



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FARKLI SICAKLIK VE SÜRELERDE ÇÖZDÜRÜLEN
DONDURULMUŞ BOĞA SPERMALARININ CASA
PARAMETRELERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ayşe DEMİRHAN

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

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ongun UYSAL**

**ANKARA
2020**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI SICAKLIK VE SÜRELERDE ÇÖZDÜRÜLEN
DONDURULMUŞ BOĞA SPERMALARININ CASA
PARAMETRELERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayşe DEMİRHAN

DÖLERME ve SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ogun UYSAL

Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından
18L0239010 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2020

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Farklı sıcaklık ve sürelerde çözdürülen dondurulmuş boğa spermalarının CASA parametreleri ile değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak hazırlanmıştır. Tezimin fikir ve hipotezi tümüyle tez danışmanıma ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşe DEMİRHAN

Tarih: 07.10.2020

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Spermatozoon Morfolojisi	5
1.2. Spermanın Dondurulması	8
1.2.1. Boğa Spermasının Dondurulması	12
1.3. Kriyoprezervasyonun Spermatozoon Üzerine Etkisi	16
1.3.1. Membrandaki Yapısal Değişim	20
1.3.2. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Oluşumu	21
1.3.3. Moleküler Değişim	23
1.3.4. Kapasitasyon Benzeri Değişim	25
1.4. Boğa Spermasının Dondurulabilirliğini Etkileyen Moleküller	25
1.5. Spermanın Çözdürülmesi	26
1.6. Spermatozoa Kalitesini Değerlendirme Yöntemleri	29
1.6.1. Mikroskop ile Değerlendirilmesi	29
1.6.2. CASA (Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sistemi)	31
1.6.3. Flow Sitometri Cihazı	35
1.6.4. Oksidatif Stres Analizi	37
2. GEREÇ ve YÖNTEM	38
2.1. Boğa Spermalarının Seçimi	38
2.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi	38
2.3. Çözüm Sonu Motilitenin Analizi	39
2.4. Anormal Spermatozoon Oranının Belirlenmesi	41
2.5. Ölü Canlı Spermatozoon Oranının Belirlenmesi	42
2.6. İstatiksel Değerlendirme	44
3. BULGULAR	45
3.1. Çözüm Sonrası Spermatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	45
3.1.1. CASA Motilite ve Progresivite Değerleri	45
3.1.2. CASA Kinetik Parametreler	46
3.1.3. CASA Canlı/Ölü Spermatozoa Oranı	48
3.1.4. CASA Anormal Normal Spermatozoa Oranı	49
3.1.5. Spermatozoa Başının ve Orta Kısımının Değerlendirilmesi	50
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	64
ÖZET	68
SUMMARY	69
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	84

ÖNSÖZ

Suni tohumlamanın belki de en önemli basamaklarından birisi olan donmuş spermanın çözündürülmesi aşaması fertilitiyi doğrudan etkilemektedir. Bu durum göz önüne alındığında teknolojinin etkin olarak kullanıldığı günümüz şartlarında uygun çözündürme sıcaklık ve zamanının belirlenmesinde CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) cihazının kullanımı elde edilecek verilerin güvenilirliğini artırmıştır. CASA parametreleri kapsamlı bir şekilde değerlendirilerek elde edilen sonuçlar saha şartlarında uygulama alanı bulacaktır. Aynı boğaya ait sperma belirlenen farklı sıcaklık ve zamanlarda çözündürüleceğinden bireysel olarak farklılığın ortaya konulması ile daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmiştir.

Spermatozoon anomalileri de boğalarda infertiliteye sebep olan önemli nedenlerden biridir. Spermatozoonların baş, akrozom, orta kısım ve kuyruğundaki anomaliler geleneksel yöntemlerin yanı sıra; CASA cihazında sperma morfoloji kiti kullanılarak da saptanmaktadır. Motilitenin yanında, spermatozoonların morfolojilerinin ortaya konulması ile elde edilen verilerin daha kapsamlı olarak değerlendirilmesi sağlanmıştır. Ayrıca belirlenen sıcaklık ve sürelerde çözündürülen spermaların motilite değerleriyle beraber ölü canlı oranları da CASA verileri ile desteklenmiştir. Böylece çalışmaya dair veriler, çözündürme sıcaklık ve sürelerinin spermatozoonlar üzerindeki etkisinin yorumlanması ile ortaya konulmuştur. Çözündürme sıcaklık ve sürelerine göre CASA cihazından elde edilen ortalama veriler, sıcaklığın ve uygulanan sıcaklıkta bekletme süresinin spermatozoonların baş ve orta kısımlarına ait değişimlerinin ne düzeyde olduğu konusunda fikir vermiştir.

Çözüm sonu parametrelerin çözündürme sıcaklık ve süreleri ile ilişkisi ortaya konulduğunda; standart olarak belirlenen süre ve sıcaklığın altına inildiğinde ya da üzerine çıkıldığında oluşacak değişimler saptanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ile sahaya yönelik ön bir çalışma yapılması amaçlanmıştır. Spermatozoonun fertilitite kabiliyeti çevresel koşullara göre değişkenlik gösterdiğinden uygulanan suni

tohumlamanın başarısı açısından optimum şartların uygulanma gerekliliği göz önüne serilecektir. Rutin laboratuvar çalışmalarında bilimsel olarak ortaya konulmuş ve kabul görmüş sıcaklık ve süre değerleri kullanılırken; saha şartları her zaman laboratuvar şartlarındaki uygulamalarla aynı olmamaktadır. Farklılığın sebebi insan faktörü ya da çevre faktörü olabilmektedir.

Bu çalışma ile saha şartlarında en çok kullanılan üç ırk olan Simental, Holstein ve Brown Swiss ırkları boğaların donmuş spermalarının, çalışma için belirlenen sıcaklık ve sürelerde çözündürülmesi sonucu CASA parametreleri bakımından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. CASA cihazı son yıllarda motilite tayini için oldukça yaygın kullanılmakta olup; spermatozoonun in vivo ve in vitro fertilizasyonu hakkında fikir sahibi olunmasını sağlamaktadır. Konvansiyonel yöntemlerin aksine daha objektif sonuçlar elde edilebilirken; hayvan türüne göre cihazda yapılabilen ayarlamalar ile spermaya dair motilite, anormal-normal ve ölü-canlı tayinleri yapılabilmektedir. Böylece tohumlamalarda kullanılacak olan spermatozoonların fertilizasyon kabiliyetine dair fikir edinilmektedir. CASA cihazı ile daha kısa sürede daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir.

Amaçlanan hedef, her bir bireyin gösterdiği farklılık ile ırksal farklılığın da ortaya konulmasıdır. Kullanılan standart bir çözündürme sıcaklığı ve zamanı olmasına rağmen farklı ırk boğa spermalarının hangi sıcaklık değerinde daha etkili olduğu bilinmemektedir. Yapılacak olan çalışma ile bir ortalama çıkarılarak uygun değer de saptanmış olacaktır. Suni tohumlamada başarı oranının artması spermatozoon motilitesi ile doğrudan ilişkilidir. Çözdürülen donmuş spermadaki spermatozoonların motilite değerleri de spermanın kaç derecede kaç saniye çözdürüldüğüyle bağlantılıdır. Elde edilen sonuçlar yıllardır süregelen standart sıcaklık ve zaman aralığının belirlenen yeni değerler ile karşılaştırılması ile ırklara göre farklılığının ortaya konulmasını sağlamıştır.

Bu araştırma, ‘‘Farklı sıcaklık ve sürelerde çözdürülen dondurulmuş boğa spermalarının CASA parametreleri ile değerlendirilmesi’’ isimli 18L0239010 proje numarası ile BAP tarafından desteklenmiştir.

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam sürecinde anlayışlı ve yardımsever tavrı ile bana katkıda bulunan danışman hocam Prof. Dr. Ongun UYSAL’a ve doktora öğrenimimin ilk yarısında danışman hocalığımlı üstlenerek yol gösterici olan Prof. Dr. Ali DAŞKIN’a, tez jürimde olarak tezime katkıda bulunan Prof. Dr. Mehmet ŞAHAL’a, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve büyük katkılarda bulunan Yrd. Doç. Dr. Koray TEKİN’e, Dr. K. Tuna OLĞAÇ, Araş. Gör. Beste ÇİL’e, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’nın tüm akademik ve idari personeline, Doç. Dr. Doğukan ÖZEN’e, TEPEGEN’den tez çalışmamızda kullanılan spermalara sağladığı destek için Mustafa Ekrem ACARA’a, doktora çalışmamın başında ve doktora sürecinde yardımlarını ve desteğini gördüğüm değerli arkadaşlarım Dr. Nafiye KOÇ, Gürkan GENÇ ve Mustafa ÇATAK’a, her zaman beni teşvik eden ve cesaretlendiren eğitim hayatım boyunca destekleriyle yanımda olan değerli aileme, doktora çalışmam boyunca yanımda olarak desteğini her zaman hissettiğim ve bundan sonra da hissedeceğimi bildiğim çok değerli Bünyamin ÇELİK’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Degree Celsius (Santigrat Derece)
ALH	: Lateral Head Displacement (Yanal Kafa Deplasmanı)
aSFP	: Acidic Seminal Fluid Protein (Asidik Seminal Sıvı Protein)
ATP	: Adenosine Triphosphate (Adenozin Trifosfat)
BCF	: Beat Cross Frequency (Çapraz geçiş frekans ritmi)
CASA	: Computer Aided Sperm Analyser (Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Cihazı)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
HSP90	: Heat Shock Protein (Isı Şoku proteini)
LIN	: Doğrusallık
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid (Mesajcı Ribonükleik Asit)
RNA	: Ribonucleic Acid (Ribonükleik Asit)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
STR	: Doğrusallık
Sn	: Saniye
VAP	: Velocity Average Path (ortalama yörünge hızı)
VCL	: Velocity Curve Linear (Eğrisel Hız)
VSL	: Velocity Straight Line (Doğrusal hız)
WOB	: Wobble (Sallanmak)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Suni tohumlamamanın öncülerinden Robert Cassou, 'Fransız' payetinin mucidi. Omzundaki buzağı babasının ölümünden 10 yıl sonra, 8 Ocak 1968'de doğmuş olan, 'Uranyum'un oğlu buzağı Victoire	2
Şekil 1.2. Suni tohumlamamanın ilk günlerinde kullanılan bir sperma ampul örneği	3
Şekil 1.3. Solda: Şubat 1939'da Amerika Birleşik Devletleri'nde Stanton, NJ'deki Schomp Çiftliğinde ticari suni tohumlama ile doğan ilk buzağı. County Agent (buzağı tutan), Dr J. Henderson – Veteriner / tohumlamayı yapan (ortada), Richard Schomp, sahibi (sağda). Sağda: 'Frosty', Amerika Birleşik Devletleri'nde dondurulmuş spermadan doğan ilk buzağı (Mayıs 1953, Janesville, Wisconsin) (Lonergan, 2018)	5
Şekil 1.4. Normal spermatozoonun bölümleri	6
Şekil 1.5. Normal spermatozoon şekli	9
Şekil 1.6. Dondurma Sıcaklığına Hücre Tepkisinin Şematik Görünümü	14
Şekil 1.7. Kriyoprezervasyon sürecinde boğa spermatozoasında oluşan hasarın elektron mikroskobu ile görüntüsü	18
Şekil 1.8. Boğa spermasının dondurulup çözündürülmesi sonrası spermatozonda oluşan değişimlerin özeti	19
Şekil 1.9. Farklı aşamalarda spermatozoon başındaki plazma membranının bütünlüğüne dair elektron mikroskop görüntüleri	20
Şekil 1.10. Spermatozoa kalitesinde düşüğe sebep olan dondurulmuş spermatozoa mitokondrisinde ROS üretimine dair özet	22
Şekil 1.11. Mitokondriyal morfoloji ve kriyoprezervasyon sonrası oluşan hasarın görüntüsü A: normal mitokondri, B,C: hasarlı mitokondri	22
Şekil 1.12. Dondurulmuş spermatozoa'nın erken embriyonik gelişimde etkisi olan protein mRNA ve genomdaki değişikliklerin erken embriyonik gelişimi etkileyebildiğine dair şematik görünüm	23
Şekil 1.13. Spermanın Çözdürülmesi	27
Şekil 1.14. CASA cihazı	33
Şekil 1.15. CASA sistemleriyle ölçülen motilite parametreleri için standart	34

terminoloji

Şekil 1.16. Farklı eğrisel hız ve ortalama yol hızı, aynı düz çizgi hızı olan iki yol örneği VCL: eğrisel hız, VSL: düz çizgi hızı, VAP: ortalama yol hızı	35
Şekil 2.1. Boğa Spermalarının Seçimi	38
Şekil 2.2. Çözüm Sonu Motilitenin CASA Cihazı ile Değerlendirilmesi	40
Şekil 2.3. CASA Cihazında Morfoloji Değerlendirmesi	42
Şekil 2.4. İkili Floresan Boyanın Uygulanması	43
Şekil 2.5. Boyama sonrası ölü canlı oranının CASA cihazında Değerlendirilmesi	44



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmada Belirlenen Gruplar	39
Çizelge 3.1. Farklı sıcaklık ve sürelerde çözdürülen spermaların kontrol grubu ile CASA'ya ait motilite parametreleri	46
Çizelge 3.2. Kinetik parametre ortalamalarının gruplara göre dağılımları	47
Çizelge 3.3. Kinetik parametre ortalamalarının gruplara göre dağılımları	47
Çizelge 3.4. CASA cihazında belirlenen Canlı/Ölü spermatozoa oranı	48
Çizelge 3.5. Çözüm sonu CASA morfoloji değerleri	49
Çizelge 3.6. Çözüm sonu CASA morfoloji değerlerine göre anormal kısım dağılımları	50
Çizelge 3.7. Spermatozoon başına ait CASA verileri	51
Çizelge 3.8. Spermatozoon orta kısmına ait CASA verileri	51

1. GİRİŞ

14. yüzyıldan kalma eski Arap belgelerine göre suni tohumlamaya dair ilk çalışmaların, sahip olduğu kısrağı düşmanına ait olağanüstü bir aygırla çiftleştirmek isteyen bir Arap kabile reisiyle başladığı bildirilmiştir. Kısrağın vajinasına yerleştirdiği pamuk aracılığıyla aygıra ait spermayı toplayarak kendi kısraklarını gebe bırakmak için kullanmıştır. Yaklaşık dört buçuk yüzyıl sonra, Spallanzani, 1776'da, karda donmuş spermatozoanın canlı kaldığını, soğuk koşullar altında geçici olarak inaktive edildiğini ve çözüldükten sonra spermatozoonların tekrar aktif hale geldiğini göstermiştir (Clarke, 2006; Lonergan, 2018). Bu gözlem, spermanın kriyoprezervasyonuna dair yöntemlerin geliştirilmesine ön ayak olmuştur. 1784 yılında, Spallanzani ilk başarılı suni tohumlamanın köpeğe uygulanarak, 62 gün sonra üç yavru doğduğunu bildirmiştir (Lonergan, 2018).

