fertilité gruplarına göre sırasıyla 860 tohumlamada %77.6, 1449 tohumlamada %71.4 ve 1228 tohumlamada %68.0 gebelik oranı bulunmuş ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Eritme sonrası incelenen tüm spermatolojik özellikler fertilité gruplarına göre önemli farklılıklar göstermiştir ($p < 0.05$, Tablo 7). Gruplara göre sırasıyla %59.5, %55.0 ve %57.0 motilité, %2.8, %3.5 ve %3.7 AB, %8.8, %9.8 ve %11.9 DMB, %11.7, %13.4 ve %15.6 TMB bulunmuştur.

Fertilité gruplarının penetrasyon aralıklarına göre spermatozoon yoğunluğu Tablo 8'de sunulmuştur. Birinci penetrasyon aralığındaki spermatozoon yoğunluğu 1, 2. ve 3. gruplarda sırasıyla 1306.29, 741.43 ve 1210.82 olarak tespit edilmiş ve 2. gruptaki yoğunluğun düşük olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). İkinci penetrasyon aralığında spermatozoon yoğunlukları sırasıyla 97.36, 59.13 ve 86.62 olarak bulunmuş ve bu penetrasyon aralığında da en düşük bulgular 2. grupta saptanmıştır ($p < 0.05$). Üçüncü penetrasyon aralığında ise sırasıyla ortalama 32.02, 14.08 ve 20.01 spermatozoon bulunmuş ve en yüksek veriler 1. fertilité grubunda elde edilmiştir ($p < 0.05$).

Farklı inkübasyon tekniklerinde penetrasyon aralıklarında saptanan spermatozoon yoğunluklarının fertilité gruplarına göre karşılaştırılması tablo 9'da gösterildiği gibidir. Buna göre 37°C-15 dakikalık ve 39°C-15 dakikalık inkübasyon tekniklerinde her üç penetrasyon aralıklarında da saptanan spermatozoon yoğunlukları fertilité gruplarına göre değişmemiştir. 37°C-45 dakikalık inkübasyon tekniğinde her üç penetrasyon aralığında (PA1: $p < 0.01$, PA2 ve PA3: $p < 0.05$), 39°C-45dk ve 41°C-45dakikalık inkübasyon tekniklerinde 1. penetrasyon aralıklarında ($p < 0.05$) ve 41°C-15 dakika inkübasyon tekniğinde ise 3. penetrasyon aralığında ($p < 0.01$) saptanan spermatozoon sayıları fertilité gruplarına göre farklılıklar göstermiştir.

Çalışmada kullanılan boğaların spermaları farklı ısı ve sürelerde mukus penetrasyon testine tabi tutulmuş ve boğalarda saptanan spermatozoon yoğunlukları tablo 10'da gösterildiği gibidir.



Tablo 1: Boğalarda Saptanan % Spermatolojik Özellikler ve Boğalar Arasındaki Farklılıkların Duncan-Testi Sonuçları (n=10).

BOĞA NO	Motilite %		Akrozom %		DMB %		TMB %	
	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$
1	63,50 ^a	0,42	2,40 ^{de}	0,22	6,55 ^d	0,27	8,95 ^d	0,46
2	59,50 ^b	0,61	2,30 ^e	0,17	9,90 ^c	0,30	12,20 ^c	0,33
3	55,51 ^e	0,55	3,85 ^{ab}	0,34	10,12 ^c	0,42	13,97 ^c	0,72
4	56,00 ^{de}	0,64	3,45 ^{bc}	0,20	9,30 ^c	0,32	12,75 ^c	0,37
5	52,50 ^f	0,33	3,30 ^{bcd}	0,20	5,55 ^d	0,22	8,85 ^d	0,39
6	55,50 ^e	0,54	2,80 ^{cde}	0,19	15,10 ^a	0,82	17,90 ^a	0,51
7	56,00 ^{de}	0,64	4,50 ^a	0,43	9,40 ^c	0,47	13,90 ^c	0,82
8	57,50 ^{cd}	0,53	4,05 ^{ab}	0,30	12,00 ^b	0,49	16,05 ^b	0,58
9	54,50 ^e	0,54	3,15 ^{bcde}	0,27	10,60 ^c	0,56	13,75 ^c	0,67
10	59,00 ^{bc}	0,64	3,75 ^{ab}	0,48	13,15 ^b	0,68	16,90 ^{ab}	0,61

^{abcdef} Aynı sütunda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (p < 0,05)

DMB: Diğer Morfolojik Bozukluklar,
TMB: Toplam Morfolojik Bozukluklar.

Tablo 2: Sperma Servikal Mukus Penetrasyon Testi'nde Farklı Isı ve Süre Guruplarında Elde Edilen Spermatozoon Yoğunlukları.

FAKTÖR	N	PA1		PA2)		PA3	
		$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$
ISI		***					
37°C	200	826,22 ^c	73,14	83,36	6,82	33,32	2,95
39°C	200	1058,10 ^b	73,14	81,90	6,82	21,85	2,95
41°C	200	1376,66 ^a	73,14	79,24	6,82	10,68	2,95
SÜRE		***		**			
15 dk.	300	598,35 ^b	59,71	42,09 ^b	5,57	8,77	2,41
45dk.	300	1575,63 ^a	59,71	120,90 ^a	5,57	35,12	2,41
BOĞA NO		*					
1	60	1570,18 ^a	133,53	123,35	12,45	31,85	5,39
2	60	1274,32 ^{ab}	133,53	77,70	12,45	36,00	5,39
3	60	1186,43 ^b	133,53	99,57	12,45	30,98	5,39
4	60	772,12 ^c	133,53	49,50	12,45	15,37	5,39
5	60	1165,37 ^b	133,53	100,80	12,45	27,87	5,39
6	60	717,08 ^c	133,53	70,33	12,45	9,73	5,39
7	60	414,20 ^c	133,53	23,92	12,45	5,30	5,39
8	60	1281,68 ^{ab}	133,53	97,32	12,45	25,17	5,39
9	60	1247,05 ^{ab}	133,53	77,73	12,45	14,40	5,39
10	60	1241,45 ^{ab}	133,53	94,75	12,45	22,78	5,39
Isı * Süre				*		***	
Süre * Boğa		*		*		*	
Isı * Boğa							

^{abc} Aynı sütunda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001).

PA: Penetrasyon Aralığı.

Tablo 3: Farklı Penetrasyon Aralıklarında Motilite ve Morfolojik Özellikler ile Spermatozoon Yoğunluğu Arasındaki Korelasyon.

Spermatolojik Özellikler	PA 1	PA 2	PA 3
Motilite	0,039	0,048	0,043
Akrozom Bozuklukları	0,009	-0,012	-0,025
Diğer Morfolojik Bozukluklar	-0,037	0,010	-0,008
Toplam Morfolojik Bozukluklar	-0,027	0,003	-0,017

PA: Penetrasyon Aralığı (P> 0.05)

Tablo 4 :Spermatolojik Özellikler ile Fertilite Arasındaki Korelasyon.

Spermatolojik Özellikler	Gebelik
Motilite	0,267
Akrozom Bozuklukları	-0,491
Diğer Morfolojik Bozukluklar	-0,600
Toplam Morfolojik Bozukluklar	-0,642*

(* p< 0.05)

Tablo 5: Sun'i Tohumlama Sonrası Boğalarda Elde Edilen Gebelik Oranları.

Boğa No	Tohumlanan Dişi Sayısı	Gebe Dişi Sayısı	Gebelik Oranı %
1	164	131	79,9 ^{ac}
2	262	206	78,6 ^a
3	434	330	76,0 ^{abd}
4	260	195	75,0 ^{abcde}
5	341	246	72,1 ^{bf}
6	576	405	70,3 ^{cf}
7	272	189	69,5 ^{df}
8	418	289	69,1 ^f
9	387	262	67,7 ^{ef}
10	423	284	67,1 ^f

^{abcdef} Aynı sütunda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$).

Tablo 6: Tohumlama Sonrası Saptanan Fertilite Oranlarına Göre Boğaların Gruplandırılması ve Gruplara Göre Fertilite Oranlarının Karşılaştırılması.

Fertilite Grupları	Boğa Sayısı	Tohumlanan Dişi Sayısı	Gebe Dişi Sayısı	Gebelik Oranı %
1	3	860	667	77,6 ^a
2	4	1449	1035	71,4 ^b
3	3	1228	835	68,0 ^c

^{abc} Aynı sütunda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$).

Tablo 7: Fertilité Grúplarında Saptanan Spermatolojik Özellikler (%).

Fertilité Grúpları	n	Motilité %		Akrozom %		DMB %		TMB %	
		$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$
1	30	59,5 ^a	0,39	2,8 ^b	0,15	8,8 ^c	0,23	11,7 ^c	0,34
2	40	55,0 ^c	0,29	3,5 ^a	0,14	9,8 ^b	0,34	13,4 ^b	0,39
3	30	57,0 ^b	0,36	3,7 ^a	0,21	11,9 ^a	0,34	15,6 ^a	0,37

^{abc} Aynı sütunda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$).

DMB: Diğer Morfolojik Bozukluklar,

TMB: Toplam Morfolojik Bozukluklar.

Tablo 8: Fertilité Grúplarına Göre Penetrasyon Aralıklarında Saptanan Spermatozoon Yoğunlukları.

Grúp No	n	PA 1		PA 2		PA 3	
		$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$
1	180	1306,29 ^a	90,71	97,36 ^a	8,75	32,02 ^a	4,58
2	240	741,43 ^b	66,53	59,13 ^b	5,45	14,08 ^b	1,95
3	180	1210,82 ^a	88,10	86,62 ^a	7,97	20,01 ^b	2,83

^{ab} Aynı sütunda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$).

PA: Penetrasyon Aralığı

Tablo 9 : Farklı İnkübasyon Tekniklerinde Penetrasyon Aralıklarında Saptanan Spermatozoon Yoğunluklarının Fertilite Gruplarına Göre Karşılaştırılması.

İnkübasyon Isı ve Süresi	Grup No :	n	PA 1		PA 2		PA 3	
			$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$
37 °C-15 dk.	1	30	285,30	89,04	42,33	13,41	21,73	8,44
	2	40	218,78	68,38	24,48	6,27	7,40	2,65
	3	30	318,03	87,76	34,90	8,58	9,40	2,61
37 °C-45 dk.			**		*		*	
	1	30	1761,53 ^a	225,33	147,47 ^{ab}	24,00	81,33 ^a	17,11
	2	40	874,48 ^b	174,37	95,33 ^b	12,41	33,95 ^b	5,93
	3	30	1685,57 ^a	226,43	171,27 ^a	21,50	54,50 ^{ab}	10,40
39 °C-15 dk.	1	30	844,70	196,24	65,37	15,01	15,87	5,73
	2	40	396,18	109,75	32,50	8,20	7,00	2,68
	3	30	908,27	207,30	43,63	7,86	5,97	1,74
39 °C-45 dk.			*					
	1	30	1826,03 ^a	225,98	155,60	26,99	52,83	15,16
	2	40	1058,23 ^b	188,96	84,5	16,95	25,48	6,72
	3	30	1535,77 ^{ab}	225,70	125,37	23,47	27,67	7,57
41 °C-15 dk.							**	
	1	30	1012,13	212,31	64,90	18,04	11,50 ^a	4,58
	2	40	538,18	135,82	42,98	13,09	1,63 ^b	0,65
	3	30	1077,57	220,62	36,53	13,01	1,90 ^b	0,78
41 °C-45 dk.			*					
	1	30	2332,17 ^a	173,79	125,57	23,68	14,40	6,10
	2	40	1517,33 ^b	208,11	87,03	17,97	11,95	5,94
	3	30	2015,17 ^{ab}	208,66	127,90	24,99	25,27	8,88

^{ab} Aynı inkübasyon tekniğine ait sütunda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (* p< 0.05, ** p< 0.01).

Tablo 10: Farklı Inkübasyon Tekniklerinde ve Penetrasyon Araçlarının Saptanan Spermatozoon Sayıları Göre Karşılaştırılması (n=10)

İNKÜBASYON TEKNİKLERİ															
Boğa No:	37°C- 15dk.			37°C - 45dk.			39°C – 15dk.			39°C – 45dk.			41°C – 15dk.		
	PA1	PA2	PA3	PA1	PA2	PA3	PA1	PA2	PA3	PA1	PA2	PA3	PA1	PA2	PA3
1	267.0	59.6	33.2 ^a	2270.0 ^a	220.6 ^a	84.5 ^{ab}	1050.6	78.2 ^a	12.9 ^{ab}	2270.0 ^a	207.5 ^a	33.2	1053.5	40.1 ^{bc}	7.0 ^b
2	405.9	17.7	17.8 ^{ab}	1995.5 ^{ab}	108.6 ^{bc}	110.4 ^a	506.5	46.4 ^{abc}	8.0 ^{ab}	1496.5 ^{ab}	112.6 ^{abc}	62.6	1001.2	33.1 ^{bc}	2.8 ^b
3	183.0	49.7	14.2 ^{ab}	1019.1 ^{bcd}	113.2 ^{abc}	49.1 ^{ab}	977.0	71.5 ^{ab}	26.7 ^a	1711.6 ^{ab}	146.7 ^{ab}	62.7	981.7	121.5 ^a	24.7 ^a
4	64.9	10.2	1.7 ^b	689.1 ^{cd}	91.3 ^{bc}	30.3 ^b	370.4	6.8 ^c	2.2 ^b	1700.7 ^{ab}	96.3 ^{abc}	32.8	403.5	6.2 ^c	0.8 ^b
5	472.6	50.0	20.1 ^{ab}	1259.5 ^{abcd}	95.1 ^{bc}	50.4 ^{ab}	520.8	59.3 ^{abc}	16.0 ^{ab}	1777.0 ^a	154.1 ^{ab}	56.6	968.8	97.3 ^{ab}	3.3 ^b
6	202.1	30.2	4.9 ^{ab}	1036.6 ^{bcd}	119.9 ^{abc}	37.8 ^b	252.2	52.9 ^{abc}	5.3 ^b	538.7 ^{bc}	71.9 ^{bc}	7.0	541.4	53.8 ^{abc}	1.8 ^b
7	135.5	7.5	2.9 ^b	512.7 ^d	75.0 ^c	17.3 ^b	441.3	11.0 ^{bc}	4.5 ^b	216.5 ^c	15.8 ^c	5.5	239.0	14.6 ^{bc}	0.6 ^b
8	466.1	19.1	3.4 ^b	1972.1 ^{ab}	189.3 ^{ab}	58.4 ^{ab}	505.7	33.2 ^{abc}	2.9 ^b	1522.8 ^{ab}	127.8 ^{abc}	37.3	1212.8	59.7 ^{abc}	2.6 ^b
9)	199.0	33.3	14.2 ^{ab}	1790.0 ^{abc}	166.4 ^{abc}	44.3 ^b	963.8	34.5 ^{abc}	9.3 ^{ab}	1534.5 ^{ab}	134.0 ^{abc}	10.5	750.1	23.3 ^{bc}	2.3 ^b
10)	289.0	52.3	10.6 ^{ab}	1294.6 ^{abcd}	158.1 ^{abc}	60.8 ^{ab}	1255.3	63.2 ^{abc}	5.7 ^b	1550.0 ^{ab}	114.3 ^{abc}	35.2	1269.8	26.6 ^{bc}	0.8 ^b

abcd Aynı sütunda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (p<0,05).

7. TARTIŞMA

Hayvan ıslahında, özellikle sığır yetiştiriciliğinde sun'i tohumlamanın önemli bir yeri vardır (78). Hayvancılığı gelişmiş hemen bütün ülkeler kısa sürede genetik ilerleme sağlayabilmek için progeny-testing yöntemini başarıyla uygulamışlardır. Bu test de üstün verim ve genetik kapasiteli boğaların spermaları dondurularak, sun'i tohumlama yoluyla ülkedeki dişi sığırların tohumlanmasında kullanılmaktadır (30). Normalde doğal aşım yoluyla yılda bir boğa en fazla 100-150 dişiyi dölleyebilmektedirken, donmuş sperma ile yılda 20.000-50.000 dişi tohumlanabilmektedir (81). Bir boğadan elde edilen bir ejakülat ile yaklaşık 100-500 dişinin tohumlanabildiği göz önüne alındığında potansiyel fertilitesi düşük bir spermanın tohumlamada kullanılması durumunda yaşanacak olan ekonomik kayıp ta büyük olacaktır. Bu ejakulatların ve dondurulmuş spermanın tohumlamada kullanılmadan önce potansiyel fertilitésinin belirlenmesi büyük ekonomik değer taşımaktadır (78).

Gerek veteriner ve gerekse insan hekimliğinde spermanın fertiliteye olan etkileri çok yönlü olarak yoğun bir şekilde incelenmiştir. Spermanın kalitesini ve potansiyel fertilitésini belirlemek için çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler araştırılmış ve geliştirilmiştir (93). Spermanın değerlendirilmesinde kullanılan testler spermatozoonların canlılığı, motilitési ve morfolojisi ile ilgilidir (18, 20, 46, 79). Spermanın potansiyel fertilitésinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin her geçen gün artışı ve bu analizlerin tek başlarına yeterli olmadıkları bildirilmektedir (10, 17, 20, 47, 49, 51, 91).

Aşım sonrası spermatozoonların vaginadan fertilizasyon bölgesine doğru giderken karşılaştıkları ilk fiziksel bariyer servikstir ve spermatozoonların serviks içerisindeki göçü yeterli miktardaki ve kalitedeki servikal mukusa bağlıdır (20, 26, 27, 36, 51, 52). Spermatozoonun servikal mukusa penetre olmasından sonra, morfolojik olarak sağlam ve motil hücre oranının serviksin kranialinde kaudaline göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (5, 20, 91). Anil Kumar (5), servikal mukusun doğal olarak anormal morfolojiye sahip spermatozoonları filtre etme özelliği olduğunu, normal ve anormal morfolojiye sahip spermatozoonları birbirinden ayıran bir bariyer gibi davrandığını açıklamıştır. Serviksin anatomik yapı bozukluklarının veya servikal mukus sekresyonundaki anormalliklerin %5-

%10 oranında kısırlığa sebebiyet verdiği bildirilmektedir (51). Bu nedenle, sperma ile servikal mukus arasındaki etkileşimin belirlenmesinin fertilité değerlendirilmesi açısından büyük önem arz ettiği belirtilmiş ve çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır (20, 26, 36, 51, 52, 75, 87, 91).

Spermatozoon ile servikal mukus arasındaki etkileşimi değerlendirmek için uzun bir dönem "Postkoital Test" (PCT) yaygın olarak kullanılmıştır (27, 46, 51, 52). Ancak PCT sonuçlarının yorumları üzerindeki anlaşmazlıklar ve testin standardize edilememesi gibi birçok zorluklar bu alandaki çalışmaları sınırlandırmıştır. Sperma ile servikal mukus arasındaki etkileşimin değerlendirildiği testleri standardize etmek amacıyla "Slayt Testi" ve "Sperm Servikal Mukus Kontakt Testi" (SCMC) gibi değişik in vitro test metotları geliştirilmiştir (26, 51, 52).