Yaklaşık 100 yıl sonra, 1897'de, Cambridge, İngiltere'de çalışan Walter Heape (1855–1919), suni tohumlamanın tavşan, köpek ve atlarda kullanıldığını bildirmiştir. Ayrıca 1890-1897 yılları arasında embriyo transferinde çığır açan deneyler yaptığı bilinmektedir (Biggers, 1991; Lonergan, 2018). 1899'da, suni tohumlama için pratik yöntemler geliştirmeye yönelik ilk girişimler Rus İlya Ivanovich Ivanoff (1870-1932) tarafından tanımlandı. Ivanoff çiftlik hayvanları, köpekler, tavşanlar ve kümes hayvanları üzerinde suni tohumlama yapmak için çalışmıştır. Sığırları suni olarak başarılı bir şekilde tohumlayan ilk kişi olduğu bilinmektedir. 1909'da, Rusya Tarım Bakanlığı tarafından suni tohumlama ile ilgili tekniklerde veteriner hekimleri eğitmek için bir laboratuvar kuruldu. Bolşevik Devrimi ilerlemeyi kestiğinde 1914'ten önce yaklaşık 400 teknisyen eğitilmişti. Suni tohumlama yöntemiyle ineklerin büyük ölçekli tohumlanması ilk olarak 1931'de 19.800 ineğin tohumlandığı Rusya'da gerçekleştirilmiştir. Spermanın toplanması, seyreltilmesi ve tohumlamada kullanılması için geliştirilmiş tekniklerin bir sonucu olarak, tohumlanan hayvanların sayısı 1930'larda büyük ölçüde artmıştır. 1938'de Rusya'da 40.000 kısrağa, 1.2 milyon ineğe ve 15 milyon koyuna suni tohumlama yapıldığı tahmin edilmektedir (Lonergan, 2018). Suni tohumlama çalışmalarına,

1938'de Rusya'da suni tohumlama hakkında bir makale yayınlayan başka bir Rus bilim adamı olan Victor Milovanov tarafından devam edildi, sığır yetiştiriciliği için büyük projeler oluşturdu ve boğa, koç ve aygırlardan sperma toplamak için ilk yapay vajinayı tasarladı (Lonergan, 2018).

Danimarkalı veteriner hekimler, serviksin rektovajinal fiksasyon yöntemini belirleyerek ve spermanın uterusun serviks kısmına veya uterusun daha derinlerine bırakılmasını sağladılar. Bu teknik, sığırlarda standart suni tohumlama yöntemi olarak günümüzde de kullanılmaya devam edilmektedir. Sorensen, 1963'te şu anda da dünya çapında kullanılan ve Fransız Robert Cassou (1914-2015) tarafından daha da geliştirilmiş ve değiştirilmiş olan dondurulmuş spermanın işlenmesi ve saklanması için sperma payetlerinin üretimini sağlamıştır (Pickett ve Berndtson, 1974; Lonergan, 2018).



Şekil 1.1. Suni tohumlamanın öncülerinden Robert Cassou, 'Fransız' payetinin mucidi. Omzundaki buzağı babasının ölümünden 10 yıl sonra, 8 Ocak 1968'de doğmuş olan, 'Uranyum' un oğlu buzağı Victoire (Lonergan, 2018).

Rutgers Üniversitesi, New Jersey'den Enos J. Perry (1891–1983), Danimarka'daki suni tohumlama tesislerini ziyaret etti ve Mayıs 1938'de ABD'deki çiftçiler tarafından sahip olunan ilk suni tohumlama çiftçi kooperatifini kurdu. Aynı yılın Haziran ayında Missouri'de bu tür ikinci kooperatif de dahil olmak üzere, ülke çapında diğerleri tarafından takip edilen New Jersey Eyaleti Tarım Koleji kuruldu. Organizasyon 102 üyeye başladı ve ilk yıl 1050 inek kaydoldu. Çalışmayı Danimarka'nın ilk derneğinde yapmış olan ilk teknisyen Dr. J.A. Henderson, 2 ay boyunca Dr. K.A.F. Larsen ile yardımcı ve danışman olarak çalıştı. Perry'nin ilk kez 1945'te (Perry, 1945) yayımlanan “Çiftlik Hayvanlarının Suni Tohumlanması” kitabı bu konuda standart referanstır. 1946'da Amerika Birleşik Devletleri'nde boğa sperması ile ilgili 84 dernek bulunmaktaydı. 1955'e kadar, kayıtlı ABD süt ineklerinin % 30'u donmuş sperma ile tohumlandı; 1965 yılına gelindiğinde, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki neredeyse tüm büyükbaş hayvanlar bu şekilde tohumlanmıştı. Ticari suni tohumlama uygulanarak doğan ilk buzağının Şubat 1939'da Amerika Birleşik Devletleri'nde Stanton, Schomp Çiftliği'nde olduğu bildirilmiştir (Lonergan, 2018).



Şekil 1.2. Solda: Şubat 1939'da Amerika Birleşik Devletleri'nde Stanton, NJ'deki Schomp Çiftliğinde ticari suni tohumlama ile doğan ilk buzağı. County Agent (buzağı tutan), Dr J. Henderson – Veteriner / tohumlamayı yapan (ortada), Richard Schomp, sahibi (sağda). Sağda: 'Frosty', Amerika Birleşik Devletleri'nde dondurulmuş spermadan doğan ilk buzağı (Mayıs 1953, Janesville, Wisconsin) (Lonergan, 2018)

Türkiye’de suni tohumlama çalışmalarına 1926 yılında sığır ve koyundan önce atlarda uygulamalara başlanılmıştır. Yeni kurulmuş olan Türkiye Cumhuriyetinin Tarım Bakanı Sabri Toprak, Sovyetler Birliğine resmi bir ziyarette bulunduğu Sovyetler Birliğindeki hayvancılığı tanıtmak amacıyla çiftlikler gezdirilmiştir ve atlardaki suni tohumlama uygulaması da gösterilmiştir. Bunun üzerine Bakan ilgililerden konunun uzmanı olan bir kişinin Türkiye’ye gönderilmesini istemiştir. Sovyetler Birliğindeki suni tohumlamanın kurucusu sayılan İlia İvanoviç İvanov’un asistanlarından Mihailov 1926 yılında Türkiye’ye gelmiştir. İlk olarak Karacabey Harasında veteriner hekimlere atlarda suni tohumlama kursu düzenlemiştir. Düzenlenen kursta Mihailov’a Nazım Uygur ve Tevfik Bulak gibi veteriner hekimler yardımcı olmuşlardır. Nazım Uygur ve Tevfik Bulak’ın sonraki yıllarda Türkiye’deki suni tohumlamanın gelişmesine büyük katkıları bulunmuştur. Aynı kursun daha sonra Çifteler Harasında da düzenlenmesi sağlanmıştır. Koyun ve Sığırlarda suni tohumlama ve kısırılık konularında yetiştirilmek üzere Tahsin Muslu, Ahmet Fahri Araz ve İsmail Hakkı Ünveren gibi veteriner hekimler Sovyetler Birliğine gönderilmişlerdir ve sonrasında Türkiye’de suni tohumlamanın gelişmesine büyük katkılarda bulunmuşlardır. İsmail Hakkı Ünveren, Atatürk’ün davetiyle Türkiye’ye ziyarette bulunarak, suni tohumlama tekniğini gören Afgan Kralı Emanullah Han’ın daveti üzerine Afganistan’a giderek suni tohumlama uygulamasının başlamasını sağlamıştır (Gökçen, 2015).

Türkiye’de suni tohumlamaya yönelik ilk düzenlemeler 30 Ocak 1985’de yürürlüğe giren “Sunî Tohumlama Yapacak Özel ve Tüzel Kişilerin Uyacakları Esaslar Hakkındaki Yönetmelik” ile gerçekleştirilmiştir. Yönetmelik ile bu tarihe kadar devlet eliyle yapılan suni tohumlama özel sektörün faaliyetine de açılmıştır. Suni tohumlama ile ilgili on yasal düzenleme 8 Mart 1995 tarihinde yürürlüğe konulmuştur. Düzenleme ile tabii tohumlama, suni tohumlama ve embriyo transferinin Bakanlık tarafından da ücret karşılığında yapılması sağlanmıştır. Bu konuda faaliyette bulunacak gerçek ve tüzel kişilerin üretim, ihracat ve ithalat izninin Bakanlıkça verileceği öngörülmüştür (Dellal ve Tan, 2001).

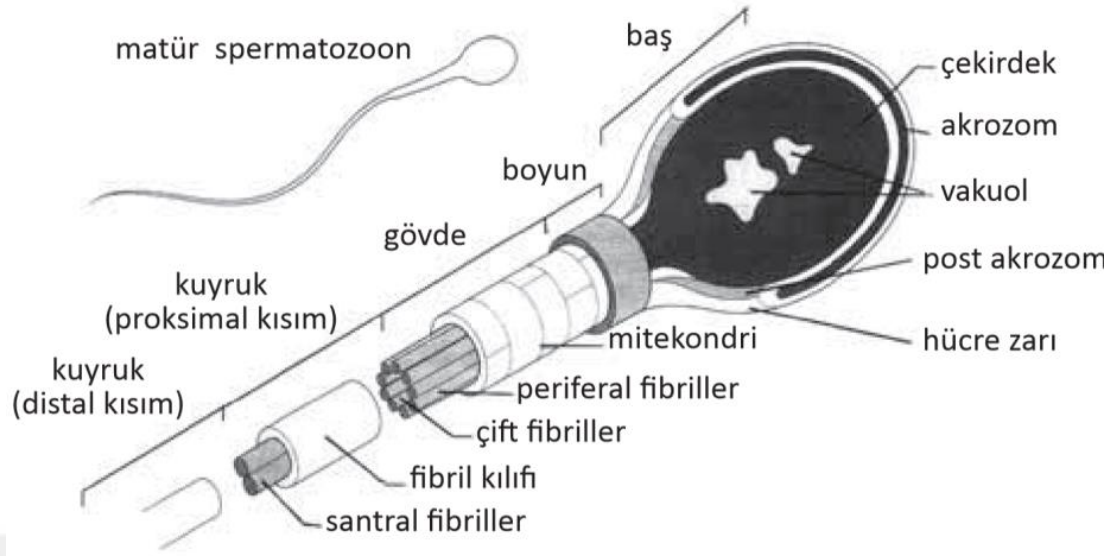
1.1. Spermatozoon Morfolojisi

Çok sayıda türdeki suni tohumlama protokollerinde spermatozoanın ortak kullanımı, subfertil veya infertil erkeklerin tanımlanmasına olan ilgiyi artırmıştır. Bu nedenle sperm morfometrisi ve fertilizasyon arasındaki ilişkiler yaklaşık bir asırdır çok sayıda çalışmanın hedefi olmuştur. Farklı faktörler morfometrik spermatozoa ölçümlerini etkilemektedir. Mevsim, yaş, ırk veya alttür ve seksüel olgunluk açısından değişkenlikler saptanabileceği bilinmektedir (Garcia-Vazquez ve ark., 2016).



Şekil 1.3. Normal spermatozoonun bölümleri (Erdemir ve ark., 2011).

Spermatozoon baş bölümünün büyük kısmını içerisindeki paternal DNA ile yoğun ve kompakt yapıdaki çekirdek kaplamaktadır. Baş kısmında ayrıca bu yapıları saran akrozom bulunmaktadır. Akrozom ise, baş ve ekvatoryal bölge olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Akrozom spermatozoon başının (nükleusun) ortalama olarak %40-70'ini kaplayan oval yapıda görülebilmektedir. Spermatidin golgi cisimciğinden oluşan akrozomal yapı, fertilizasyonda gerekli olan hyaluronidaz ve proakrozin gibi hidrolitik enzimler içermektedir. Ovumun fertilizasyonu sırasında akrozomal membran oosit plazma membranı ile birçok yerden birleşerek akrozom reaksiyonunu oluşturmaktadır ve enzimatik yapı serbest hale gelmektedir. Ayrıca akrozomal bölgede vakuoller de bulunmaktadır. Spermatozoon hareketini sağlayan kuyruk kısmı orta parçadan ince ve tek parça halindedir. Spermatozoon kuyruğunda hareketin oluşumunu sağlayan temel yapı aksonemdir ve mikrotübüllerden oluşmaktadır. Mikrotübüller ise dinein olarak bilinen yapısal bir proteinden meydana gelmektedir. Aksonem, birbirlerine karşılık gelmekte olan periferal çiftlere eşlik eden 9 ince silindirik yapıdan oluşan yoğun dış fiberler ve fibröz kılıf ile çevrelenmektedir. Kuyruk şekilli dış iskelet olarak kabul edilen fibröz kılıf, flagellar hareketin planı ve şeklini etkileyerek kıvrılma hareketi gerçekleştirmektedir (Erdemir ve ark. 2011).



Şekil 1.4. Normal spermatozoon şekli (Erdemir ve ark., 2011).

Spermatozoa, dişi genital kanalında seçime tabi tutulmaktadır. Farklı spermatozoa bileşen boyutlarının, fenotipik farklılıkları geliştiren erkek fertilizasyonunun sürekli ayarlarından sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Fitzpatrick ve Lüpold, 2014). Memeli spermatozoası, bitişik hücrelerle etkileşime girme ve buna bağlı olarak epitel yüzeyleri boyunca yüzmeye eğilimlidir (Suarez, 2016). Yapılan çalışmalar, insan spermatozoasının dişi üreme yolunda “kayma” veya iki boyutlu yüzme sergilediğini gösterdi (Nosrati ve ark., 2015). Bu yüzme modu, insan spermatozoasının benzer koşullar altında boğa spermatozodan daha hızlı ilerleme kaydetmesine izin verir, çünkü boğa spermatozoonu epitel hücre katmanından daha uzakta kalmaktadır. Flagellar uzunluk ve yapıdan kaynaklanan fiziksel farklılıklara ek olarak, dişi üreme kanalı anatomisi de spermatozoanın ilerlemesini modüle etmektedir (Garcia-Herreros ve Leal, 2014).

Toplam spermatozoon uzunluğu analiz edilen 200'den fazla memeli türü arasında uzunluklar 28.30 ila 258.33 μm arasında değişmektedir (Cummins ve Woodall, 1985; Lüpold ve Fitzpatrick, 2015; Tourmente ve ark. 2011). Sadece evcil olmayan türler göz önüne alındığında, spermatozoon boyutlarında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin, toplam spermatozoon uzunluğu, ölçülen türlerin 193'ünde

28.30 ila 189.40 μm arasında değişmektedir. Bu değerler, minimum ve maksimum değer arasında % 500'den fazla bir artışı temsil etmektedir. Evcil hayvanlar söz konusu olduğunda, türler arasındaki bu farklılık daha az belirgindir. Toplamda sadece 22 tür analiz edilmesine rağmen, uzunluk 47.21 ila 114.07 μm olarak belirlenmiştir. Daha yaygın evcil çiftlik hayvanları düşünöldüğünde, spermatozoon boyutları türler arasında oldukça benzer olarak belirlenmiştir. Her ne kadar spermatozoon rekabetinin spermatozoon büyüklüğü üzerindeki etkileri hala çözülemese de, belirtilen boyut değişikliğindeki azalmalar, genetik olarak yüksek değere sahip bireylerin seçilmesinin bir sonucu olarak evcil hayvanlarda erkek arası rekabetin azalmasının bir sonucu olabilmektedir. Ancak spermatozoon rekabet seviyesinin bazı özelliklerini nasıl etkileyebileceği hakkında çok az şey bilinmektedir (Garcia-Herreros ve Leal, 2014).