Doğal çiftleşme esnasında, spermatozoonlar uterusu girmek için servikal mukus boyunca göç etmek zorundadır. Spermatozoonlar ovidukt'taki fonksiyonel sperma rezervuarına temelde uterusun kas hareketleri vasıtası ile transfer edilirler. Yeterli sayı ve kalitedeki spermatozoonların herhangi bir nedenle fertilizasyon bölgesine ulaşamadıklarında fertilizasyonun gerçekleşemeyeceği açıktır. Sperma hücrelerinin motilite yeteneklerinin belirlenmesinde in-vivo ortamda aşılacak olan fiziksel bariyerlerin "in vitro ortamda kullanılan migrasyon testleriyle" taklit edilebileceği bildirilmiştir (88). Kremer adlı araştırmacı sperma ile servikal mukus arasındaki etkileşimi değerlendirmek için heparinize edilmemiş cam kapillar tüpleri ve spermatozoonların kat ettiği mesafenin ölçülmesi için kalibre edilmiş penetrasyon metresini (penetration meter) kullanmıştır (55). Daha sonraları, içleri servikal mukusla dolu olan kapillar tüpler sperma ile inkübasyona tabi tutulmuş, 400 büyütmelek faz kontrast mikroskop altında spermatozoonların penetrasyon yetenekleri değerlendirilmiş ve bu yöntem "Kremer'in kapillar tüp metodu" veya "Kremer testi" adı verilmiş ve yaygın olarak kullanılmıştır (4, 5, 6, 18, 20, 23, 26, 27, 46, 49, 51, 52, 53, 55, 62, 63, 65, 74, 79, 91). İnsan sperma vericilerinin fertilitelerini in-vitro ortamda değerlendirmek için, spermatozoonların migrasyon çalışmalarında dişi insan (62, 74, 75) ve sığırların (18, 32, 46, 52, 53, 68, 79) servikal mukusu kullanılmıştır. Zamanla kapillar tüp metodunun

benimsenmesi ve testin in vitro uygulanması ile ilgili farklı teknikler ve değerlendirme kriterleri ortaya çıkmıştır. Kremer testinde 60 dakikalık inkübasyon sonucu 3 cm mesafedeki hareketli spermatozoonlar değerlendirilirken, Penetrak isimli araştırmacı 90 dakikalık inkübasyon sonucunda en uzağa giden öncü spermatozoonun kat ettiği mesafeyi esas almıştır (55, 91). Bunun yanında servikal mukus penetrasyon testinde inkübasyon için farklı ısı süreleri kullanılmıştır (4, 5, 6, 26, 46, 51, 52, 63, 79, 91).

İnsan ve boğa sperması ile yapılan çalışmalarda servikal mukus ile spermatozoon ilişkisinin önemli rol oynadığı bildirilmiş (26, 32, 36, 52) ve sperma-servikal mukus penetrasyon testi (SMPT) ile spermanın motilitesi (5, 6, 23, 26, 33, 46, 51, 68, 74, 87, 91) ve morfolojik bütünlük oranları arasında (5, 6, 20, 33, 46, 52) yüksek korelasyonların olduğu açıklanmıştır. İnsan hekimliğinde birbirinden bağımsız olarak yapılan pek çok çalışmada, spermatozoonların fertilizasyon kapasitesi ile servikal mukusa penetrasyonun korelasyonlu olduğu gösterilmiştir (11, 18, 27, 63, 68, 75, 87). Bu nedenle insanlarda erkek hastaların fertilité değerlendirmesinde SMPT'nin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (11, 26, 27, 51, 52, 63, 68, 75, 87). Ne var ki, çeşitli sperma parametreleri arasında bağlantı bulunmasına rağmen, ruminantlarda sperma hücrelerinin migrasyon kapasitesi ile in-vivo fertilité arasında bağlantı olduğunu bildiren çalışmacı sayısı son derecede azdır (88). Boğa spermatozoonlarının mukusa penetre olma yetenekleri ile fertilité arasındaki ilişkinin değerlendirildiği sınırlı sayıdaki çalışmalarda, SMPT sonuçları ile fertilité arasında pozitif bir ilişkinin bulunamadığı ileri sürülmüştür (33, 63, 88). Çalışmaların büyük çoğunluğunda spermatozoonların penetrasyon mesafeleri değerlendirmeye alınmıştır (4, 5, 53, 87). Özellikle insan hekimliğinde genel olarak SMPT'de 30 mm'lik penetrasyon mesafesi sınır değer olarak kabul edilmiş ve öncü spermatozoonun 30 mm'den daha fazla mesafe kat ettiği belirlenen örneklerin penetrasyon kabiliyetleri "iyi" olarak değerlendirilmiştir (4, 5, 68, 91). Bunun yanında Verberckmoes ve ark. (88), in-vivo fertilitenin daha kesin tahmin edilebilmesi için farklı in vitro test sistemlerinin kombine edilmesinin zorunlu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde Eggert Krause ve ark. (26) in-vitro SMPT'nin yalnızca spermatozoonların penetrasyon mesafelerinin

değerlendirilmesini değil, aynı zamanda mukus örneğine penetre olabilen spermatozoon sayısının, motilite kalitesinin ve progressive motil spermatozoonların hızlarının da değerlendirilmesini içerdiğini bildirmişler ve normal koşullar altında dişi genital kanalının en yukarısına ulaşmak için gerekli olan bu faktörlerin her birinin SMPT sonuçlarını etkilediğini açıklamışlardır. SMPT metotlarındaki gelişmelere rağmen, sonuçların laboratuvarlara ve kişilere göre farklılık gösterebildiği ve standardize edilememesi gibi sakıncalarının olduğu bildirilmektedir (74).

Sunulan çalışmada, incelenen spermatolojik özelliklerden motilite, akrozom bozuklukları (AB), diğer morfolojik bozukluklar (DMB) ve toplam morfolojik bozukluklar (TMB) ile penetrasyon aralıklarındaki migrasyon yoğunluğu arasında önemli derecede bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0.05$, Tablo 3). Boğa sperması üzerinde çalışma yapan araştırmacıların hemen tamamı bazı spermatolojik özellikler ile penetrasyon yeteneği arasında önemli ilişkiler bulmuşlardır. Ancak aynı spermatolojik özellikler için farklı görüşler ileri sürülmüştür (6, 18, 23, 27, 33, 46, 68, 74). Örneğin Anil Kumar ve ark. (6), boğa sperması ile yaptıkları çalışmada penetrasyon mesafesi ile eritme sonrası motilite ve akrozomal bütünlük arasında pozitif korelasyon ($p < 0.01$), anormal spermatozoon oranı arasında ise negatif korelasyon ($p < 0.01$) tespit etmişlerdir. Galli ve ark. (33), boğa sperması ile yaptıkları çalışmada, spermatozoonların penetrasyon mesafeleri ile akrozom bütünlüğü ve toplam spermatozoon bütünlüğü arasında önemli derecede doğrusal bir korelasyon saptamışlardır ($p < 0.001$). Jeulin ve ark. (46), kuyruk ya da orta kısma ait bozuklukların spermatozoonların servikal mukus içerisinde göç etmelerine engel olduğu halde baş bölgesine ait bozuklukların böyle bir soruna neden olmadığını bildirmişlerdir. Tam aksine Eggert Krause ve ark. (27) boyun ve kuyruk anomalilerinin penetrasyon mesafelerinde önemli rol oynamadığını, ancak baş anomalisine sahip olan spermatozoonların ise penetrasyon mesafelerinde önemli düşüşlere neden olduğunu saptamışlardır. Okuda ve ark. (68), taze boğa sperması ile yaptıkları çalışmalarında öncü spermatozoonların kat ettiği mesafe ile motilite arasında önemli derecede pozitif korelasyon bulmuşlar ($p < 0.05$), donmuş spermada ise önemli derecede bir ilişki saptayamamışlardır. Aynı

çalışmada araştırmacılar hem taze hem de donmuş spermada penetrasyon mesafesi ile morfolojik bütünlük arasında önemli bir ilişkinin bulunamadığını bildirmişlerdir. Yukarıda görüldüğü üzere herhangi bir spermatolojik özellik ile penetrasyon yeteneği arasında yakın ilişki olduğuna dair bir görüş birliği yoktur. Ayrıca sunulan çalışmada kullanılan boğaların gerek spermatolojik özellikleri ve gerekse sahadaki fertilitite oranları araştırıldıktan sonra seçilmeleri nedeniyle, boğaların tamamının üstün ve birbirlerine yakın özellikte oldukları kabul edilebilir. Dolayısıyla boğalarda saptanan spermatolojik bulguların nispeten benzer olmaları bu sonuca katkıda bulunmuş olabilir.

Çalışmada kullanılan boğaların tümünde eritme sonrası saptanan spermatolojik özellikler (Motilite, AB, DMB ve TMB), diğer araştırmacıların bulduğu değerlerle benzer özelliktedir (1, 70, 78, 84, 93). Motilite ve morfolojik bozukluklar bireylere göre önemli oranlarda farklıdır (Tablo 1). Çoğu araştırmacı spermatolojik özelliklerin boğalara göre değişken olduğunu bildirmiştir (39, 90, 92). Özellikle morfolojik bozukluklar yüksek fertiliteli boğalarda nispeten düşük olsa da, fertilitite oranları daha düşük boğalarda sperma kalitesinin düzenli bir şekilde düştüğüne ilişkin bir bulgu saptanmamıştır. Bu durum örnek sayısının azlığına ve canlı materyalin tümünün yüksek özelliklerdeki damızlıklardan oluşmasına bağlanabilir. Bununla birlikte Tablo 7’de birinci fertilitite grubunda saptanan DMB ve TMB oranları, 2. ve 3. gruplarda önemli oranlarda artmıştır. Yine aynı şekilde akrozomal bozuklukların 2. ve 3. gruplara göre 1. grupta önemli düzeyde düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Bu durum morfolojik bütünlüğün spermanın potansiyel fertilitesinin belirlenmesindeki önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Motilite bulgularında ise yine en yüksek motilite 1. fertilitite grubunda saptanmıştır (1., 2. ve 3. grupta sırasıyla %59.5, %55.0 ve %57.0). Ancak önceden beklenmedik bir şekilde düşük fertilitite grubundaki motilite oranı 2. fertilitite grubundan yüksek bulunmuştur. İkinci ve 3. gruptaki motilite ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunsa dahi 2 puan kadardır. Motilite oranlarının birbirlerine oldukça yakın olması ve motilite değerlendirmelerinde kullanılan subjektif inceleme yöntemi bu sonucun rastlantısal olabileceği sonucunu akla getirmektedir. Ancak 1. ve 3. gruplar arasındaki fertilitite oranlarında olduğu gibi motilite oranlarında da önemli fark

olması anlamlıdır. Ayrıca eritme sonrası toplam morfolojik bozukluk ile fertilité arasında yakın ilişki bulunmuştur (Tablo 4). Bu durum yukarıda belirtilen görüşümüzü destekler doğrultudadır. Eritme sonrası saptanan spermatolojik özellikler boğaların potansiyel fertilitésini belirlemede önemli bir kriterdir. Aynı zamanda araştırmacıların büyük bir çoğunluğu tarafından ortaya konan bir sonuçtur (3, 7, 66, 70,).