Spermatozoon canlılığı morfometri ile ilişkilendirilmiştir. Keçilerde, ölü spermatozoaların, baş genişlik, alan ve çevrelerinin donma-çözölmeden sonra canlı olanlara göre daha küçük olduğu saptanmıştır. Bu durumun muhtemelen spermatozoon membran fonksiyonunun kaybı ile ilişkili olduğu düşünölmektedir (Marco-Jimenez ve ark., 2006). Kriyoprezervasyon sonrası ölü olarak kabul edilen boğa spermatozoası, hayatta kalanlardan daha küçük boyutlar göstermektedir. Bu da spermatozoa morfometrisinin bu koşullarda membran bütönlüğü ile ilişkili değişiklikleri tespit etmek için değerli bir araç olabileceğini göstermektedir (Garcia-Herreros ve Leal, 2014).

1.2. Spermmanın Dondurulması

Sperm hücrelerinin dondurularak yaşam biyokimyasını uzun süreler saklayıp, daha sonra hayata geri döndürme, "geçici olarak durdurulmuş reanimasyon", spermmanın dondurulması olarak tanımlanmaktadır. Spermmanın ilk dondurulduğu zaman 1600'lü yılların sonuna dayanmaktadır. İtalyan bilim adamı Lazzaro Spallanzani'nin 1784 yılında donmuş sperma kullanarak, dişi köpeği tohumlaması sonrası 3 tane yavru elde ederek başarılı bir sonuç elde etmiştir (Ombelet ve Robays,

2015). Bir sonraki yüzyıl içerisinde 1899'da Ilya Ivanovich Ivanoff, çiftlik hayvanları için suni tohumlamada pratik metotlar geliştirmiştir. Ancak pek yaygın bir başarı elde edememiştir. Bilinen en erken dönemdeki dondurulup çözdürülmüş sperma ile yapılan tohumlamalardan 1951 yılında sığır, 1953'te insan, 1957'de domuz ve at, 1967 yılında da koyundan yavru elde edildiği bildirilmiştir (Curry, 2000).

1940'ların başında, kriyoprezervasyon tekniklerinin geliştirilmesinden önce, spermanın suni tohumlama için dağılımı, spermin nispeten kısa ömrü nedeniyle bir zorluk oluşturmaktaydı. Wisconsin'deki dahice ama pratik olmayan bir çözüm, taze boğa spermasını doğrudan tohumlama için çiftliklere bırakmak için küçük paraşütler kullanan bir uçak olan 'Uçan Boğa' idi. Çeşitli gruplar, acil doğum ihtiyacını azaltacak pratik bir spermatozoon yaşayabilirliğini geliştirecek çözümler aramaya devam ettiler. 1940 yılında biyokimyacı Paul Phillips ve lisansüstü öğrencisi Henry Lardy (1917-2010), yumurta sarısının bulunduğu tampon ortamın boğa spermatozoonunun fertilizasyon kabiliyetini uzun süre koruyabildiğini gösterdi (Phillips ve Lardy, 1940; Lonergan, 2018). Bu gelişme, spermanın ABD ve Kanada'nın çeşitli bölgelerine gönderilebileceği anlamına geliyordu. Gelişmelerle beraber suni tohumlama bir endüstri olarak ilerlemeye teşvik etti ve yavaş yavaş Kuzey Amerika'daki süt sürülerinin gelişmesine yol açtı. Glenn Salisbury (1910–94) ve meslektaşları, sodyum sitratlı yumurta sarısı kullanarak, 3 güne kadar 5 °C'de spermanın kullanılmasına olanak veren medyumunu geliştirdiler (Salisbury ve ark., 1941; Lonergan, 2018). Ayrıca, tohumlama başına sadece birkaç milyon spermin gerekli olduğu kavramını açıkça destekleyen birkaç klasik makale yayımlandı. Bazıları bu sulandırmayı 'sütü sulamaya' benzetmiştir (Foote, 2002) ve yumurta sarısı-sitrat-antibiyotik ortamının spermanın kullanılabilirliğini arttırdığı ve genişlettiği için Foote ve Bratton tarafından 'genişletici' teriminin kullanılmasına yol açmıştır. Bu çalışmaların net sonucu, sperma genişlemesinin en az 25 kat arttırılabilmesiydi. Sperma ile tohumlama başına spermatozoa sayısı, 100 milyondan fazla dölleme başına 4 milyon spermatozoon düşürüldü. Salisbury'nin Gunsalus ve daha sonra Robert Foote (1922-2008) ile boğa spermasının bakteriyolojisi ve patojenlerin kontrolü ile yumurta sarısı-sitrat ortamına antibiyotiklerin dahil edilmesi, süt

sığırcılığında büyük bir kısırılık iyileşmesine yol açtı ve suni tohumlamanın benimsenmesini hızlandırdı (Lonergan, 2018). 1950'leri takip eden süreç içerisinde farklı katkı maddeleri, saklama metotları ve prosedürleri geliştirilerek suni tohumlama alanında dünya çapında kullanılmaya başlanılmıştır (Walter ve ark., 2009).



Şekil 1.5. Suni tohumlamanın ilk günlerinde kullanılan bir sperma ampul örneği (Lonergan, 2018)

Spermanın dondurularak saklanması, genetik olarak değerli olan hayvanların tüm dünyada kullanılabilir olmasına imkan vermektedir. Ancak dondurulma sürecindeki spermatozoonların büyük bir kısmının ölüyor olması henüz spermanın dondurulması sürecinde istenilen noktaya ulaşamadığını göstermektedir. Dondurulma sürecinde ozmotik denge, oksidatif stres ve hücre içi buz kristallerinin oluşması sebebiyle spermatozoa fiziksel ve yapısal bir takım değişikliklere maruz kalmaktadır. Buna dayanarak; spermanın dondurulmasında spermatozoonların minimum hasar görmesi için çeşitli kriyoprotektan maddelerle, antioksidanların eklenmesi gerekmektedir (Uğur ve ark., 2019). Kriyoprezervasyon protokolleri türler arasında farklılık gösterir, çünkü şekil, hacim, organel büyüklüğü ve bileşiminde spermatozoa farklılıkları vardır (Medeiros ve ark., 2002). Tüm türlerde, bireyler arasındaki farklılıklar genetik kökenlidir. Çözülmüş sperma kalitesinin kötü veya iyi olarak sınıflandırıldığı domuzlar arasında spesifik DNA sekanslarındaki farklılıklar tanımlanmıştır (Thurston ve ark. 2001). İyi geliştirilmiş protokollerle bile

spermatozoanın % 40-50'si kriyoprezervasyonu desteklemez ve bireysel varyasyonlar tespit edilir (Isachenko, 2003).

Spermatozoon vücutta bulunan diğer hücrelerle kıyaslandığında daha düşük oranda su içermeleri ve membranlarının daha akışkan bir özelliğe sahip olması nedeniyle dondurulması sırasında daha çok hasara maruz kalmaktadır. Spermanın dondurulma tarihi temel alınarak, memeli spermasının başarılı bir şekilde dondurulması üzerine metotlar geliştirilmiştir. Günümüzde bile sadece birkaç memeli türünün spermasının etkin bir şekilde dondurulması mümkün olmaktadır. Dondurma sürecindeki başarı faktörü, dondurulmuş spermanın çözümü motilitesi tarafından belirlenmektedir ki bu oran; genelde % 50 civarında ya da dondurulma öncesindeki motiliteden düşük olmaktadır. Aynı zamanda dondurma sürecindeki başarı türler arasında yüksek oranda değişmekle birlikte, aynı tür içerisindeki farklılıklara ek olarak aynı bireyin farklı ejakülatlarında dahi farklılıklar gösterebilmektedir.

Spermanın dondurulmasında dondurma prosedürlerini optimize etmek için farklı protokoller geliştirilmiştir. Soğutma ve dondurma sürecinin spermatozoon üzerindeki etkilerinin belirlenmesi bu protokollerin geliştirilmesine yardımcı olmuştur (Sieme ve ark., 2016). Soğutma aşaması, çözümü spermatozoon canlılığını önemli derecede etkileyen spermatozoa metabolizmasının düşürülmesini kapsayan sperma dondurulmasındaki önemli aşamalardan birisidir (Salamon ve Maxwell, 2000).

Reprodüktif kriyobiyoloji, en hızlı ilerlemeyi boğa spermasının dondurulmasında sağlamıştır. Temel olarak kullanılan 2 tip dondurma stratejisi bulunmaktadır. Bunlardan ilki konvansiyonel (yavaş dondurma), ikincisi ise hızlı dondurma tekniğidir. Bu türün spermatozoası için en başarılı kriyoprezervasyon yöntemleri ilk olarak yavaş soğutma hızı (örn. 1-5 °C/dk) ile vücut sıcaklığından oda sıcaklığına ve sonrasında donma sıcaklığına ve takiben ilk buz oluşumu ile hızlı dondurmaya (örneğin, 10-20 °C/dk) alınmasıdır. Yavaş dondurma tekniği, 2-4 saatlik bir periyotta, iki veya üç kademe ile spermanın -196 °C'ye düşürülmesi yöntemidir;

elle veya otomatik olarak yarı-programlanabilir dondurucu kullanılarak yapılmaktadır. Manuel yöntemde, sperma önce oda sıcaklığına (25 ° C); daha sonra 2-4 saat içerisinde 4 °C'ye düşürülmektedir. 4 °C'ye kadar en iyi soğuma hızının 0.5-1 °C/dk olduğu bildirilmektedir. Örnekler daha sonra 4 °C'den, -80 ° C'ye 1-10 °C/dk hızında dondurulur; sonrasında -196 ° C'de sıvı azot tankına aktarılır (Di Santo ve ark., 2012).

Hızlı dondurma metodu ilk kez Sherman (1963) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik, payetlerin ve sıvı azot buharı ile 8-10 dakika doğrudan teması ve sonrasında -196 °C'de sıvı nitrojen içerisinde indirilmesini kapsamaktadır. Programlanabilir dondurucuda; sıvı azot buharını, sıvı azotun hacmini ve mesafesini ayarlayan fonksiyonel bir termal derece bulunmaktadır. Sperma örneği en az 2 saat ekilibrasyon sonrasında payetler yardımıyla paketlenir ve 10 dakika boyunca 4 °C'de inkübasyona bırakılır. Payetler daha sonra 15 dakika süreyle sıvı azot seviyesinden (-80 °C) 15-20 cm uzaklığa yerleştirilir; bu aşamadan sonra payetler sıvı nitrojene indirilir. Soğutma sırasında, iki uç arasındaki sıcaklık farkını en aza indirmek için payetler yatay konumda tutulur (Tongdee ve ark, 2015). En uygun soğutma hızı; boğada 76 ve 140 ° C/dk, domuzda 30 °C/dk, farede 27 ila 130 ° C/dk arasında ve insanda 10 °C/dk olarak belirlenmiştir (Varışlı ve ark., 2013).

Bu iki temel tekniğin dışında liyofilizasyon (Krokida ve ark., 1998) ve vitrifikasyon da (Isachenko ve ark., 2002) spermatozoa dondurmada (Isachenko ve ark., 2011) kullanılmaktadır. Günümüzde vitrifikasyon ve liyofilizasyon yönteminin pratik kullanımı yavaş veya hızlı dondurmaya göre düşüktür. Ancak vitrifiye edilmiş sperma ile IVF/ICSI ve intrauterin tohumlama gerçekleştirilerek gebeliklerin elde edilmesi, bu metodun pratik kullanımına dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, bazı sperma merkezlerinin vitrifikasyon ile uzun süreli sperma saklanabildiğini rapor etmesi ve uygulama pratikliği sayesinde birkaç yıl içerisinde bu yöntemin kullanımının yaygınlaşması beklenmektedir (Moce ve ark., 2016).

Sperm kriyoprezervasyon yöntemlerini geliştirmek için, bu işlem sırasında spermin geçirdiği fiziksel değişiklikleri göz önünde bulundurmak fayda sağlayacaktır. Çünkü bu fiziksel değişiklikleri düzenlemek için yapılan ilerlemeler, canlılık oranlarını belirgin ölçüde artıracaktır (Holt, 2000). Pratik olarak, sperma kriyoprezervasyon için generalize “standart” protokol istenen bir şeydir. Ancak, güncel sperm kriyoprezervasyon protokollerinin sınırlıdır ve başarı oranları türler arasında ve hatta aynı tür içindeki bireyler arasında dahi değişkenlik göstermektedir (Hammerstedt ve ark, 1990).

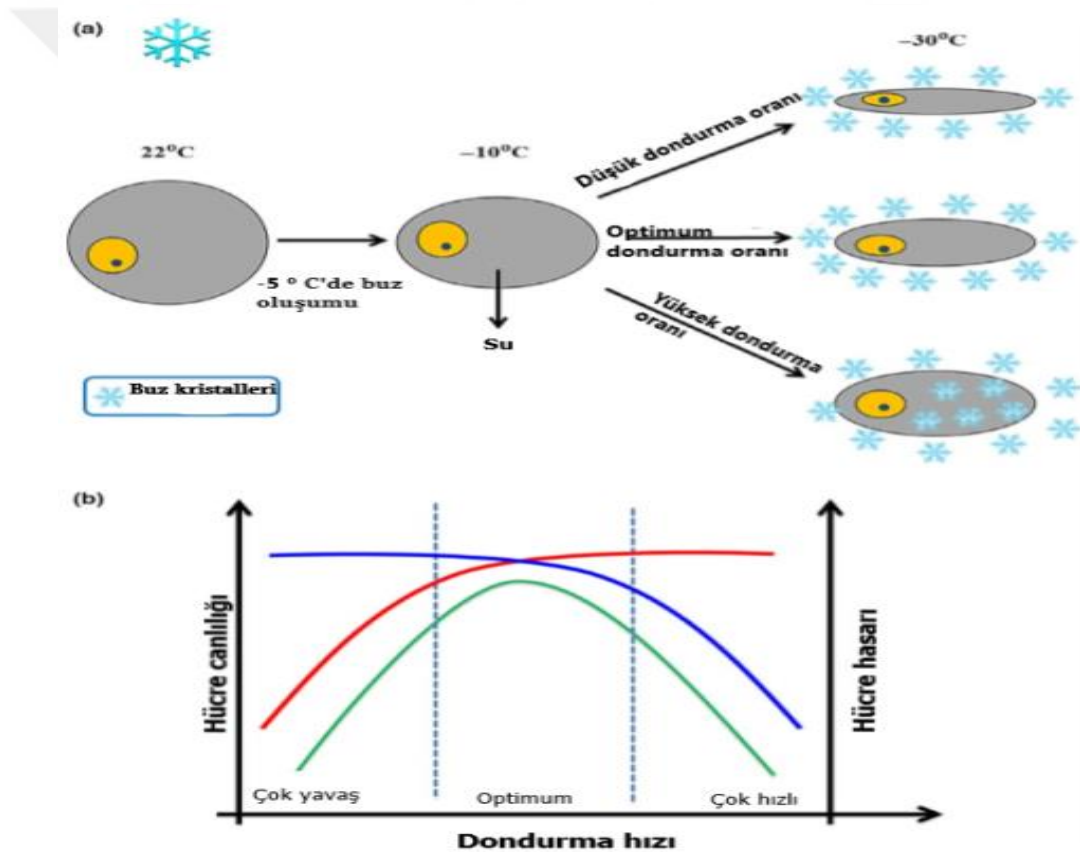
1.2.1. Boğa Spermasının Dondurulması

Boğa spermasının dondurulma prosedürleri 1950’li yılların başlarında suni tohumlamada kullanılmak üzere geliştirilmeye başlanılmıştır. Bratton ve arkadaşlarının 1955 yılında yapmış olduğu denemede sperma $-79^{\circ}C$ ’de dondurularak kuru buz içerisinde saklanmıştır. Bu çalışmanın sonunda spermatoozonların yüksek fertilité oranına sahip olduğu saptanmıştır. Birkaç farklı katkı maddesinin geliştirilmesi ile dondurma sonrasındaki düşük sıcaklıklarda bile yüksek motilité değerinin muhafazasını sağlanabilmiştir. Bu katkı maddelerinin geliştirilmesindeki ilk aşamalarda yumurta sarısının içerisinde bulunan lipitlerin hücre hassasiyetini düşürerek, boğa spermasını soğuk şokundan koruduğu ortaya konulmuştur (Watson ve Martin, 1973). Yumurta sarısının spermanın dondurulmasında kullanılmasının ardından, gliserol de kriyoprotektif ajan olarak boğa spermasının dondurulma sürecine dahil edilmiştir.