Penetrasyon aralıklarında saptanan spermatozoon sayıları fertilité gruplarına göre karşılaştırıldığında 1. ve 2. penetrasyon aralığında (PA 1 ve PA 2), düşük ve yüksek fertilité grupları arasındaki farkın önemli olmadığı saptanmıştır (Tablo 8). Ancak 3. penetrasyon aralığında (PA3) ve 1. fertilité grubunda saptanan bulgular diğer fertilité gruplarına göre önemli oranlarda yüksektir ($p < 0.05$). Bu durum 3. penetrasyon aralığının diğerlerine göre daha dikkat edilmesi gerektiğinin bir göstergesi olabilir. Belirtilen bulgular farklı inkübasyon süre ve ısılarının (37°C , 39°C ve 41°C ile 15 ve 45 dakika) ortalamalarını içerse de, üçüncü penetrasyon aralığında fertilité grupları arasındaki fark dikkat çekicidir.

SMPT'de test metoduna yönelik olarak yapılan çalışmalarda bazı araştırmacılar inkübasyon ısını arttırmanın daha sağlıklı penetrasyon sonuçlarına yol açacak şekilde spermatozoonun hızını arttırdığını tespit etmişlerdir (23, 51, 65, 75, 91). Sunulan çalışmada ise farklı inkübasyon ısılarının SMPT sonuçları üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla 37°C , 39°C ve 41°C 'lik inkübasyon ısıları kullanılmıştır. Süre ve boğa faktörleri göz ardı edilerek yapılan istatistiksel değerlendirmede inkübasyon ısısı arttıkça PA 1'deki spermatozoon konsantrasyonlarının da önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$, Tablo 2). Fakat PA 2 ve PA 3'te inkübasyon ısısı arttıkça istatistiksel öneme sahip olmamakla birlikte spermatozoon konsantrasyonlarında azalma tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Bunun sebebi, yüksek ısıya bağlı olarak spermatozoonlarda meydana gelen hareket artışı nedeni ile enerjilerini daha kısa sürelerde tüketmelerine bağlanabilir. Nitekim, Galli ve ark. (33), servikal mukus penetrasyon testinde 90 dakikalık inkübasyon neticesinde maksimum linear penetrasyon mesafesini 21°C ve 37°C de sırasıyla 18.1 mm ve 28.5 mm olarak saptamışlardır. Araştırmacılar spermatozoonların migrasyon değerleri

arasındaki bu farklılığın testin farklı ısılarda yapılmış olmasına bağlı olduğunu açıklamışlardır. Benzer şekilde, Paul ve ark. (75), oda ısısında ($p < 0.05$) ve 18°C 'nin altında ($p < 0.01$) yapılan test esnasında 2°C 'lik ısı farkının, spermatozoonların mukusa penetrasyonlarında anlamlı değişikliklere yol açtığını tespit etmişlerdir. İnkübasyondaki küçük ısı değişikliklerinin gün içerisinde mevsimsel değişiklikler nedeniyle ve hatta termostat ile ısıнын sabit tutulduğu laboratuvarlarda bile oluşabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle SMPT'nin standardize edilmesinde ısıнын kontrol altında tutulması zorunluluğu özellikle vurgulanmıştır (75).

Sunulan çalışmada farklı inkübasyon sürelerinin SMPT sonuçları üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla 15 ve 45 dakikalık inkübasyon süreleri kullanılmıştır. Bir çok araştırmacı çalışmasında SMPT'de inkübasyon ısılarına göre değişmekle birlikte 6 dakika ile 90 dakika arasında değişen farklı inkübasyon süreleri kullanmışlardır (4, 5, 6, 23, 79, 91). Çalışmamızda ısı ve boğa faktörleri göz ardı edilerek yapılan istatistiksel değerlendirmede inkübasyon süresi 15 dakikadan 45 dakikaya arttırıldıkça, penetrasyon aralıklarındaki spermatozoon sayıları genel olarak artış göstermekle birlikte penetrasyon mesafesi arttıkça konsantrasyon bakımından iki süre arasındaki farkın öneminin giderek azaldığı ve PA 3'te farkın önemini kaybettiği tespit edilmiştir (PA 1'de $p < 0.001$, PA 2'de $p < 0.01$ ve PA 3'te $p > 0.05$, Tablo 2). Çalışmada ayrıca boğa faktörü göz ardı edilerek inkübasyon ısı ve süresinin penetrasyon aralıklarındaki spermatozoon konsantrasyonları üzerindeki birlikte etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Penetrasyon aralıklarındaki spermatozoon sayıları bakımından tek başına ısı faktörünün sadece PA 1'de önemli etkiye sahip olduğu ($p < 0.001$), tek başına süre faktörünün ise önem derecesinde azalma olmakla birlikte PA 1 ve PA 2'de önemli etkiye sahip olduğu (PA 1'de $p < 0.001$ ve PA 2'de $p < 0.01$) tespit edilirken, penetrasyon mesafesi arttıkça ısı ve süre faktörlerinin birlikte etkisinin de arttığı ve özellikle de PA 3'te bu etkinin istatistiksel olarak son derece önemli olduğu saptanmıştır (PA 1'de $p > 0.05$, PA 2'de $p < 0.05$ ve PA 3'te $p < 0.001$, Tablo 2). Ayrıca inkübasyon ısıısının boğalara göre değişmediği yani boğaların her üç penetrasyon aralığında da inkübasyon ısıısından etkilenmediği saptanmıştır ($p > 0.05$). Oysaki inkübasyon süresinin

boğalara göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Elde edilen bulgular ışığında değişik inkübasyon teknikleri araştırılırken, farklı süreler üzerinde daha yoğunluklu olarak durulmasının daha doğru olabileceği ifade edilebilir.

Araştırmacılar mukus penetrasyon testinde spermatozoonların hızı ile penetrasyon mesafesi ve fertilité oranları arasında insanlarda yakın bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (26, 51, 52, 75, 87). Keel ve ark. (53), penetrasyon mesafesi ile bütün sperma parametreleri (spermatozoon konsantrasyonu, motilite, velocity vs.) arasında istatistiki açıdan önemli bir artış görüldüğünü ($p < 0.001$) tespit etmekle birlikte bu parametrelerden motilite ve hızın, mukus penetrasyon mesafesi ile en güçlü pozitif korelasyonu gösterdiğini bildirmişlerdir. Boğa sperması ile çalışan araştırmacılar, SMPT'de ortalama spermatozoon hızlarını saniyede 48.61-62.62 mikron arasında olduğunu bildirmişlerdir (5). Çalışmamızda spermatozoonların bireysel hızları değerlendirilmemiştir. Fakat 3. penetrasyon aralığına en son ulaşan spermatozoonun 5. cm'ye 15 dakikada ulaştığı düşünüldüğünde, bütün boğalarda PA 3'e en son ulaşan spermatozoonun 0-5 cm'ler arasındaki ortalama hızlarının 55.5 mikron metre/saniye daha fazla olduğu, özellikle 15 dakikalık inkübasyonlarda PA 3 aralığındaki konsantrasyonun ortalamanın üzerinde hızlara sahip spermatozoonlardan oluştuğu söylenebilir. Burada 3. penetrasyon aralığına 15 dakikada ulaşan spermatozoonların 45 dakikada ulaşan hücrelerden daha hızlı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu durum kısa süreli inkübasyon tekniğinin ve 3. penetrasyon aralığının önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Tablo 9 genel olarak incelendiğinde 37°C 15 dakikalık inkübasyon tekniğinde ve 39°C 15 dakika inkübasyon tekniğinde her üç penetrasyon aralığında da fertilité grupları arasında önemli bir fark bulunmamıştır. 41°C 15 dakika inkübasyon tekniği haricindeki diğer inkübasyonlarda 1. penetrasyon aralığında elde edilen veriler fertilité gruplarına göre farklılıklar göstermiştir. Ancak bu penetrasyon aralığındaki hücrelerin sayılamayacak kadar fazla olması nedeniyle pratikte önerilebilecek özellikte bulunmamıştır. Penetrasyon aralıklarında saptanan bulgular fertilité gruplarına göre karşılaştırıldığında 37°C

45 dakika ve 41°C 15 dakikada 3. penetrasyon aralıklarındaki değerler dikkat çekicidir. 41°C gibi yüksek sayılabilecek ve hareket artışı nedeniyle spermatozoonların enerji rezervlerini daha kısa sürede tüketmelerini sağlayacak bir inkübasyon ısısında 3. penetrasyon aralığına kadar ulaşabilen spermatozoonların doğrusal ve güçlü bir harekete, yüksek enerji rezervlerine ve yeterli dayanıklılığa sahip oldukları söylenebilir (42). Nitekim 41°C'de 15 dakikalık inkübasyonda PA 3'te migrasyon yoğunluğu bakımından en iyi fertiliteye sahip olan 1. grup ile hem 2. hem de 3. grup arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmuştur ($p < 0.01$). Ancak boğalarda bireysel olarak farklı inkübasyon tekniklerinde saptanan veriler genel olarak incelendiğinde (Tablo 10), 41°C 15 dakikalık inkübasyonun 3. penetrasyon aralığında saptanan spermatozoon sayıları oldukça düşüktür. Bazı örneklerde hiç hücre bulunamamıştır. Bu da sınırlı sayıda yapılan çalışmalar için hatalı sonuçlara varılmasına neden olabilir. Bununla birlikte bu inkübasyon tekniğinin yapılacak çalışmalara ışık tutabilecek özellikte olduğu söylenebilir. Bu çalışmalarda 3. penetrasyon aralığında daha yüksek sayıda hücre elde edilmesi amaçlanmalıdır. 37°C'deki inkübasyon teknikleri çoğu araştırmacının önerdiği ve görüş birliğine vardığı bir yöntemdir (6, 23, 75, 91). Paul ve ark. (75), 37°C'de spermatozoonların mukusa daha fazla penetre olduğunu tespit etmekle birlikte testin okunabilmesi ve yorumlanabilmesinde 37°C'lik inkübasyon ısını optimum bulmuşlardır. Bu nedenle 37°C'nin SMPT için uygun ve standardize edilmesi gereken bir ısı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda da en anlamlı sonuçlar bu ısı grubunda elde edilmiştir.