Bütün bu çalışmaların sonunda günümüzde de standart prosedür olarak kullanılan Tris-yumurta sarısı-gliserol boğa spermanın dondurulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Watson ve Martin, 1975). Boğa spermasının dondurulma prosedürü yıllar içerisinde çok fazla değişikliğe uğramadan devam ettirilmiştir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda boğa sperması kolesterol eklenerek dondurulmuştur. Purdy ve Graham’ın 2004 yılında yapmış olduğu çalışmada kolesterol eklenerek spermanın dondurulmasında motilité üzerine olumlu etkisi

olduğu ortaya konulmuştur. Eklenen kolesterolün kapasitasyon ya da akrozom reaksiyonu gibi süreçlere etki ederek fertilité üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Boğa spermasının dondurulmasındaki yaygın çalışmalar suni tohumlama ve in vitro fertilizasyon gibi yardımcı üreme tekniklerinin yaygın olarak kullanılmasıyla doğrudan ilişkilidir. Genetik olarak değerli olan ve iyi verim özelliklerine sahip boğaların spermalarının dondurularak yıllar sonra bile tohumlamada kullanılabilmesine olanak sağlarken; üstün genetik özelliklerden maksimum oranda yararlanım sağlanmaktadır.



Şekil 1.6. Dondurma sıcaklığına hücre tepkisinin şematik görünümü. a) dondurma çok yavaş olduğunda hücre içi buz kristali gözükmezken; dehidrasyon oldukça fazladır. Çok hızlı olduğu koşullarda hücre içinde organellere zarar vermekte ve/veya çözündürme sırasında yeniden kristalizasyon oluşumuna neden olmaktadır (Mazur, 1977a, 1984; Gao ve Critser, 2000; Yeste, 2016; Grötter ve ark., 2019). b) dondurma hızına göre hücre canlılık eğrisi (yeşil eğri). Kırmızı eğri buz kristalleri tarafından oluşturulan hasarı; mavi eğri ozmotik etki tarafından oluşturulan hasarı göstermektedir (Mazur ve ark., 1972; Benson ve ark., 2012; Grötter ve ark., 2019).

Dondurmanın amacı sıfırın altında sıcaklıklarda hücre üzerindeki zararlı etkisine rağmen hücre canlılığının ve fonksiyonlarının devam etmesini sağlamaktır. Dondurma sırasında hücre hasarının iki farklı mekanizma nedeniyle oluştuğu belirlenmiştir. Bunlardan biri buz üretimi iken diğeri ozmotik stres ya da hücre dehidrasyonu olarak adlandırılmıştır. Bu iki faktörün her biri dondurma hızı ile ilişkilidir (Mazur, 1970, 1977a, 1977b; Meryman, 1974; Grötter ve ark., 2019). Hücre içinde herhangi bir değişiklik olmazken, hücre dışı ortamda çözünen maddelerin konsantrasyonunun artmasıyla hücre dışındaki buz oluşumları izotonik dengeyi değiştirmektedir. Hücre zarının yarı geçirken yapısı sebebiyle hücre içi ve dışındaki boşlukta çözünen maddeler farklı hücrel basıncı oluşturmaktadır. Bu basınç farkı hücre içi ve hücre dışı arasında düşük basınçtan yüksek basınca doğru bir sıvı akışı olmasına sebep olmaktadır. Hücre dışında oluşan buz kristalleri hücre içinden su çıkışına sebep olarak dehidrasyona yol açmaktadır. Hücre içinde oluşan bu boşluğa ne olacağı da dondurmanın ne oranda olacağına bağlıdır. Eğer dondurma çok hızlı olursa hücre içerisindeki su hücre dışına çıkamadığından su hücre içinde donarak hücrel zarara neden olabilmektedir. Düşük hızda dondurma gerçekleştirilirse, yoğun ve uzun bir dehidrasyon gerçekleşerek mekanik deformasyona neden olmaktadır ve aynı zamanda hücre içerisinde yoğun miktarda elektrolit birikmektedir (Mazur, 1970; Grötter ve ark., 2019). Bunlara dayanarak, hücre volumü hücre dışı ozmolaritenin yükselmesiyle ve hücrenin su kaybetmesiyle birlikte sitoplazmik içeriğin basıncı hücrenin su kaybetmeye devam etmesini sağlayarak hücre direncini artırmaktadır. Hücrel dirence zarar verecek herhangi bir etken hücrede membran hasarları oluşturarak; hücrenin permeabilitesinde geri dönüşü olmayan hasarlar bırakıp hücrenin lipid kaybetmesine neden olabilir. Hücrede oluşacak bu hasarlar izotonik ortamda hücrenin tekrar su almasına ve normal şeklini tekrar kazanmasına imkan vermeyecektir (Grötter ve ark., 2019).

Çözüm sonu hücre canlılığını artırmak için optimum hızda hücrenin dondurulması gerekmektedir. Bu sebebe dayanarak, asıl görevleri sıvı haldeki maddelerin sıvı formunu koruduğu sıcaklıkları minimuma indirmek olan ve aynı zamanda suyun transport hızı ve buz oluşumu üzerine etkileri olan kriyoprotektan ajanlar (Jeyendran ve Graham, 1980) dondurma medyumuna eklenmektedir

(Fuller, 2004; Mazur, 1977a, 1984; Meryman, 1974; Grötter ve ark., 2019). İki çeşit kriyoprotektan bulunmaktadır. Bunlardan biri penetre olan permeabl diğeri penetre olmayan özelliğindedir. Permeabl özellikteki kriyoprotektanlar hücre dondurulmasında yaygın olarak kullanılmakta olup; en çok gliserol, dimetil sülfoksit, 1-2 propaneidol, etilen glikol ve propilen glikol gibi maddeler kullanılmaktadır. Permeabl kriyoprotektanların özellikleri, düşük molekül ağırlığına sahip olmaları ve düşük dondurma hızında hücre içinden etkin bir şekilde su çıkışını sağlamalarıdır. Penetre olmayan kriyoprotektanlar ise; polivinil prolidon, glikoz, fruktoz, fikol, dekstran, sorbitol, sükroz, laktoz, trehaloz ve diğere şeker türevleridir. Bu kriyoprotektanlar, yüksek moleküler ağırlıkta olup; yüksek dondurma hızında daha etkinlerdir. Bu komponentler ozmotik basınç farkını kullanarak penetre olmadan suyun hücre dışına çıkışını sağlamaktadır (Curry, 2000; Jeyendran ve Graham, 1980; Benson et al., 2012; Grötter ve ark., 2019).

Spermanın kriyoprezervasyonun temeli şu aşamalara dayanmaktadır;

- a) Spermayı dondurmadan önce kriyoprotektanların eklenmesi,
- b) Sıfırın altındaki sıcaklıklarda saklamak için spermanın dondurulması (genellikle sıvı nitrojen içerisinde -196°C 'de gerçekleştirilmektedir.)
- c) Spermanın çözündürülmesi,
- d) Kriyoprotektanların spermadan uzaklaştırılarak, volümün, fonksiyonun ve izotonik şartların sağlanması. Hücre hasarı oluşumu bu aşamalardan biri ya da birkaçı sırasında oluşmaktadır.

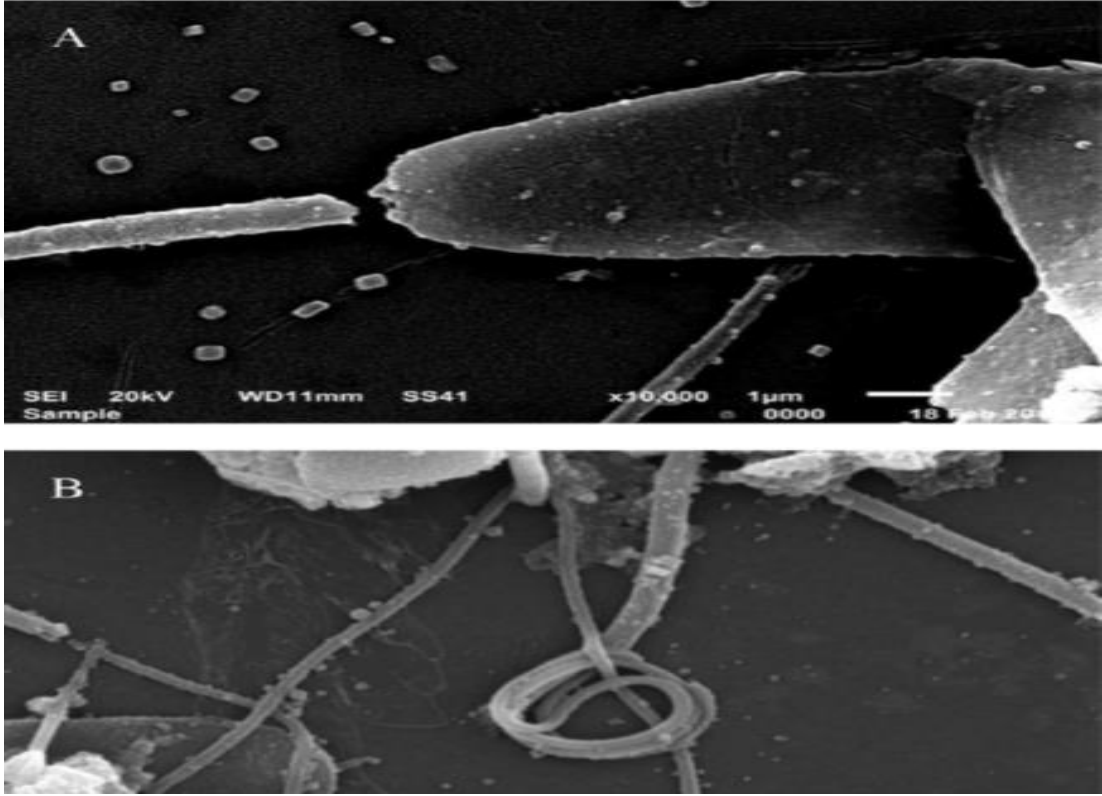
-15°C ve -60°C sıcaklıklar sperma dondurulurken ve çözündürülürken spermatozoonların iki defa maruz kaldığı sıcaklık aralığı olması ile; spermatozoonların likit nitrojen içerisindeki dondurularak saklanması sürecinden daha zararlı bir sıcaklık aralığıdır. Çoklu Termal Gradyan olarak adlandırılan geliştirilmiştir. Bu metot ile spermatozoonlara zarar veren sıcaklık aralığının oluşturduğu hasarın daha aza indirilmesi, hücre içi ve hücre dışı buz oluşumuna engel olunması ve buz yayılma hızını kontrol altında tutulması gibi faydalar sağlamıştır (Arav, 1999; Si ve ark., 2006; Grötter ve ark., 2019).

1.3. Kriyoprezervasyonun Spermatozoon Üzerine Etkisi

Spermanın kriyoprezervasyonu; sıcaklığın düşürülme aşaması, hücrenin dehidrasyonu, dondurma, saklama ve sonrasında çözündürülme aşamalarını kapsamaktadır. Spermatozoa açısından soğutma işlemindeki 0 °C ile -5 °C ve buz kristallerinin oluştuğu -6 °C ile -15 °C arasındaki sıcaklıklar kritiktir (Woelders, 1997). Kriyoprezervasyon boyunca spermatozoon; metabolik ayrışma, iyonik dengesizlik, proteazların aktivasyonu, hücresel asidoz, enerji kaybı, membran faz geçişi, hücre iskeletinde bozulma ve serbest radikallerin oluşumu gibi bir çok zararlı etkiye maruz kalmaktadır. Bu süreçte spermatozoon buz kristal oluşumunun zararlı etkilerine, hiperozmolariteye, hücre volümünde değişimlere ve protein denatürasyonuna predispoze hale gelmektedir (Uğur ve ark., 2019). Spermanın sıvı azot buharında dondurulması sırasında soğuk şokunun olumsuz etkileri sebebiyle spermatolojik özelliklere ait değişimler olabilmektedir. Hücre membranında gerçekleşen perforasyonun, özellikle akrozomda oluşan ve fertilizasyonda görevli enzimlerin kaybına yol açmaktadır. Bu durumda spermatozoanın dölleme yapamadığı kabul edilmektedir (Watson, 2000). Kriyoprezervasyon, spermatozoa fonksiyonunda ve yapısında soğutma, dondurma ve çözündürme sırasında oluşan termal stres ile kriyoprotektan ajanların yüksek konsantrasyonu ve kristalizasyon sebebiyle oluşan ozmotik strese dayanan toksik etkiler meydana getirmektedir. Fosfolipit ve kriyoprotektan ajanlara ek olarak optimum dilüsyon, ekilibrasyon ve soğutma prosedürleri uygulanarak soğuk şokunun oluşumu engellenerek, kristalizasyon düşürülür ve spermatozoon hasarı minimize edilmiş olunur (Khalil ve ark., 2018).

37 °C sıcaklıkta spermatozoon motilite ve viabilite açısından normal değerlere sahipken; soğutma ve ekilibrasyon süresince motilite’de belirgin düşüşler görülmüştür. Kriyoprezervasyon sonrası spermatozoon kuyruğunda kopmalar ile başta oluşan anormallikler olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca dondurma periyodu boyunca akrozom reaksiyonunun yükseldiği belirlenmiştir. Spermatozoon mitokondrisi incelendiğinde daralmış membran boşluğuyla vakuoller olduğu

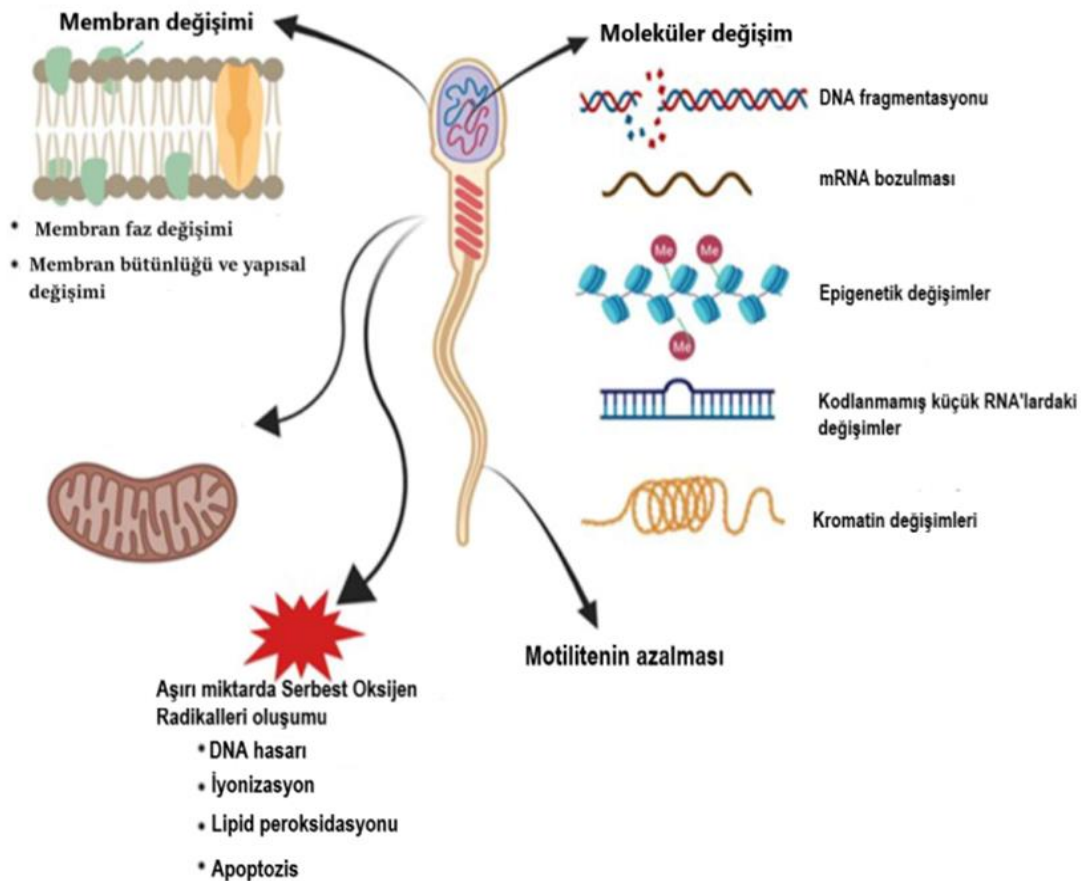
görülmüştür. Taze spermada, normal spermatozoon başında homojen kromatin yapının tam bir plazma membrane ile çevrelenmiş nükleusu olduğu görülür. Dondurulup çözündürülmüş spermatozoonda ise, kromatin hasarları olduğu belirlenmiştir (Khalil ve ark., 2018).



Şekil 1.7. Kriyoprezervasyon sürecinde boğa spermatozoasında oluşan anomalilerin elektron mikroskopundaki görüntüsü. A: Kopmuş ve yarılmış baş; B: sarmal hale gelmiş kuyruk (Khalil ve ark., 2018)

Spermanın dondurulmasındaki anahtar faktör, spermatozoonların küçük ancak yüzey alanının geniş olduğunun bilinmesidir (Morris, 2006; John Morris ve ark., 2012). Bu karakteristik özellik, spermatozoonlarda bulunan hücre içi sitozolün viskozite ve sıcaklık geçisini etkileyerek potansiyel hasara karşı spermatozoayı daha hassas hale getirmektedir (Isachenko ve ark., 2003). Kriyoprotektan ajanlar olmadığında soğuk şoku ve oluşan buz kristalleri hücre içerisindeki organellere zarar vermektedir (AbdelHafez ve ark., 2009). Sonuç olarak hücresel komponentlerin oksidasyonu ve DNA (Deoksiribonükleik Asit), akrozom ve plazma membranının

hasarı sonucu fertilite azalmaktadır. Reaktif Oksijen Türlerinden (ROS) olan hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri; apoptozis, membran lipit peroksidasyonu ve DNA hasarına neden olmaktadır. Spermatozoonu soğuk şokuna ve kriyotoleransa hassas kılan yapının başında plazma membranındaki lipit yapı gelmektedir. Farklı türlerin sahip olduğu spermatozoa yağ asidi profilindeki ve omega3/omega6 oranındaki farklılıklar sebebiyle değişen kriyotolerans düzeyi sergilemektedir (Esmaili ve ark., 2015). Ayrıca farklı türlere ait spermatozoa farklı büyüklük, şekil ve lipit kompozisyonu ihtiva ettiğinden kriyoprezervasyona olan dirençliliği de değişim göstermektedir (Maldjian ve ark., 2005; Esmaili ve ark., 2015; Fattah ve ark., 2017). Farklı türlere ait spermalarla yapılan çalışmada spermatozoa başının çapı ile kriyostabilitesi arasında negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir. İnsan spermatozoası daha küçük olduğu için daha iyi kriyostabilite göstermiştir (Gao ve ark., 1997). Motilite gibi dondurma öncesindeki kalite parametreleri ve sperma alınan hayvandan ne sıklıkla sperma alındığı çözündürme sonrası canlılığı etkilemektedir. Anormal motilite özellikleri taşıyan spermatozoa dondurmaya bağlı hasarlardan özellikle sorumludur (Borges ve ark., 2007).

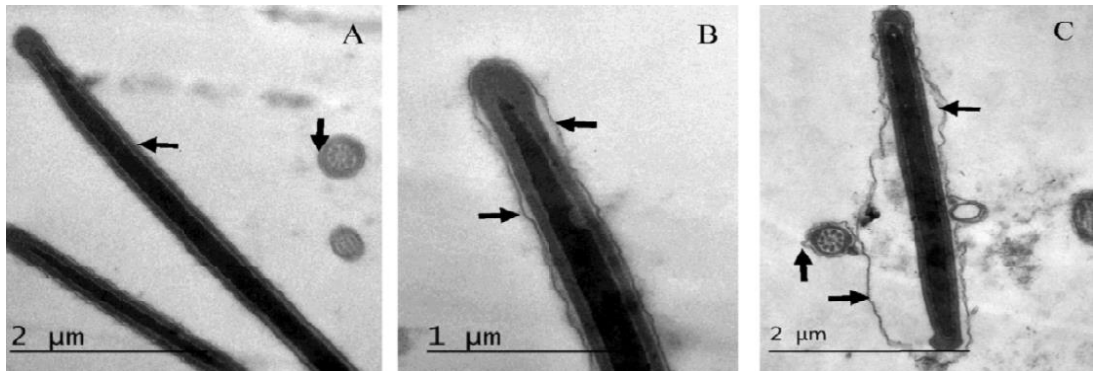


Şekil 1.8. Boğa spermasının dondurulup çözülmesi sonrası spermatozoonda oluşan değişimlerin özeti (Uğur ve ark., 2019)

1.3.1. Membrandaki Yapısal Değişim

Kriyoprezervasyonda hücresel hasarın asıl sebebi, plazma membran hasarıdır. Çift katlı membranın lipit yapısının soğuk şokuna maruz kalmasıyla ortak bir durum olduğu düşünülmektedir (Watson, 1995). Türler arasındaki spermanın dondurmaya verdiği farklı yanıt, spermatozoa plazma membranındaki yapısal farklılıklarından kaynaklanmaktadır.

Plazma membran duyarlılığı dondurma sürecinde lipit faz değişimine maruz kaldığından kolesterol oranıyla tersine bir ilişki göstermektedir (Drobnis ve ark., 1993). Boğa ve koç spermatozoasındaki düşük düzeyde kolesterol varlığı soğutmaya karşı hassas olmalarına sebep olmaktadır. Tavşan ve insan spermatozoasında daha yüksek oranda bulunmasıyla da bu iki türün soğuğa daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Dondurma sırasında sıcaklık düşmeye başlayınca fosfolipit yapının yana doğru hareketi ile likit fazdan jel faza geçiş sonrası membranın daha sert ve hassas olmasına neden olmaktadır. Ayrıca, kriyoprotektan madde olarak kullanılan gliserol soğutma sırasında faz değişimlerinin bazılarını, plazma membranındaki su geçişi ve akışını azaltarak sağlamaktadır (Noiles ve ark., 1995). Faz değişimi lipit membranı da kapsayacak şekilde lipit faz ayrılmasına neden olur. Bu faz ayrılması proteinlerin geri dönüşümsüz olarak kümelenmesine yol açar (Uğur ve ark., 2019).



Şekil 1.9. Farklı aşamalarda spermatozoon başındaki plazma membranının bütünlüğüne dair elektron mikroskop görüntüleri. A: taze spermadaki sağlam plazma membranı; B: sulandırılmış spermadaki belli belirsiz dalgalanma gösteren plazma membran; C: dondurulup çözündürülmüş spermada belirgin şekilde dalgalanma gösteren plazma membranı (Khalil ve ark., 2018)

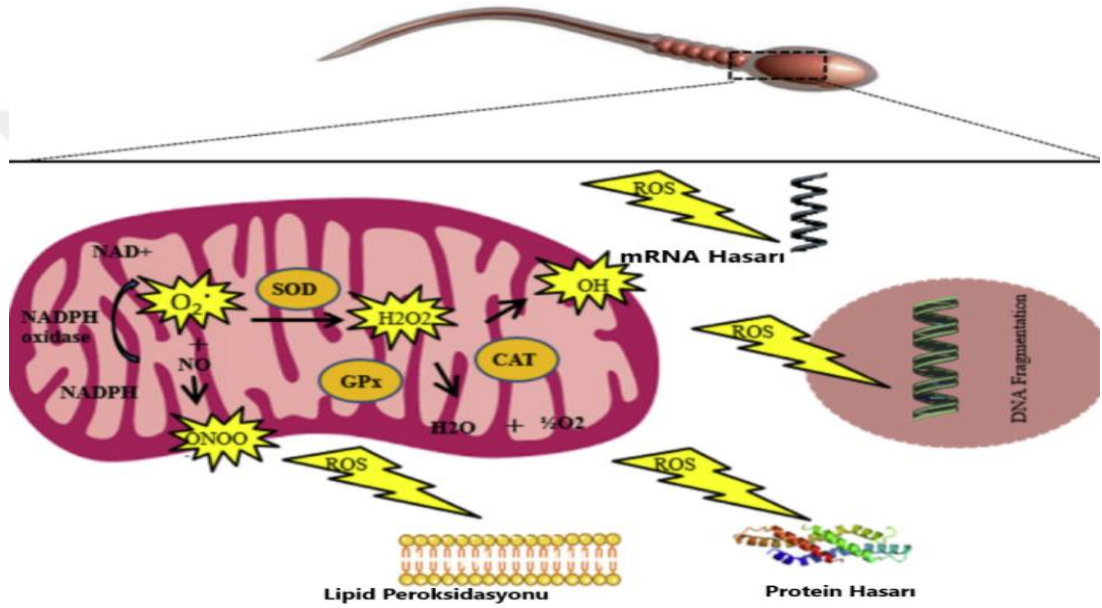
Düşük sıcaklıklara olan duyarlılık plazma membranındaki doymuş ya da doymamış yağ asidinin yüksek oranda oluşuyla da ilgilidir. Boğa, koç ve domuz spermatozoonunda doymamış yağ asidinin doymuş yağ asidine oranla daha fazla (>2.5) olması sebebiyle tavşan, köpek ve insan spermatozoonuna göre dondurmaya karşı daha hassastır (White, 1993). Doymamış yağ asitleri peroksidasyondan sorumludur (Halliwell ve Gutteridge, 1984). Dondurulup çözündürülmüş boğa spermasının taze spermaya göre peroksidasyona daha yatkın olduğu belirlenmiştir (Trincherro ve ark., 1990).

1.3.2. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Oluşumu

ROS, fertilité ve infertilide önemli rol oynayan bir faktördür. ROS 'un hiperaktivasyon, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve zona'ya bağlanma gibi normal spermatozoon fonksiyonlarında görev aldığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Kodama ve ark., 1996; de Lamirande ve ark., 1997). Antioksidanlar tarafından oluşturulan detoksifikasyon ile ROS üretimi arasındaki balans bozulduğunda; ROS oranındaki fazlalık oksidatif strese sebep olmaktadır. ROS olarak bilinen Hidrojen Peroksit (H_2O_2), spermatozoon motilitesini düşürmektedir ve oksidatif metabolizmayı bloke etmektedir (Tosic, 1947). Sperma dondurulurken eklenen antioksidanlar sayesinde ROS'un zarar verici etkilerini azaltmaktadır.

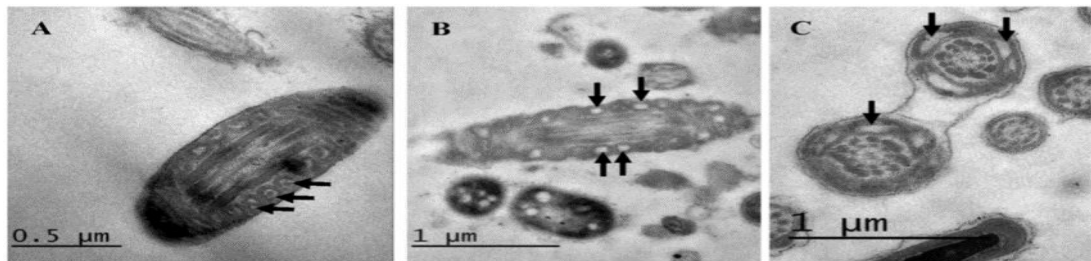
Kriyoprezervasyon sırasında mitokondriyal membran akışkanlığındaki herhangi bir değişim ROS oluşumuna yol açarak membran potansiyelini değiştirir (Said ve ark., 2010; Uğur ve ark., 2019). Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Nitrik Oksit (NO) ve Süperoksit Anyon (O_2^-) hücre içi sinyalizasyonu, sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu üzerinde pozitif etkiye sahiptir (Aitken, 1995). Bu moleküllerin

işleyiş için gerekli olan miktarları spermatozoa fizyolojisinde önemli bir rol oynarken; yüksek miktarda oluşmaları toksisiteli sebebiyle spermatozoa fonksiyonuna zarar vermektedir. ROS'un spermatozoa üzerindeki mekanizması tam olarak ortaya konulmasa da; bu moleküllerin oksijen moleküllerinin indirgenmiş ürünü olduğu ve toksisitenin iyonizasyon, lipit peroksidasyonu ve DNA hasarının neden olduğu protein inaktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Uğur ve ark., 2019).