Araştırmamızda kullanılan bütün boğaların rutin olarak sun'i tohumlamada kullanılmalarına, arzu edilen düzeyde fertiliteye ve spermatolojik özelliklere sahip olmalarına rağmen servikal mukus penetrasyon testinde boğa sperması üzerinde çalışan araştırmacıların aksine uzak mesafelerdeki (PA 3) toplam spermatozoon sayısı ile fertilité (NRR) arasında önemli derecede pozitif bir korelasyon bulunmuştur (Tablo 8). İnsan sperması kullanılarak yapılan pek çok çalışma, spermatozoonların fertilizasyon kapasitesi ile SMP Testlerinin korelasyonlu olduğunu göstermiştir (11, 18, 27, 68). İnsanlardakinin aksine boğa spermatozoonlarının mukusa penetre olma yetenekleri ile fertilité arasındaki

ilişkinin değerlendirildiği sınırlı sayıdaki çalışmaların çok büyük bir oranında, penetrasyon yeteneği ile fertilité arasında pozitif ilişki bulunamadığı bildirilmektedir (33, 63, 68). Galli ve ark. (33), donmuş boğa sperması ile yaptıkları çalışmada spermatozoonların penetrasyon mesafeleri ile fertilité (NRR) oranları arasında doğrusal bir korelasyon bulamadıklarını bildirmişlerdir. Matoušek ve ark. (63), boğalardan alınan spermatozoonları 16 ayrı servikal mukus örneğinde kat ettikleri mesafelere göre zayıf, orta ve iyi olmak üzere üç gruba ayırmışlar, zayıf ve iyi grupların SMPT sonuçları arasında istatistiksel farklılık bulmalarına karşın ($p < 0.01$), spermaların tohumlamalarda kullanılmasından sonra bu iki grubun gebelik oranları arasında önemli bir farklılık bulamamışlardır (sırasıyla %54.0 ve %53.9). Verberckmoes ve ark. (88), Muraze ve arkadaşlarının bildirdiği servikal mukustaki migrasyon mesafesi ile fertilité (NRR) arasında pozitif korelasyon bulgularını şüpheyle karşılamışlar, çünkü testlerin taze spermada, tohumlamaların ise donmuş spermayla yapıldığını bildirmişler ve ayrıca söz konusu araştırmada kullanılan boğaların fertilité güçlerinin rastlantısal sonuçlara yol açabilecek derecede farklı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Farklı sığır çalışmaları arasında ve insan ve sığır deneylerinin sonuçları arasındaki tutarsızlıkların, test metotlarındaki ve kullanılan penetrasyon medyumların (servikal mukus, yapay medyumlar vs.) özellikleri arasındaki farklılıklar ile açıklanabileceği ileri sürülmüştür. Bunların yanında insanların aksine, sperma kalitesi yönünden boğalar arasındaki farklılıkların ve çok kötü sperma kalitesine sahip boğaların oranının çok düşük olmasının da çalışmalar arasındaki tutarsızlıklarda etkili olabileceği bildirilmiştir (88). İnsanlarda SMPT için fertil erkeklerin test sonuçları ile (bir suni tohumlama programındaki vericiler) infertilite laboratuvarlarına başvuran sorunlu erkeklerin sonuçları karşılaştırılmaktadır (2, 46, 52, 62, 75, 79). Halbuki sığırlardaki sperma migrasyon testleri çoğunlukla sun'i tohumlamada kullanılan boğaların spermaları ile yapılmıştır (6, 23, 63, 68). Sun'i tohumlamada kullanılan boğaların yüksek fertilité oranlarına sahip olmaları sebebiyle non return rate (NRR) dağılımları dar olmakta ve bu nedenle de sığırlarda kötü sperma kalitesine sahip olan bireylerin sayısı düşük olmaktadır. Araştırmacılar son derece dikkatli planlanan bir çalışmada bile, sperma migrasyon sonuçlarının

muhtemelen yalnızca fertiliteleri son derece farklı olan boğalar arasında farklılık göstereceğini ileri sürmüşlerdir (88). Araştırmamızda saptanan uzak mesafelerdeki (PA 3) toplam spermatozoon sayısı ile fertilité (NRR) arasında önemli derecedeki pozitif bir korelasyon bulunmasının sebebi "farklı bir migrasyon test tekniği" kullanılmasına bağlanabilir. Kapillar tüp metodundaki (Kremer Yöntemi), sonuçların laboratuvarlara ve kişilere göre farklılık gösterebildiği ve standardize edilememesi gibi sakıncalarının olduğu bildirilmektedir. Bunun da sebebi, kapillar tüpler içerisindeki sıvı derinliğinin değişken olması nedeni ile, hareketsiz veya hareketli olduğu halde tüp çeperine yakın olmayan spermatozoonların mikroskopik bakıda tespit edilememesine bağlanmaktadır. Sadece çepere yakın olan hareketli spermatozoonların belirlenebilmesi, kapillar tüp içerisinde belirli mesafelerdeki spermatozoon sayılarının tam olarak tespit edilememesi sonucunu doğurmaktadır (74). Gerek penetrasyon mesafelerindeki spermatozoon sayılarının ve gerekse en uzağa giden spermatozoonun kat ettiği mesafenin ölçüldüğü çalışmalarda sadece hareketli olan spermatozoonlar saptanmaktadır. Oysa SMPT uygulamalarında inkübasyon bitimi ile mikroskop altındaki inceleme anı arasında belirli bir zaman dilimi bulunmaktadır. İnkübasyonun hemen sonrasındaki bu zaman diliminde sperma hücrelerinin yer değiştireceği ve değişimin inceleme anına kadar devam edeceği muhakkaktır. Sunulan çalışmada ise sun'i tohumlama laboratuvarında bulunan alet ve malzemeden yararlanarak pratik bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla kapillar tüp yerine 0.25 ml hacminde, Fransız mini payetler kullanılmış ve inkübasyonun hemen sonrasında payetler sıvı azot buharında 30 saniyelik sürede dondurularak spermatozoonların hareketleri engellenmiştir. Dondurma sonrasında payetler belirli aralıklarda kesilerek ele alınan mukus örneğindeki spermatozoonların tamamı değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmada kullanılan yöntemin özel ekipman gerektirmemesi, en basit laboratuvar ortamında dahi uygulanabilmesi ve belirli aralıklardaki toplam spermatozoon sayılarının belirlenmesine dayalı olduğu için sonuçların kişiden kişiye değişkenlik göstermemesi gibi avantajları nedeni ile standardize edilmeye çok yatkın bir test metodu olduğu ortaya çıkmaktadır. Özellikle 3. penetrasyon aralığındaki migrasyon yoğunluğu ile sun'i tohumlamada kullanılan boğaların

fertilitesi arasında önemli derecede pozitif korelasyonun tespit edilmiş olması, benzer araştırmalarda insanların veya fertilite sonuçları arasında belirgin farklılıklar olan boğaların kullanılması durumunda fertilite ile daha açık bir ilişki kurulabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca geliştirilen bu yeni test tekniğinde 41°C 15 dakikalık inkübasyon tekniğinin ileride yapılacak çalışmalara ışık tutabileceği 37°C'lik inkübasyonların ise önerilebilir özellikte olduğu sonucuna varılmıştır.

Sunulan Çalışmada Özet Olarak;

1) Boğaların fertilite gücünü önceden bilimsel olarak tahmin etmede eritme sonrası motilite ve morfolojik incelemelerin yapılması son derece yararlı ve gerekli bir işlem olduğu,

2) Boğaların potansiyel fertilitelerinin tahmininde payetlerde gerçekleştirilen SMPT'nin, eritme sonrası spermatolojik özelliklerle beraber yapılmasının önerilebilecek özellikte bir yöntem olduğu,

3) Bu çalışmada yeni bir yöntem olarak payetlerde SMPT'nin gerçekleştirilmesi ve inkübasyon bitiminde sıvı azot buharında örneklerin tespitinin basit, pratik ve boğalarda fertilite tahmini için etkili ve önerilebilir bir metod olduğu,

4) Boğa spermatozoonlarının mukusa penetre olma yetenekleri ile potansiyel fertiliteleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir mukus penetrasyon testinde inkübasyon ısısı, süresi ve penetrasyon aralığı gibi her faktörlerin birlikte değerlendirilmesinin gerektiği,

5) Bu SMPT yönteminde 37 °C ısıda 3. penetrasyon aralığında (5 cm ile 5.25 cm'ler arası) anlamlı sonuçlar alındığı ve aynı teknikte farklı inkübasyon sürelerinin araştırılmasının önerilebileceği,

6) 41 °C gibi yüksek ısılarda ise 3. penetrasyon aralığında daha fazla hücrenin elde edilebileceği yeni inkübasyon tekniklerinin araştırılmasında yarar görülebileceği ve

7) Çalışmada kullanılan yeni SMPT'nin daha kolay standardize edilebilmesi ve objektif bir değerlendirme yöntemi olması nedeniyle Kremerin kapillar tüp metoduna alternatif oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.