Şekil 1.10. Spermatozoa kalitesinde düşüğe sebep olan dondurulmuş spermatozoa mitokondrisinde ROS üretimine dair özet. NADPH: Dihidronikotinamid-adenin Dinüklotit Fosfat; O₂: Superoksit; H₂O₂: Hidrojen Peroksit; SOD: Superoksit Dismutaz; ONOO: Peroksinitrit; GP_x: Glutasyon Peroksit; CAT: Katalaz (Hezavehei ve ark., 2018)

Dondurulup çözdürülmüş spermadaki spermatozoonların mitokondriyal



morfolojisinde oluşacak herhangi bir değişiklik, mitokondriyal fonksiyonlarda %15 oranında düşüğe sebep olmaktadır. Mitokondri'de spermatozoa motilitesinde ve

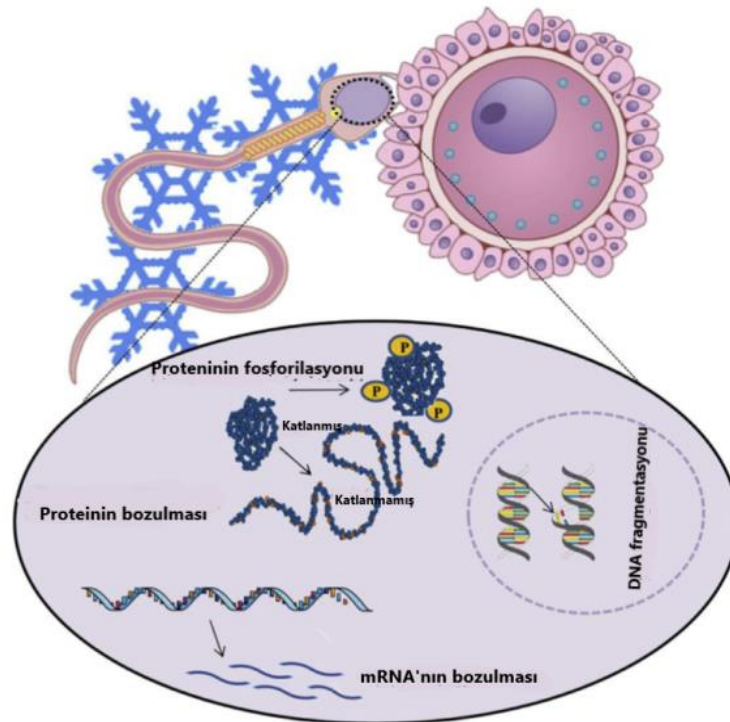
hiperaktivitesinde kullanılan ATP (Adenozin Tri Fosfat) üretilmektedir (Khalil ve ark., 2018). Bu durum spermatozoa parametrelerini de olumsuz etkilemektedir.

Şekil 1.11. Mitokondriyal morfoloji ve kriyoprezervasyon sonrası oluşan hasarın görüntüsü. A: normal mitokondri, B,C: hasarlı mitokondri (Khalil ve ark., 2018).

1.3.3. Moleküler Değişim

Spermatozoa dondurulabilirliğinde belirleyici moleküllerin identifikasyonu, kriyoprezervasyonda kullanılacak olan en faydalı maddelerin belirlenmesi açısından yardımcı olabilecektir. Dondurulabilirlikteki belirleyici etkenler genellikle canlılık, motilite ve morfoloji gibi özelliklerin belirlenmesi ile mümkün olmaktadır. Sperma kalitesinin belirleyici özelliklerinden olan spermatozoanın DNA bütünlüğü ve kromatin yapısı, kriyoprezervasyona olan direnç ve embriyo gelişiminin desteklenmesi bakımından önem taşımaktadır (Agarwal ve ark., 2009).

DNA bütünlüğü spermanın dondurulup çözülmesi sonrası olumsuz etkilenmektedir. Bunun sonucunda embriyo gelişimi üzerinde etkisi olan DNA, moleküler ve epigenetik değişimlere duyarlı ve yatkın olmaktadır (Lewis ve ark., 2005).



Şekil 1.12. Dondurulmuş spermatozoa'nın erken embriyonik gelişimde etkisi olan protein mRNA ve genomundaki değişikliklerin erken embriyonik gelişimi etkileyebildiğine dair şematik görünüm (Hezavehei ve ark., 2018).

Kriyoprezervasyon sırasında oluşan ROS sebebiyle çift iplikçikli yapının kırılması (McCarty ve ark., 2009), DNA onarıcı enzimlerin bozulması (Bogle ve ark., 2017) ve hücre küçülmesi sebebiyle kromatin sıkışmasının arttığı yerlerde DNA molekülündeki genomik bölgelerde oluşan mekanik baskının DNA hasarına neden olduğu (Kopeika ve ark., 2015) ortaya konulmuştur (Hezavehei ve ark., 2018). Apoptozis spermatozoa DNA'sındaki dondurmaya bağlı hasarla doğrudan ilişkilidir ve fazla miktarda ROS üretimi DNA hasarını artırmaktadır (Johnston ve ark., 2012).

Protamin, DNA metilasyonu ve histon değişimi içeren faktörler, epigenetik bir durum içerisinde yer alarak spermatogenezde önemli rol oynarlar (Ostermier ve ark., 2004; Teperek ve ark., 2016). Ayrıca epigenetik faktörler, kriyoprezervasyon sırasında düzenlenen gen ekspresyonunu etkilerler. Hem mRNA (Mesajcı Ribonükleik Asit) hem de kodlanmamış küçük RNA (Ribonükleik Asit) molekülleri hücre içi yapının önemli elementlerindedir. Bu elementler transkripsiyon ve sonrasındaki spermatogenezin regülasyonunda ve dondurma-çözdürme protokolleri arasındaki reproduktif fizyolojide de önemli rol oynarlar (Valcarce, 2013; Hezavehei ve ark., 2018). Kriyoprezervasyon aynı zamanda mRNA'larda bozulmaya sebep olabilmektedir. mRNA bozulmaları protein fonksiyonlarını bozarak; fertilitiyi olumsuz etkilemektedir (Kashir ve ark., 2011; Wang ve ark., 2014; Hezavehei ve ark., 2018).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kodlanmamış RNA'ların kriyoprezervasyon süresince dondurmaya bağlı hasara yol açtığı (Zhang ve ark., 2017; Dai ve ark., 2019); bunun da apoptozis ve metabolik aktivite değişimiyle bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur. Spermatozodaki RNA, hem spermatozoa hem embriyo fizyolojisi üzerinde dondurmaya bağlı hasar oluşumuna neden olmaktadır (Ortiz-Rodriguez ve ark., 2019).

1.3.4. Kapasitasyon Benzeri Değişim

Kriyoprezervasyonun indüklemesi sonucu spermatozoa membranında oluşan değişimler sonucu çözündürme sonrası çevreye karşı daha reaktif duruma gelen spermatozoa kısmen kapasitasyon geçirmiş durumdadır (Watson, 1995). Dondurulmuş koç spermasıyla yapılan çalışmada taze sperma ile karşılaştırıldığında kapasitasyonun daha hızlı gerçekleştiği belirlenmiştir (Perez ve ark., 1996). Kapasitasyon benzeri değişimler sonucu motilite gibi parametreler etkilenmese de; spermatozoa ömrü, dişi reproduktif kanalıyla olan etkileşim ve spermatozoa fertilitesinde düşüş gözlemlenmektedir (Medeiros ve ark., 2002).

Mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber; boğa spermasında artan hücre içi kalsiyum oranı heparin'in indüklediği in vitro kapasitasyon ile birlikte gerçekleşmektedir (Parish ve ark., 1999). Yeniden yapılandırılmış olan membran yapısı ve lipit-protein bileşimindeki değişimin sonucu olarak kriyoprezervasyon süresince hücre içine kalsiyum akışına sebep olduğu düşünülmektedir. Yükselen kalsiyum seviyesi hücre içi sinyalizasyonu tetikleyerek kapasitasyonu indükleyen mekanizmayı tetiklemektedir.

Kapasitasyon mekanizmasını indükleyen sinyal aktarımlarını tespit etmek amacıyla boğa spermasıyla yapılan çalışmada, spermanın çözündürülmesi sonrası fosfotirozin içeren proteinlerin varolup olmadığına bakılmıştır. Çözündürme sonrası bir dizi tirozin fosforilasyon proteinlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Bailey ve Berube, 1998). Fosforilasyon proteinlerinin görülebilmesi için taze boğa spermasının heparinle 4 saatlik inkübasyonu gerekmektedir (Galantino-Homer ve ark., 1997).

1.4. Boğa Spermasının Dondurulabilirliğini Etkileyen Moleküller

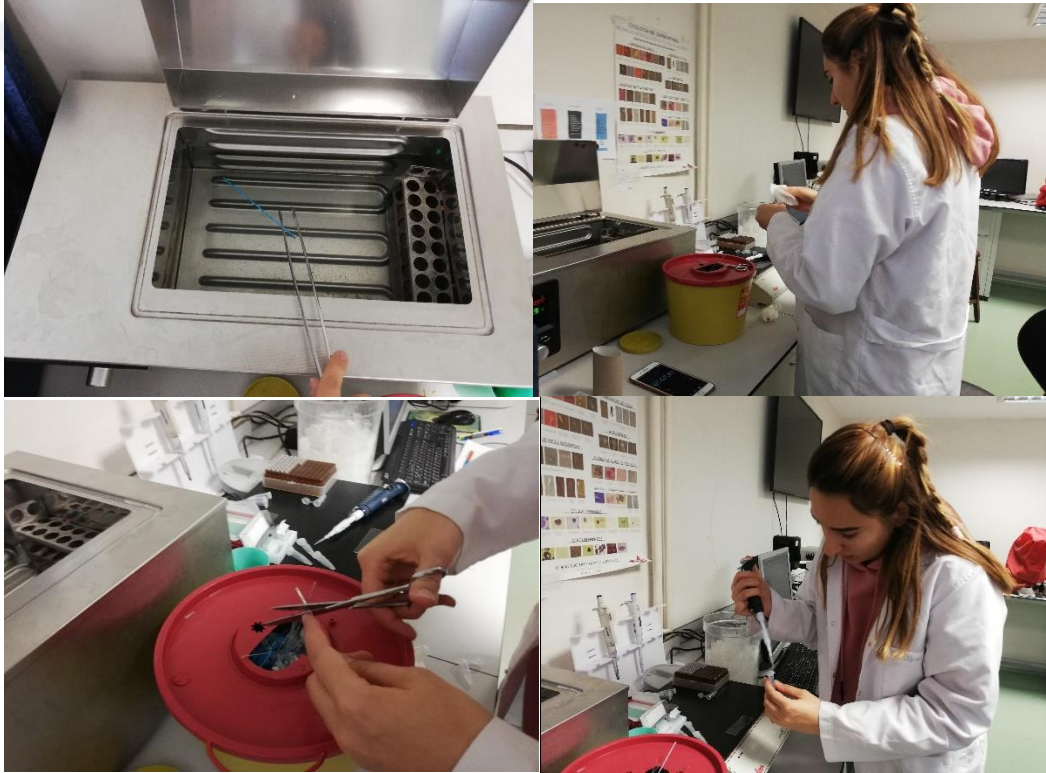
Seminal plazma ve spermatozoonlarda bulunan proteinler, spermatozoa canlılığı, fertilizasyon ve enerji metabolizmasında önemli rol oynamaktadır (Moura ve ark., 2016). Son yıllarda yapılmış olan çalışmalarda seminal plazma ve spermatozoadaki protein kompozisyonları ve varoluş düzeyleri arasındaki farklılığın boğa spermalarının dondurulabilirliğini de etkilediği ortaya konulmuştur. Seminal plazma proteinlerinin bazıları spermatozoa plazma membranında bulunan fosfolipitlere bağlanarak hareketlerini engeller. Isı şoku proteininin (HSP90) spermadaki miktarı, kriyotoleransın yüksek olduğu zamanlarda daha fazladır (Wang ve ark., 2014). Düşük kriyotolerans durumlarında HSP90 düzeyinin boğa spermatozoasındaki miktarı da düşük olmaktadır (Zhang ve ark., 2015). Isı şoku proteini A8 (HSPA8) düşük oranda bulunduğu spermatozoanın çözüm sonu viyabilitesinde düşüş gözlemlenirken; yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu, plazma membrane bütünlüğünü olumlu etkilediği belirlenmiştir (Holt ve ark., 2015).

Kriyoprezervasyon süreci, karbonil grubunun bir bileşikle kimyasal reaksiyona girmesi olarak tanımlanan boğa spermatozoa proteinlerinin karbonilasyonuna sebep olmaktadır. Boğa spermasında kriyoprezervasyon sırasında yüksek oranda karbonilasyona neden olan 11 çeşit protein tanımlanmıştır. Lipokalin tip prostaglandin D sintaz (L-PGDS) dondurulabilirlik üzerine olumsuz etki göstermektedir (Jobim ve ark., 2004). Asidik Seminal Sıvı Proteini (aSFP), spermada yüksek düzeyde bulunduğu dondurulabilirlik de iyi olmaktadır. aSFP, lipid peroksidasyonunu düşürerek; spermatozoa'yı oksidatif stresin zarar verici etkilerinden korumaktadır (Einspanier ve ark., 1994).

1.5. Spermanın Çözdürülmesi

Spermanın çözdürülmesi sırasında oluşan manipülasyon kaynaklı hataların spermatolojik özellikleri olumsuz yönde etkilediği araştırmacılar tarafından ortaya

konulmaktadır. Saha koşullarında suni tohumlama yapacak veteriner hekimlerin donmuş spermayı çözdürürken uygun koşulları göz önünde bulundurarak çözdürme işlemini yapmaları suni tohumlama başarısını artırmaktadır. Çözdürme prosedürü, spermatozoanın hayatta kalması üzerindeki etkisi açısından dondurma prosedürü kadar önemlidir (İleri ve Ak, 1993; Nur ve ark., 2003). Hayvanlar için birçok sperm çözdürme protokolü yüksek ısı seviyeleri (50 °C'nin üzerinde) kullanılarak uygulanmış ve iyi hareketlilik geri kazanım oranları elde edilmiştir (Snoeck, 2003; Barbas ve Mascarenhas, 2009).



Şekil 1.13. Spermanın Çözdürülmesi

Donma-çözdürme yönteminde, ısınma fazı, spermatozoanın hayatta kalmasının yanı sıra soğutma fazı için de önemlidir (Fisher ve ark., 1977; Barbas ve Mascarenhas, 2009). Çözdürme sırasında, donmuş sperma kritik sıcaklığı -15 ila -60 °C arasında geçmektedir. Çözdürme hızı, soğutma hızının, hücre içi donmayı indükleyecek kadar yüksek veya hücre dehidrasyonu üretecek kadar düşük olmasına bağlıdır. İlk durumda, spermatozoada mevcut olan hücre içi buzun yeniden

kristalleşmesini önlemek için hızlı çözülme gereklidir. Hızlı bir şekilde çözdürülen spermatozoada intra ve ekstra hücrel dengenin restorasyonu, daha yavaş çözülmeden daha hızlı gerçekleşmektedir (Fisher ve ark.1977; Barbas ve Mascarenhas, 2009).

Spermanın dondurulması ve çözdürülmesini içeren sıcaklık eğrisinin modifikasyonu kaçınılmaz olarak hareketli spermatozoa oranını azaltır ve ultra yapısal, biyokimyasal ve fonksiyonel hasarlara neden olur (Senger, 1980; Nur ve ark., 2003). Bu nedenle, dondurulmuş spermanın en ideal çözdürme tekniği hakkında çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Güney ve İleri 1991; Correa ve ark., 1996; Nur ve ark., 2003). Yüksek yüzey/hacim oranı nedeniyle, payetler sıcaklık değişikliklerine karşı oldukça hassastır. Spermatozoanın çözüm sonu fertilizasyon kabiliyeti, çözdürme sıcaklığı ve süresi protokollerinden oldukça fazla etkilenmektedir (Senger, 1980; İleri ve Ak, 1993; Nur ve ark., 2003).

35 °C'den yüksek sıcaklıklar spermatozoada daha yüksek hareketliliğe neden olurken, çözdürme süresinin dikkatlice zamanlanması gerektiği belirtilmektedir (Senger, 1980; İleri ve Ak, 1993; Blcakshaw, 1995; Correa ve ark., 1996; Nur ve ark., 2003). Bu özellikle protein denatürasyonunun meydana geldiği sıcaklıklarda önem teşkil etmektedir. Başka bir deyişle, spermanın bu sıcaklıklara aşırı maruz kalması spermatozoanın ölümüyle sonuçlanacaktır (Senger, 1980; Nur ve ark., 2003). 25, 15, 5 ve 0°C gibi düşük sıcaklıklarda spermanın çözdürülmesine göre, 37 °C'deki su banyosunda payetlerin çözdürülmesiyle daha iyi sonuçlar alındığını bildirilmektedir (İleri ve Ak, 1993). Ayrıca, spermanın fizyolojik sıcaklıkta (37 °C'de) çözdürülmesi motilite devamlılığı açısından önemli olduğu belirtilmiştir (Correa ve ark., 1997).

Çözdürme sonrası oluşan soğuk şokunun morfolojik bozuklukları artırdığı ve motiliteyi olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir (Erikson ve Rodriguez Martinez, 2000; Nur, 2001). Deneysel olarak soğuk şokuna uğratılan boğa spermasında spermatolojik özelliklerin zarar gördüğü, bu sebeple spermanın 20 °C'nin altındaki sıcaklıklara maruz bırakılmaması gerektiği belirlenmiştir (Güney ve İleri, 1991). 5 saniye boyunca 70 °C'de çözdürülen boğa spermalarının, 37 °C'de 30 saniye ve 50

°C'de 15 saniyede çözdürülen spermalara kıyasla hasar görmüş akrozom oranının yanı sıra diğer morfolojik kusurlarının da önemli ölçüde daha düşük olduğu görülmüştür (Nur ve ark., 2003).

Spermanın hızlı çözdürülmesi spermatozoa üzerindeki hasarın önlenmesi açısından önemlidir (Vishwanath ve Shannon, 2000). Spermayı hızlı çözdürme, hücre zarlarına zarar verebilecek su moleküllerinin yeniden kristal oluşumu olasılığını önlediğini gözlemlenmiştir (Holt, 2000; Nur ve ark., 2003). Yavaş çözülme prosedürünün temel sorunu ise, daha belirgin ozmotik basınç değişikliklerini ortaya çıkarmasıdır (Curry ve Watson, 1994).

1.6. Spermatozoa Kalitesini Değerlendirme Yöntemleri

Bütünleşmiş farklı metotların kullanımı aracılığıyla spermatozoanın gelişmiş analizi sayesinde, hücre fonksiyonları ile bağlantılı olan hücre morfolojisini hücresel ve moleküler düzeyde değerlendirilebilmektedir. Geliştirilen ve standardize edilen teknikler, spermatozoanın genetik, fonksiyonel ve epigenetik içerikleri bakımından incelenebilmesine olanak sağlamaktadır. Kriyoprezervasyonun sperma açısından etkilerinin belirlenmesi için spermatozoa motilitesi, canlılığı, membran fonksiyonelliği, mitokondriyal aktivite ve apoptozis parametrelerinin güncel tekniklerle ortaya konulması gerekmektedir (Uğur ve ark., 2019).

1.6.1. Mikroskop ile Değerlendirilmesi

Işık mikroskobu temel kalite parametrelerinden olan motilite, morfoloji, membran bütünlüğü ve konsantrasyon gibi parametrelerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir mikroskoptur.

Floresan mikroskobu ise; mikroskopta görülemeyecek kadar küçük olan hücresel komponentlerin görüntülenmesinde kullanılan mikroskoptur. Floresan mikroskop daha çok spermatozoa canlılığını (Garner ve ark., 1997), membran, akrozom ve kromatin yapısını görüntülemek için kullanılmaktadır. Bu mikroskop metodunda, spermatozoonun hücresel komponentlerinin görüntülenebilmesi için floresan boyalarla boyama yapılarak DNA, membran ya da lektinlerin görüntülenmesi yapılabilmektedir (Rodriguez-Martinez ve ark., 1997). Spermatozoa viyabilitesi, Canlı/Ölü ticari kitler, DNA'ya bağlanan floresan boyalar (SYBR-14) ve membran kalıcı boya (PI) kullanılarak floresan mikroskobunda görüntüleme yapılabilmektedir. Akrozom moleküler marker'ı olan *Pisum sativum* aglutinin floresan izotiyosiyanat'a (FITC-PSA) bağlanmasıyla spermatozoonun akrozom bütünlüğü hakkında floresan mikroskop ile görüntüleme sonucu fikir sahibi olunabilmektedir. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (TdT) kullanılarak uygulanan TUNEL yöntemi ile flow sitometri ve floresan mikroskop'u kullanılarak apoptozis değerlendirmesi yapılabilmektedir.

Lazer konfokal floresan mikroskobu üç boyutlu (3D) odaklanma derinliğine sahip optik çözünürlüğü olan hücresel kompartmanlardaki protein dağılımının görüntülenmesini sağlayan bir mikroskoptur. Konfokal mikroskop'un avantajları arasında, her bir hücredeki floresanı görmesiyle çok bantlı esneklik sağlayarak bulanıklığa engel olması bulunmaktadır. Spermatozoon'un akrozom, kromatin ve membran yapısının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Uğur ve ark., 2019). Spermatozoa başında bulunan sitoskeletal proteinlerden olan spektrin, tubulin ve aktin proteinleri (Dvorakova ve ark., 2005; Romarowski ve ark., 2018) ile spermatozoa yüzey proteinleri (Milardi ve ark., 2018) lazer konfokal floresan mikroskop ile görüntülenebilmektedir. Mitokondri fonksiyonelliği tek hücre düzeyinde belirlenebilmektedir (Moscatelli ve ark., 2017). Ayrıca lipid peroksidasyonunun ve spermatozoondaki ROS'un yerini belirlemek için konfokal floresan mikroskop'u kullanılmaktadır (Uğur ve ark., 2019).

Elektron mikroskobu, görüntü elde etmek için elektronların kullanıldığı bir mikroskop yöntemidir. Işık mikroskop'una göre daha yüksek oranda çözünürlük ve

büyütme oranı sağlamaktadır. Işık mikroskopunda görülebilir ışık mekanizmasıyla optik lenslerin 10-1,000 arasında değişen büyütme oranlarıyla görüntüleme yapılmaktadır. Elektron mikroskop'unda ise; nesnelere ya da görüntüler üzerine direkt olarak elektron ışını ve vakumla elektromanyetik lensler sayesinde gerçekleştirilen büyütme oranları ile görüntüleme yapılmaktadır. Bu mikroskop çeşidi, spermatozoonun ultrayapısal ve morfolojik karakterini anlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Sathanantan, 2013). Elektron mikroskopunun en yaygın kullanılan iki çeşidi Transmisyon Elektron Mikroskop'u ile Taramalı Elektron Mikroskop'udur. Geliştirilen bu mikroskoplarda elektromanyetik lenslerin elektron ışınları ile görüntü üzerine odaklanması sonucu görüntü oluşmaktadır. Taramalı elektron mikroskop'u kriyoprezervasyonun spermatozoon üzerindeki olumsuz morfolojik değişimleri ortaya koymaktadır (Özkavukçu ve ark., 2008). Transmisyon elektron mikroskop'u reproduktif çalışmalarda ve spermatozoonun yapısal ve fonksiyonel değerlendirmelerinde kullanılabilir (Moretti ve ark., 2016; Uğur ve ark., 2019).

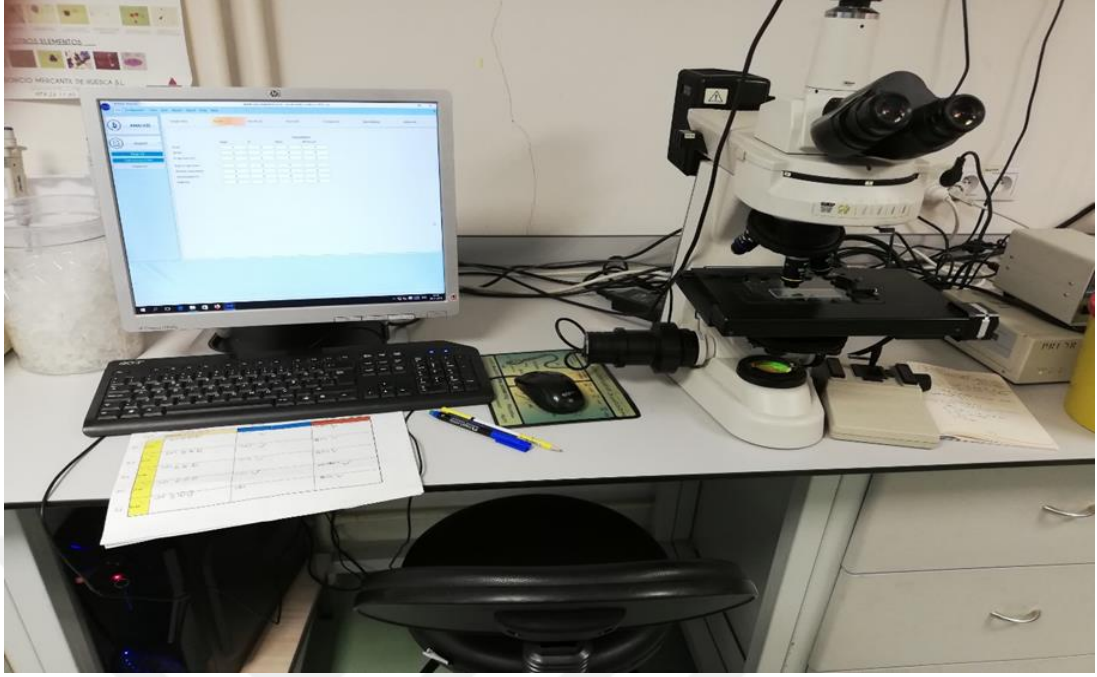
Holografik mikroskop ve Raman spektroskopisi, holografik mikroskop formatına sahip lazer ışığı tarafından görüntüleme yapılan ve mikroskopik numunelerin üç boyutlu yapılarını, yönelimlerini ve pozisyonlarını tanımlayarak görüntü elde edilen mikroskoplardır. Canlı spermatozoonların morfoloji ve motilitesine dair üç boyutlu yüksek çözünürlükte kantitatif görüntülerin elde edilmesini sağlayan mekanizmaya sahiplerdir (Kemper ve Von Balley, 2008; Coppola ve ark., 2014). Holografik mikroskop, boğa spermatozoonunun morfolojik değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir (Merola ve ark., 2013). Raman spektroskopisi, hücresel komponentlerdeki biyokimyasal değişimleri değerlendirmeye yarayabilen bir sistemdir. Raman mikrospektroskopisi, insan ve boğa spermatozoonlarında kimyasal değişimler değerlendirilmesinde ve moleküler özellik analizinde kullanılabilmektedir (Li ve ark., 2014). Raman spektroskopisi, Holografik mikroskop ile birlikte kullanılarak; spermatozoon kalitesini biyokimyasal ve morfolojik özellikleri bakımından değerlendirmeye olanak sağlamaktadır (Ferrara ve ark., 2016; De Angelis ve ark., 2017)

1.6.2. CASA (Bilgisayar Destekli Sperm Analiz Sistemi)

1980'li yılların başından itibaren araştırmacılar spermatozoonun yüzme hızını tespit edebilmek için farklı yöntemler geliştirmeye yönelmişlerdir. Ana fikrin temelinde periyodik olarak hareket eden hızlı cisimlerin zaman ayarlı fotoğraflarının çekilmesi prensibine dayanan stroskopik illüminasyon (Cooper ve Woolley, 1982) ve videomikrografi (Katz ve Overstreet, 1981) teknikleri gösterilebilir. Ancak spermatozoonların izlediği yolun belirlenmesindeki zorluklar, bu teknolojinin yaygın olarak kullanımını uzun yıllar sınırlandırmıştır. Günümüzde kullanılan mevcut bilgisayar teknolojileri ve halen geliştirilmeye devam eden yazılımlar sayesinde yüzen bir spermatozoonun izlediği yol hızlı ve hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Buna ek olarak motil bir spermatozoonun aldığı yörünge ile çeşitli değişkenler de ortaya konmuştur.

Cihazın çalışma prensibi, mikroskopik bir alanda bulunan motil spermatozoonların görüntüsünü alan ve bu görüntüleri farklı edinim oranlarındaki video görüntülerine dönüştüren bir sisteme dayanmaktadır. Subjektif değerlendirme ile kıyaslandığında, CASA cihazı ile aynı anda yarı-otomatik olarak daha fazla spermatozoonun analizi daha kısa sürede yapılabilir (Verstegen ve ark., 2002; Kathiravan ve ark., 2011).

Floresan DNA boyaları ve kuyruk tespit algoritmalarındaki teknolojik ilerlemeler, sperm konsantrasyonu ve ileri hareketli spermatozoaların konsantrasyonunun hesaplanmasını mümkün hale getirmiştir (Zinaman ve ark., 1996; Garrett ve ark., 2003; Şerefoğlu, 2011). Böylece preparatların hazırlanmasında gerekli hassasiyetin gösterilmesi ve uygun cihazların kullanılmasıyla CASA'nın kullanımını genişlemiştir (Şerefoğlu, 2011).

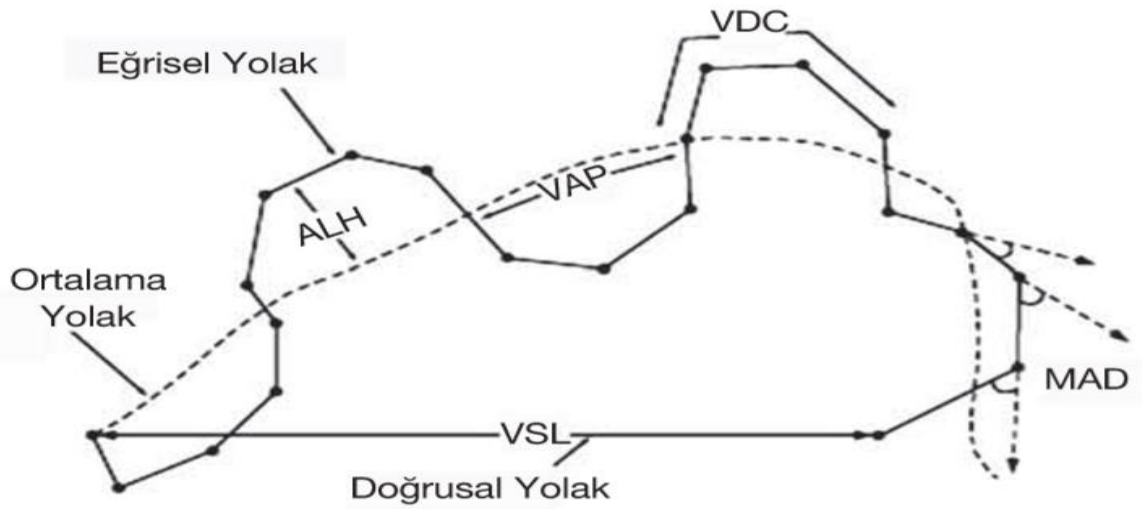


Şekil 1.14. CASA cihazı

CASA ile yapılan analizde kullanılan kinetik parametreler aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

1. VCL: Eğrisel Hız ($\mu\text{m/s}$). Sperm başının ilerlerken katettiği 2-boyutlu gerçek eğrisel yoldaki hızı. Hücre canlılığının bir göstergesidir.
2. VSL: Doğrusal Hız ($\mu\text{m/s}$). Sperm başının tespit edilen ilk noktadan son noktaya gidene kadar olan hızı.
3. VAP: Ortalama yol hızı ($\mu\text{m/s}$). Sperm başının ortalama yolaktaki hızı. Bu yolak eğrisel yolun CASA cihazlarındaki algoritmalara göre düzeltilmesi ile hesaplanır. Bu algoritmalar cihazlar arasında farklılık gösterebileceği için VAP farklı CASA sistemleri arasında mukayese edilebilir bir ölçüt değildir.
4. ALH: Sperm başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklık (μm). Sapma mesafesi maksimum veya ortalama değer halinde verilebilir ve bu değerler de farklı cihazlar arasında farklılık gösterebilir.
5. LIN: Doğrusallık. Eğrisel yolakların doğrusallığı, VSL/ VCL .
6. WOB: kararsızlık. Gerçek yolakta ilerlerken izlenen dalgalanmanın ölçüsü, VAP/VCL .
7. STR: Doğrusallık. Ortalama yolun doğrusallığı, VSL/ VAP .