8. ÖZET

Sunulan çalışmada 10 baş Siyah Alaca ırkı boğaya ait dondurulmuş spermaların in vitro olarak servikal mukusa penetre olma yetenekleri (SMPT) ile in-vivo fertiliteleri arasındaki ilişkiyi en iyi belirleyecek inkübasyon ısı ve süresinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışma için sun'i tohumlama laboratuvarında bulunan alet ve malzemeden yararlanarak pratik bir yöntem geliştirilmeye çalışıldı. Bu amaçla test için kullanılacak olan servikal mukus, basit bir düzenek vasıtasıyla kapillar tüp yerine 0.25 ml hacmindeki şeffaf mini payetlere çekildi. Ardından non-toksik bir küvet içerisinde bulunan eritilmiş spermayla 37°C'de 15 dk. (**1 grup**) ve 45 dk. (**2. grup**), 39°C'de 15 dk. (**3. grup**) ve 45 dk. (**4. grup**), 41°C'de 15 dk. (**5. grup**) ve 45 dakikalık (**6. grup**) inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında payetler sıvı azot buharında donduruldu. Bu tespit sonrasında payetlerden belirli bölümler [1.5-1.75 cm (PA1), 3.25-3.5 cm (PA2) ve 5.0-5.25 cm (PA3)] kesildi ve kesilen örneklerde bulunan spermatozoonlar faz kontrast mikroskopta 200 büyütmede sayıldı.

Aynı boğaların donmuş spermasıyla 3537 sun'i tohumlama uygulaması gerçekleştirildi ve %NR sonuçlarına göre 3 fertilitite grubu oluşturuldu. Eritme (37°C'de 30 sn.) sonrası motilite ve morfolojik bozukluk bulguları boğalara göre farklılık gösterdi ($p < 0.05$). En yüksek motilite ve en düşük morfolojik bozukluklar gebelik oranları en yüksek olan 1. fertilitite grubunda saptandı ($p < 0.05$). İncelenen spermatolojik özelliklerden motilite, akrozom bozuklukları, diğer morfolojik bozukluklar, ve toplam morfolojik bozukluklar ile penetrasyon aralıklarındaki migrasyon yoğunluğu arasında önemli derecede bir ilişki bulunamadı ($p > 0.05$).

Penetrasyon aralıklarında saptanan spermatozoon sayıları fertilitite gruplarına göre karşılaştırıldığında 1. ve 2. penetrasyon aralığında (PA 1 ve PA 2), düşük (3. grup) ve yüksek fertilitite grupları (1. grup) arasındaki farkın önemli olmadığı saptandı. Ancak 3. penetrasyon aralığında (PA 3) 1. fertilitite grubunda saptanan bulgular diğer fertilitite gruplarına göre önemli oranlarda yüksek bulundu ($p < 0.05$).

İnkübasyon ısısı ve süresinin birlikte penetrasyon aralığına etkisi PA 2’de ($p < 0.05$) ve PA3’te ($p < 0.01$) önemli bulunmuştur. İkinci grupta (37°C , 45 dk.) PA 1 ve PA 3’de saptanan spermatozoon sayıları 1. ve 2. fertilité gruplarında farklı bulundu ($p < 0.05$). Aynı şekilde 5. grupta (41°C , 15 dk.) PA 3’de en yüksek spermatozoon sayısı 1. fertilité grubunda saptandı ($p < 0.01$).

Çalışmada yeni bir yöntem olarak geliştirilmeye çalışılan ve belirli aralıklarda bulunan hücrelerin sayımına dayanan SMPT’nin diğer spermatolojik özelliklerin incelenmesinde ek olarak yararlı ve kullanılabilir bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır. Payetlerde PA3’te daha anlamlı sonuçlar alındığı, bu aralıkta 37°C 45 dakikalık inkübasyon tekniğinin kullanılabilir özellikte olduğu, 41°C gibi daha yüksek ve 15 dakika gibi daha kısa inkübasyon tekniklerinin araştırılmasında büyük yararlar olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Boğa, sperma, servikal mukus penetrasyon testi, spermatolojik özellikleri, fertilité.

9. YABANCI DİLDE ÖZET (SUMMARY)

Effects of Different Temperatures and Durations on The Sperm-Cervical Mucus Penetration Test

The material of this study, was the frozen semen of 10 Holstein bulls. The aim was determination of the best temperature and time to detect the interrelation ship between the in-vitro penetration skill of spermatozoa to the cervical mucus (SMPT) and in-vivo fertility.

The artificial insemination laboratory utensils were employed to develop on practical technique. The cervical mucus, was filled into 0.25 ml transparent mini straws. These straws were incubated with thawed semen in a non-toxic dish at 37°C for 15 min (1. group) and 45 min (2. group), at 39°C for 15 min (3. group) and 45 min (4. group), at 41°C for 15 min (5. group) and 45 min (6. group). The straws were frozen by liquid nitrogen vapour after incubation. Following this, the straws were cut at various levels [1.5-1.75 cm (PA 1), 3.25-3.5 cm (PA 2) and 5.0-5.25 cm (PA 3)] and at every cutting level, found spermatozoa were counted by a phase contrast microscope at 200 magnification.

Frozen semen of same bulls were used for artificial insemination and 3 fertility groups were established according to the fertility results. Post-thaw (37°C for 30 sec) motility and morphologic defect rates have been various among the bulls ($p < 0.05$). The highest motility and lowest morphological defect rates were observed in the group with the highest pregnancy rate the 1st fertility group ($p < 0.05$). There have been no significant interrelationship between the motility, acrosome defects, other morphologic defect rates, total morphologic defect rates and the migration densities in the penetration paths ($p > 0.05$).

At the comperison of the spermatozoa numbers in the penetration paths according to the fertility groups, it was observed that in 1st and 2nd penetration paths (PA 1 and PA 2), the difference between the low (3. group) and high (1. group) fertility groups was not important. However, in the 3rd penetration path (PA 3) the results of the 1st fertility group were significantly higher than the other fertility groups ($p < 0.05$).

The simultaneous effect of incubation temperature and time on the penetration path was important in PA 2 ($p < 0.05$) and PA 3 ($p < 0.001$). In the second groups (37°C-45 min), the spermatozoa numbers in PA1 and PA3 were found to be different in the 1st and 2nd fertility groups ($p < 0.05$). Similarly, in the 5th group (41°C-15min) In PA3 the highest spermatozoa number was observed in the 1st fertility group ($p < 0.001$).

It was concluded at the end of the study that SMPT which is a developing new technique based on counting the cells found at different levels of the straw is an efficient and useful technique, which is better to be used combined together with examination of other spermatological characteristics. Better results in PA 3 path, efficient use of 37°C for 45 minute incubation technique, are also achieved results of our study. We have also the views that it would be beneficial to investigate higher temperatures and shorter incubation techniques such as 41°C and 15 minute.

Key Words: Bull, sperm, Cervical mucus penetration test, spermatologic characteristics, fertility.

10. KAYNAKLAR

1. Aalseth, E.P., Saacke R.G. Morphological Change of The Acrosome on Motile Bovine Spermatozoa Due to Storage at 4°C. J.Reprod.Fert., 1985; 74: 473-478.
2. Alexander, N.J., Fulgham, D.L., Zatuchni, B., Zaneveld L.J.D. Cervical Mucus Penetration Test for In Vitro Assay of Vaginal Contraceptive Agents. Fertility and Sterility, 1981; 36 (4): 516-520.
3. Andersson, M., Vierula, M., Alanko, M. Acrosomal Morphology and Fertility in AI-Bulls. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1988; 3: 222-224.
4. Anilkumar, R., Devanathan, T.G. Correlation Between White Side Test for Quality of Cervical Mucus and Sperm Penetration Test. Indian Vet. J. 73, October, 1996; 1099-1100.
5. Anilkumar, R., Devanathan, T.G. Effect of Spermatozoal Quality on Sperm Progression Speed in Cervical Mucus. Indian Vet. J., 1996; (73): 645-648.
6. Anilkumar, R., Devanathan, T.G., Pattabiraman, S.R., Edwin, M.J. Correlation Between the Spermatozoal Characteristics and Sperm Penetration Distance in Polyacrylamide Gel and Bovine Cervical Mucus. Theriogenology, 2001; 55: 685-691.
7. Ak, K. Süt Tozu İle Hazırlanan Sulandırıcılarla Dondurulan Boğa Spermasının Ülkemizde Kullanılabilirliği Üzerinde Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 1990.
8. Ataman, M.B., Kaya, A; Aral, F., Aköz, M., Yıldız, C. Postpartum Dönemde Uygulanan PGF_{2α}'nın Buzağılama-İlk Tohumlama Aralığı ve İlk Tohumlamada Gebe Kalma Oranı Üzerine Etkisi. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg. 3 (2): 191-194.
9. Bacinoğlu, S. Boğa Spermasında Farklı Eritme Süreleri ve Eritme Sonrasında Oluşturulan Soğuk Şoklarının Spermatolojik Özelliklere Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2002.

10. Berger, T., Anderson, D.L., Penedo, M.C.T. Porcine Sperm Fertilizing Potential in Relationship to Sperm Functional Capacities. *Anim. Reprod. Sci.*, 1996; 44 (4): 231-239.
11. Biljan, M.M., Taylor, C.T., Manasse, P.R., Joughin, E.C., Kingsland, C.R., Lewis-Jones, D.I. Evaluation of Different Sperm Function Tests as Screening Methods for Male Fertilization Potential-The Value of the Sperm Migration Test. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 1995; 49 (2, abst.): 227-228.
12. Bozkurt, T., Demirci, E. İneklerde Kızgınlığın Farklı Devrelerinde Elde Edilen Serviks ve Vagina Akıntılarında Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerle Feromonların Araştırılması. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 1998; 12 (2): 183-193.
13. Buckner, P.J., Willett, E.L. Laboratory Tests, Singly and in Combination, for Evaluating Fertility of Semen and of Bulls. *J.Dairy Science*, 1954; 37 (9): 1050-1060.
14. Burruano, B.T., Schnaare, R.L., Malamud, D. Synthetic Cervical Mucus Formulation. *Contraception*, 2002; 66: 137-140.
15. Choong, C.H., Wales, R.G. The Effect of Cold Shock on Spermatozoa. *Aust.J.Biol.Sci.*, 1962; 15: 543-551.
16. Cirit, Ü. Siyah Alaca İneklerde PGF_{2α} ve GnRH'nin Farklı Kombinasyonları İle Östrus Senkronizasyonu Çalışmaları. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2002.
17. Colenbrander, B., Gadella, B.M., Stout, T.A.E. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reprod. Dom. Anim.*, 2003; 38: 305-311.
18. Correa, J.R., Pace, M.M., Zavos, P.M. 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*, 1997; 48: 721-731.
19. Correa, J.R., Rodriguez, M.C., Patterson, D.J., Zavos, P.M. Thawing and Processing of Cryopreserved Bovine Spermatozoa At Various

- Temperatures and Their Effects on Sperm Viability, Osmotic Shock and Sperm Membrane Functional Integrity. *Theriogenology*, 1996; 46: 413-420.
20. Cox JF., Martínez C., Lagos S., Saravia, F., Sasmay, R. Sperm Migration in Cervical Mucus in Goats. II Relationship with Colonization of the Oviduct and Fertilization Efficiency. *Theriogenology*, 1997; 47 (1, abst.): 254.
 21. DeJarnette, J.M., Barnes, D.A., Marshall, C.E. Effects of Pre- and Post-thaw Thermal Insults on Viability Characteristics of Cryopreserved Bovine Semen. *Theriogenology*, 2000; 53: 1225-1238.
 22. Dev, S., Pangaonkar, G.R., Sharma, R.K., Gandotra, V.K. Effect of Biochemical Characteristics of Buffalo Oestrial Mucus on In Vitro Sperm Migration. *Indian Journal of Animal Sciences*, 1999; 69 (5, abst.): 313-315.
 23. Doğan, İ. Döl Tutmayan İnek ve Düvelerde Penetrasyon Testinin Kullanım Olanakları. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa 1994.
 24. Duijkers, I.J.M., Klipping, C. Ultrasonographic Assessment of Endocervix and Cervical Mucus in Ovulatory Menstrual Cycles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2000; 93: 13-17.
 25. Duncan, D.B. Multiple Range and Multiple F-tests *Biometrics* 1955; 11: 1-42.
 26. Eggert-Kruse, W., Gerhard, I., Tilgen, W., Runnebaum, B. Clinical Significance of Crossed In Vitro Sperm-Cervical Mucus Penetration Test in Infertility Investigation. *Fertility and Sterility*, 1989; 52 (6): 1032-1040.
 27. Eggert-Kruse, W., Reimann-Anderson, J., Rohr, G., Pohl, S., Tilgen, W., Runnebaum, B. Clinical Relevance of Sperm Morphology Assessment using Strict Criteria and Relationship with Sperm Mucus Interaction In Vivo and In Vitro. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 1995; 51 (32, abst.): 195.
 28. Elmore, R.G. Evaluating Bulls for Breeding Soundness: Sperm Morphology. *Veterinary Medicine*, 1985; September, 90-95.

29. Engel, S., Petzoldt, R. Human Sperm Penetration in Different Media. *Andrologia*, 1999; 31 (4): 233-239.
30. Evrim, M. Sığır Yetiştiriciliği Sorunları ve Çözüm Önerileri. Veteriner Hekimler Merkez Konseyi 2000 Hayvancılık Kongresi, 22-23 Haziran, Ankara, 2000; 75-80.
31. Francavilla, F., Romano, R., Verghetta, L.A., Bontempo, G., Santucci, R., Necozone, S., Francavilla, S. Interactive Effect of Semen and Cervical Mucus Quality on Postcoital Test Outcome: Analysis from an Andrological Point of View. *Int. J. Androl*, 2002; 25 (4): 236-242.
32. François, C., Chrétien, C. Involvement of the Glycoproteic Meshwork of Cervical Mucus in the Mechanism of Sperm Orientation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 2003; 82 (5): 449-458.
33. Galli, A., Basetti, M., Balduzzi, D., Martignoni, M., Bornaghi, V., Maffii, M. Frozen Bovine Semen Quality and Bovine Cervical Mucus Penetration Test. *Theriogenology*, 1991; 35 (4, abst.): 837-844.
34. Gökçen, H., İşler, M., Soylu, M.K. Boğalarda Bazı Spermatolojik Özellikler ile İklim Faktörleri Arasındaki İlişkiler Üzerinde Araştırmalar, 1989-1990; 1-2-3 (8-9): 147-154.
35. Gökçen, H., Soylu, M.K., Tümen, H., Çekgöl, E. Karacabey Harası Sun'i Tohumlama Boğalarının Kimi Spermatolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar, 1991; 1-2-3 (10): 75-81.
36. Günalp, S. WHO Laboratuvar El Kitabı: İnsan Semen ve Sperm-Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi. Dördüncü Baskıdan Türkçeye Çeviri (2002)
37. Güney, H.Ö., İleri, İ.K. Paillette Yöntemine Göre Dondurulmuş Boğa Spermasının Farklı Isı ve Sürelerde Eritilmesinin ve Eritme Sonrası Düşük Isı Uygulamalarının Spermatozootların Motilite ve Morfolojik Yapıları Üzerine Etkisi. *İstanbul Üniv.Vet.Fak.Derg.*, 1990;17 (1): 75-91.
38. Hafez, E.S.E. Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryos. In: Hafez ESE. (ed.). *Reproduction in Farm Animals*, Philadelphia, 1993; Chapter, 24: 503-525

39. Hafez, E.S.E. Semen Evaluation. In: Hafez ESE. (ed.). Reproduction in Farm Animals, Philadelphia, 1993; Chapter, 22: 455-480.
40. Hancock, J.L. The Morphology of Bull Spermatozoa. J. Experimental Biology, 1952; 29: 445-453.
41. Harper, M.J.K. Gamete and Zygote Transport. In: Knobil E, Neill JD (eds). The Physiology of Reproduction Volume 1. 2. th. ed. Raven Press Ltd., New York, 1994; 123-187.
42. Herman, H.A., Madden, F.W. Evaluation of Semen-Incubation Test. In: The Artificial Insemination of Dairy and Beef Cattle (Including Techniques for Goats, Sheep, Horses and Swine), Fourth Edition. Sherman, Texas, 1972.
43. İleri, İ.K., Ak, K. Payet Yöntemi İle Dondurulmuş Boğa Spermasının Eritilmesinde Eritme Isı ve Sürelerinin Spermatozoitlerin Motilite ve Akrozom Yapıları Üzerine Etkileri. İ.Ü.Veteriner Fakültesi ve Münih Ludwig-Maximilian Üniversitesi Türk-Alman Günleri. 29-30 Nisan-Mayıs 1993, Avcılar-İstanbul. 58-62.
44. İleri, İ.K., Özkoca, A., Ak, K., Pabuçcuoğlu, S., Birler, S., Soylu, M.K. Hayvan İslahında Embrio Transfer Çalışmalarının Yeri ve Önemi. Bursa Veteriner Hekimler Odası II. Mesleki Eğitim Semineri. 17-18 Mayıs, Bursa, 1989.
45. İleri, İ.K., Ak, K., Pabuçcuoğlu, S., Birler, S. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını. Ders Notu No: 84, İstanbul, 1998.
46. Jeulin, C., Soumah, A., Jouannet, P. Morphological Factors Influencing the Penetration of Human Sperm into Cervical Mucus In Vitro. International Journal of Andrology, 1985; 8: 215-223.
47. Jeyendran, R.S., Van Der Ven H.H., Perez-Pelaez, M., Zaneveld, L.J.D. Effect of Glycerol and Cryopreservation on Oocyte Penetration by Human Spermatozoa. Andrologia, 1985; 17 (3): 241-248.
48. Katila, T. Sperm-Uterine Interactions: A Review. Anim. Reprod. Sci., 2001; 68: 267-272.

49. Katz, D.F., Mills, R.N., Pritchett, T.R. The Movement of Human Spermatozoa in Cervical Mucus. *J. Reprod. Fert.*, 1978; 53: 259-265.
50. Kaya, A., Çoyan, K., Yıldız, C., Ataman, M.B. Dondurulmuş Boğa Spermasını Değişik Isı ve Sürelerde Çözdürmenin Spermatolojik Özellikler ve Payet İç Isısı Üzerine Etkisi. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 1998; 8(1-2): 29-33.
51. Keel, B.A., Kelly, R.W., Webster, B.W., Zumbach, K.L. Application of a Bovine Cervical Mucus Penetration Test. *Archives of Andrology*, 1987; 19: 33-41.
52. Keel, B.A., Schalue, T.K. Correlation of the Bovine Cervical Mucus Penetration Test with Human Sperm Characteristics in 1406 Ejaculates. *Archives of Andrology*, 2000; 44: 109-115.
53. Keel, B.A., Webster, B.W. Correlation of Human Sperm Motility Characteristics with an in Vitro Cervical Mucus Penetration Test. *Fertility and Sterility*, 1988; 49 (1): 138-143.
54. Kırşan, İ., Alkan, S., Baran, A., Öztürkler, Y., Şenünver, A., İleri, İ.K. Sığırlarda Suni Tohumlama Anında Uygulanan Beta 2-Blokeri Carazolol'ün Uterus Tonusu ve Gebe Kalma Oranına Etkisi. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1998; 24 (1): 89-95.
55. Kremer, J. A. Simple Sperm Penetration Test. *International Journal of Fertility*, 1965; 10 (3): 209-215.
56. Kumi-Diaka, J. Subjecting Canine Semen to The Hypo-osmotic Test. *Theriogenology*, 1993; 39(1): 1279 -1289.
57. Kutsal, A., Alpan, O., Arpacık, R. İstatistik Uygulamalar. *Bizim Büro Basımevi*, Ankara 1990.
58. Larson, B., Rodríguez-Martínez, H. Can We Use In Vitro Fertilization Tests to Predict Semen Fertility? *Anim. Reprod. Sci.*, 2000; 60-61: 327-336.
59. Lee, C.H., Wang, Y., Shin, W.S., Chien, Y.W. Effects of Chelating Agents on the Rheological Property of Cervical Mucus. *Contraception*, 2002; 65: 435-440.

60. López-Gatius, F., Labernia, J., Santolaria, P., Rutllant, J., López-Béjar, M. The Relationship of Rheological Behavior of The Vaginal Fluid at the Time of Insemination to the Pregnancy Rate in Dairy Cows. *Theriogenology*, 1998; 48: 865-871.
61. Lyimo, Z.C., Nielen, M., Ouweltjes, W., Kruip, T.A.M., Van Eerdenburg, F.J.C.M. Relationship Among Estradiol, Cortisol and Intensity of Estrus Behavior in Dairy Cattle. *Therigenology*, 2000; 53: 1783-1795.
62. Mahony, M.C. Evaluation of the Effect of Cervical Cap Device on Sperm Functional Characteristics In Vitro. *Andrologia*, 2001; 33: 207-213.
63. Matoušek, J., Říha, J., Sršeň, V., Venelský, L., Louda, F. Penetration of Cervical Mucus and Other Body Fluids by Bull Sperm in Capillary Tubes. *Anim. Reprod. Sci.*, 1989; 18: 161-166.
64. Nagy, Sz., Házás, G., Bali Papp, A., Iváncsics, J., Szász, F., Szász, F. Jr., Kovács, A., Foote, R.H. Evaluation of Sperm Tail Membrane Integrity by Light Microscopy. *Theriogenology*, 1999; 52: 1153-1159.
65. Nassar, A., Morshedi, M., Mahoni, M., Srisombut, C., Lin, M.H., Oehninger, S. Pentoxifyline Stimulates Various Sperm Motion Parameters and Cervical Mucus Penetrability in Patients with Asthenozoospermia. *Andrologia*, 1999; 31 (1): 9-15.
66. Nur, Z. Donmuş Boğa Spermasına Uygulanan Isı Farklılıklarının Eritme Sonrası Oluşturulan Soğuk Şokuna Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2001.
67. Oei, S.G., Helmerhorst, F.M., Bloemenkamp, K.W.M., Dersjant-Roorda, M., Keirse, M.J.N.C. Predicting Optimal Mucus for Infertility Diagnosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 1997; 73: 63-66.
68. Okuda, K., Murase, S., Sato, K., Matsuzaki, S., Iwano, S., Iwama, N. Penetration Ability of Bull Spermatozoa into Bovine Cervical Mucus. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. June 26th – 30th 1988; 3: 279-280.

69. Özdamar, K. Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi. Kaan Kitabevi, Eskişehir, 1999.
70. Özkoca, A. Boğa Spermatozoitlerinin Morfoloji Yönünden İncelenmesinde Kullanılan Çeşitli Boyalar ile Boyama Metodlarının Karşılaştırılması ve Elde Edilen Sonuçlar. Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsü Derg. 1963; 3 (1)'den ayrı baskı.
71. Özkoca, A. Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. T.C. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. Rektörlük No: 3209, Dekanlık No: 4, İstanbul, 1984.
72. Özkoca, A. Sığırlarda Reprodüksiyon ve İnfertilite. T.C. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. Rektörlük No: 3433, Dekanlık No: 7, İstanbul, 1986.
73. Pace, M.M., Sullivan, J.J., Elliott, F.I., Graham, E.F., Coulter, G.H. Effects of Thawing Temperature, Number of Spermatozoa, Spermatozoal Quality on Fertility of Bovine Spermatozoa Packaged in 0,5 ml. French Straws. J.Anim.Science, 1981; 53(3): 693-701.
74. Pandya, I.J., Mortimer, D., Sawers, R.S. A. Standardized Approach for Evaluating the Penetration of Human Spermatozoa into Cervical Mucus In Vitro. Fertility and Sterility, 1986; 45 (3): 357-365.
75. Paul, G., Stumpf, P.G., Lloyd, T. In Vitro Penetration of Human Sperm Into Bovine Cervical Mucus: Effects of Sperm Washing and Exposure to Low Temperature. Obstetrics and Gynecology, 1985; 65 (1): 42-45.
76. Refsdal, A.O. To Treat or not to Treat: A Proper Use of Hormones and Antibiotics. Anim. Reprod., Sci 2000; 60-61: 109-119.
77. Rogers, J.B., Parker, R.A. Relationship Between The Human Sperm Hypo-Osmotic Swelling Test and Sperm Penetration Assay. J. Andrology, 1991. 12(2): 152-158.
78. Sevinç, A. Dölerme ve Sun'i Tohumlama. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. Ders Kitabı No: 254, İkinci Baskı, Ankara, 1979.
79. Shoham (Schwartz), Z., Megory, E., Lidor, A., Madgar, I., Lunenfeld, B., Weissenberg, R. Effect of Washing and Suspension on Penetration of

- Human Sperm into Bovine Cervical Mukus. Archives of Andrology, 1987; 19: 261-267.
80. Slavík, T. Effect of Glycerol on the Penetrating Ability of Fresh Ram Spermatozoa with Zona-Free Hamster Eggs. J. Reprod. Fert., 1987; 79: 99-103.
81. Soylu, M.K., Ak, K. Donmuş Spermada Aranan Bazı Özellikler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 1997; 3 (2): 97-100.
82. Söderquist, L., Janson, L., Larsson, K., Einarsson, S. Sperm Morphology and Fertility in A.I. Bulls. J.Vet.Med., 1991; A 38: 534-543.
83. Tamyürek, F., İleri, İ.K., Sayın, T., Plevneli, T. Paillette Yöntemiyle Dondurulmuş Boğa Spermasının Değişik Sıcaklık ve Sürede Çözülmesinin Motiliteye ve Akrozom Bozukluklarının Oluşmasına Etkisi. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 1984; 10 (1): 29-30.
84. Terblanche, S.J. A Semen Quality Score for Bulls. Rhod.Vet.J., 1977; 7(4): 68-76.
85. Tsiligianni, T.h., Karagiannidis, A., Brikas, P., Saratsis, P.h. Physical Properties of Bovine Cervical Mucus During Normal and Induced (Progesterone and/or PGF_{2α}) Estrus. Theriogenology, 2001; 55: 629-640.
86. Ulsan, H.O.K, Güney, H.Ö. Göle Tarım İşletmesindeki Karacabey Esmer Sığırlarının Dölverim Performansı. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 1991; 38 (1-2): 74-83.
87. Urry, R.L., Middleton, R.G., Mayo, D. A. Comparison of the Penetration of Human Sperm Into Bovine and Artificial Cervical Mucus. Fertility and Sterility, 1986; 45 (1): 135-137.
88. Verberckmoes, S., Van Soom, A., De Pauw, I., Dewulf, J., De Kruif, A. Migration of Bovine Spermatozoa in Synthetic Medium and its Relation to In Vivo Bull Fertility. Theriogenology, 2002; 58: 1027-1037.
89. Xu, Z.Z., Burton, L.J., McDougall, S., Jolly, P.D. Treatment of Noncyclic Lactating Dairy Cows with Progesterone and Estradiol or with Progesterone, GnRH, Prostaglandin F_{2α} and Estradiol. J. Dairy Sci., 2000; 83: 464-470.

90. Yavaşca, İ. Payetlerde Dondurulmuş Boğa Spermasına Uygulanan Eritme Sonrası Değişik Süre ve Çevre Isılarının Fertiliteye Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 1996.
91. Yogev, L., Gamzu, R., Paz, G., Kleinman, S., Botchan, A., Hauser, R., Lessing, J.B., Yavetz, H. Improvement in the Cervical Mucus Penetration Test by Using Standart Sperm Control. Archives of Andrology, 1999; 43: 253-257.
92. Yurdaydın, N., Yılmaz, N. Değişik Süre ve Isılarda Çözülmüş Boğa Spermalarının Akrozom Yapısı ve Dölverimi Üzerine Etkisi. Lalahan Hay.Arş.Ens.Derg., 1993; 33(1-2): 20-27.
93. Zemjanis, R. Evcil Hayvanların Döl Veriminde Tanı ve Sağıtım Yöntemleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 362, Yardımcı Ders Kitabı: 260, Ankara Üniversitesi Basım Evi, 1980 Ankara.
94. Zeng, W.X., Terada, T. Protection of Boar Spermatozoa from Cold Shock Damage by 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. Theriogenology, 2001; 55: 615-627.

11. ÖZGEÇMİŞ

1972 Yılında Adıyaman'da doğdum. İlk öğrenimimi 1979-1984 yılları arasında Adıyaman Fatih İlk Öğretim Okulu'nda, orta ve lise öğrenimimi 1984-1990 yılları arasında Adıyaman Lisesi'nde tamamladım. 1990-1991 öğretim yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdim ve 1996 yılında mezun oldum.

1998 yılında İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladım. 2000 yılında askerlik görevimi yerine getirdim.