8. BCF: Çapraz geçiş frekans ritmi (Hz). Eğrisel yolağın ortalama yolaktan geçme frekansı.
9. MAD: Ortalama açısal hareket (derece). Sperm başının anlık dönüşleri sırasında yaptığı açısal değişikliğin ortalaması (Şerefoğlu, 2011).
10. Hiperaktivite (Hyperactivity): Kapasitasyon öncesinde gözlemlenen kuyruk hareketini tanımlamak için kullanılır (Hiperaktivite= VCL x ALHX).



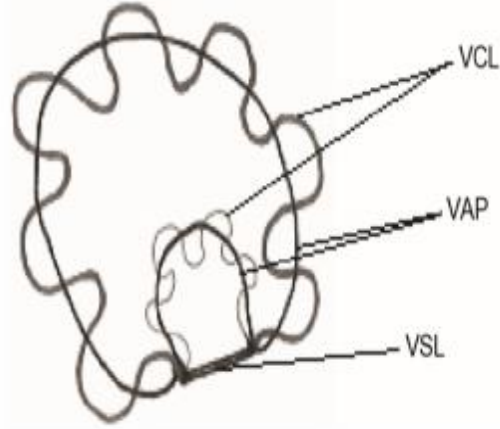
Şekil 1.15. CASA sistemleriyle ölçülen motilite parametreleri için standart terminoloji (Şerefoğlu, 2011).

CASA cihazı ile belirlenen hız değerleri, eğrisel hız (VCL), düz çizgi hızı (VSL) ve ortalama yol hızıdır (VAP). VAP, gözlem süresi boyunca bu yolun uzunluğudur. Yörünge şekli hız değerlerini etkilediğinden, hız değerleri de karşılaştırılır. Üç hızın oranları doğrusallık (LIN), düzlük (STR) ve yalpalamadır (WOB), bu parametreler aşağıdaki gibi türetilir (Mortimer, 1990);

$$LIN = (VSL/VCL) \times 100$$

$$STR = (VSL/VAP) \times 100$$

$$WOB = (VAP/VCL) \times 100$$



Şekil 1.16. Farklı eğrisel hız ve ortalama yol hızı, aynı düz çizgi hızı olan iki yol örneği. VCL: eğrisel hız, VSL: düz çizgi hızı, VAP: ortalama yol hızı

Yanal baş hareketinin (ALH) genliği, spermatozoon başının yanal hareketinin genişliğidir. Kafa yörüngesinin toplam genişliği (fizik ve matematikte kullanılan genlik değeri olan genişliğin yarısı değil) olarak hesaplanır ve mikrometre olarak ifade edilir (David ve ark., 1981). Vuruş çapraz frekansı (BCF), sperm başının hareket yönünü geçme sayısıdır ve bu başka bir flagellar dalganının gelişimi ile ilgilidir (Serres ve ark., 1984).

CASA sistemi spermatozoa morfolometri değerlerinin belirlenmesini sağlayabilirken aynı zamanda; spermatozoa canlılığı, konsantrasyonu, morfoloji ve DNA fragmentasyon derecesinin belirlenmesinde de yaygın olarak kullanılan bir cihazdır (Amann ve Waberski, 2014; Alquezar-Baeta ve ark., 2019).

1.6.3. Flow Sitometri Cihazı

Flow sitometri cihazı, binlerce hücrenin kısa sürede analizini mümkün kılan bir cihazdır. Floresan bölme sayesinde fazlaca sayıdaki spermatozoonlara ek olarak, tek bir spermatozoonun fiziksel karakteristiğinin ortaya konulmasını sağlamaktadır (Uğur ve ark., 2019).

Spermatozoonların moleküler anatomi ve membran fizyolojisiyle hücre viabilitesi ortaya konulmaktadır. Kriyoprezervasyon sürecinde oluşan sıcaklık ve ozmotik stres değişimleri plazma membranında oluşan hasar sebebiyle spermatozoon viabilitesini etkilemektedir (Gürler ve ark., 2015; Uğur ve ark., 2019). Propidium İodid, spermatozoonun hasar görmüş plazma zarına tutunarak nükleik asitlerin üzerine bağlanması ile kırmızı renkli floresan ışık oluşturmaktadır (Gillan ve ark., 2005; Uğur ve ark., 2019). SYBR 14 viabilite probu aktif hücrelerin çekirdeklerinden yeşil floresan ışık yayılmasını sağlayarak viabiliteyi tespit etmektedir (Garner ve ark., 1994; Uğur ve ark., 2019). Farklı boyama teknikleri modifiye edilerek akrozom bütünlüğü ve mitokondriyal fonksiyon değerlendirilebilmektedir (Nagy ve ark., 2004; Uğur ve ark., 2019).

Akrozom bütünlüğü, spermatozoonun zona pellusidanın içine penetrasyonu ile karakterize olan fertilizasyon açısından önemli parametrelerden birisidir. Akrozom bütünlüğü akrozomal matriksin boyanmasıyla flow sitometri cihazında belirlenebilmektedir. Hasar görmüş akrozom yeşil ışık yayarken; sağlam akrozomda herhangi bir ışık yayılımı gerçekleşmemektedir (Nagy ve ark., 2004). Florokrom floresan isotiosinat (FITC) / Propidium iodid (PI) boyama, viabilite, akrozom bütünlüğüyle birlikte canlı/ölü ve sağlam/hasar görmüş spermatozoonların belirlenerek sperma kalitesinin ortaya konulmasını sağlamaktadır (Alvarez ve ark., 2012; Robles ve ark., 2013; Uğur ve ark., 2019).

Düşük fertilite oranına sahip boğa sperması ile yüksek fertilite oranına sahip boğa spermasının in vitro fertilizasyon oranları birbirine yakın olarak belirlenmiştir. Ancak embriyoların aynı hızda gelişmediği görülmüştür. Bunun sebebinin düşük fertilite oranına sahip spermada bulunan spermatozoonların yüksek oranda embriyo gelişimini etkileyen genetik anormallikler içerdiği tespit edilmiştir (Eid ve ark., 1994). Sperm kromatin yapısının değerlendirilmesi (SCSA) akrinin oranj boya ile flow sitometri cihazında tespit edilebilmektedir (Graham, 2001). Boğa, fare ve insan spermalarında düşük fertilite oranına sahip olanlarla yüksek fertilite oranına sahip olanlar karşılaştırıldığında; düşük fertilizasyon oranına sahip olanların daha fazla

oranda kromatin denatürasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir (Evenson ve ark., 1980).

Flow sitometri cihazı cinsiyet belirlemede de kullanılan bir cihazdır. X kromozomu Y kromozomuna nispeten daha fazla DNA içerdiğinden flow sitometri cihazı kullanılarak her bir spermatozoonun cinsiyet tayini yapılabilmektedir (Johnson ve ark., 1999).

1.6.4. Oksidatif Stres Analizi

Oksidatif stres spermatozoonun fertilizasyon kabiliyetini olumsuz etkilemektedir. Bu durum hidroksil radikalleri, süperoksit anyonu ve radikal olmayan hidrojen peroksit gibi ROS üretimi ile oluşmaktadır. Kriyoprezervasyon ve çözündürme sürecinde spermatozoonlar soğuk şokuna maruz kalarak; ROS ve lipid peroksidasyonu oluşmaktadır (Nair ve ark., 2006; Bucak ve ark., 2008).

ROS ve oksidatif stres diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında en etkin flow sitometri cihazında değerlendirilmektedir. 2', 7'-diklorithidrofloresan diasetat (H2DCFDA), hücre içi hidrojen peroksit (H₂O₂) indikatörü olarak kullanılmaktadır. Oksidasyon olduğu takdirde yeşil floresan ışık yayılımı görülmektedir (Guthrie ve ark., 2006). Dihidroetidyum, süperoksit üretimini belirleyen ROS indikatör probudur (Wardman, 2007; Uğur ve ark., 2019). Süperoksitlerin varlığı kırmızı floresan ışık yansımaları olarak gözükmemektedir (Zielonka ve ark., 2008).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Boğa Spermalarının Seçimi

Saha şartlarında tohumlamada en çok kullanılan boğa ırklarından olan Simental, Holstein ve Brown Swiss ırkı boğalara ait donmuş spermalarla çalışılmıştır. Simental, Holstein ve Brown Swiss ırkı ticari boğa spermalarının tek bir doluma ait 3'er adet sperması kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan donmuş sperma payetleri, her bir ırktan bir boğanın aynı dolum zamanı olan payetleri arasından seçilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Boğa Spermalarının Seçimi

2.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Simental, Holstein, Brown Swiss olarak belirlenen boğa ırklarının dondurulmuş spermaları çözüm süresi ve sıcaklığına göre gruplara ayrılmıştır. Her bir ırka ait

payetler gruplardaki sıcaklık ve sürelerde çözdürülerek çözüm sonu parametreler değerlendirilmiştir. Belirlenen çalışma grupları Çizelge 2.1’de sunulmuştur.

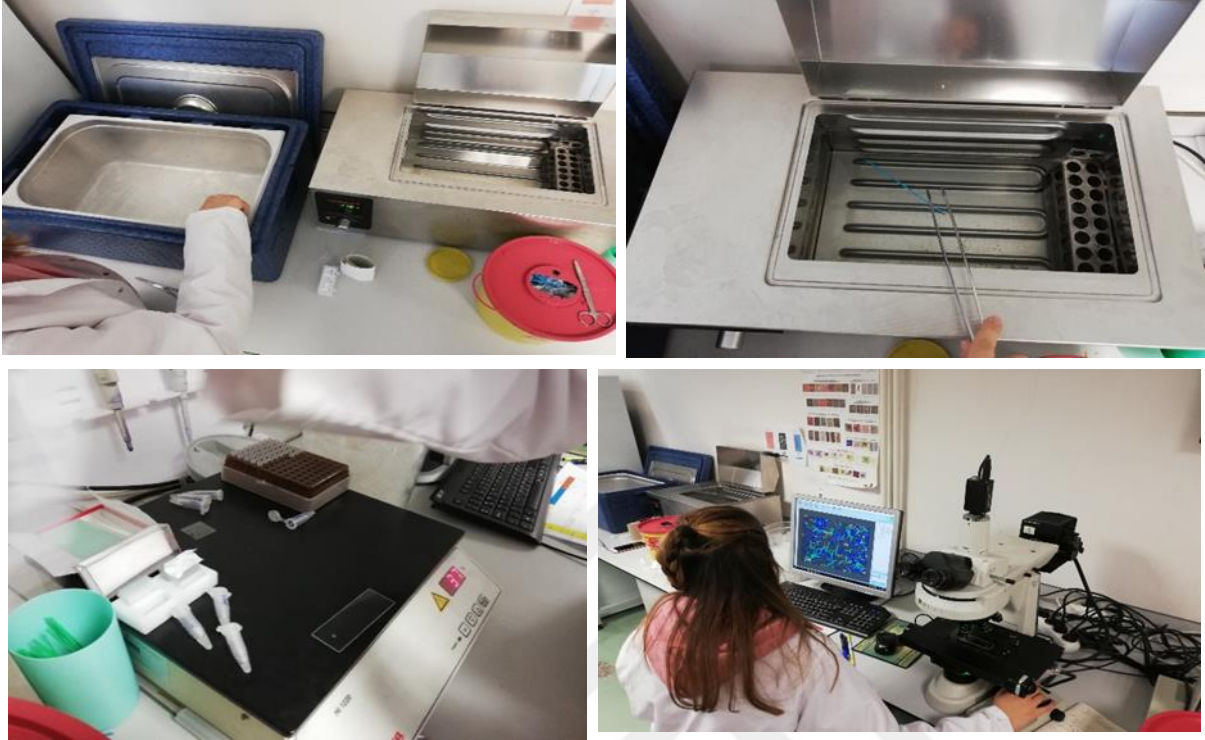
Çizelge 2.1. Çalışmada Belirlenen Gruplar

Gruplar	Çözdürme sıcaklık ve süreleri
Kontrol Grubu	37 °C’de 20 saniye (sn)
Grup 1	25 °C’de 30 sn
Grup 2	25 °C’de 40 sn
Grup 3	25 °C’de 50 sn
Grup 4	25 °C’de 60 sn
Grup 5	37 °C’de 30 sn
Grup 6	37 °C’de 40 sn
Grup 7	37 °C’de 50 sn
Grup 8	37 °C’de 60 sn
Grup 9	40 °C’de 10 sn
Grup 10	40 °C’de 15 sn
Grup 11	40 °C’de 20 sn
Grup 12	40 °C’de 25 sn
Grup 13	70 °C’de 3 sn
Grup 14	70 °C’de 6 sn
Grup 15	70 °C’de 9 sn
Grup 16	70 °C’de 12 sn

2.3. Çözüm Sonu Motilitenin Analizi

Dondurulmuş spermaların çözüm sonu motilitelerinin ve hareket özelliklerinin saptanması için CASA (Sperm Class Analyzer, S.C.A. v 3.2.0, Microptic S.L., Barcelona, Spain) cihazı kullanılmıştır. Her bir örnekten 5 µl alınarak lam üzerine damlatılmış ve üzeri lamel ile kapatılarak sisteme bağlı faz kontrast mikroskopta X100’lük büyütmede 60 framelik kamera eşliğinde her bir örnek için 7 farklı alan taranarak görüntüler analiz edilmiştir. Analizde sırasıyla; motilite (%), progresivite, eğrisel hız (VCL, µm/s), doğrusal hız (VSL, µm/s), ortalama yol hızı (VAP, µm/s), çizgisellik (LIN= VSL/VCL), doğrusallık (STR= VSL/VAP), çapraz geçiş frekans ritmi (BCF, Hz), dalgalanma (WOB= VAP/VCL), sperm başının ortalama yoldan

laterale sapma uzaklığı (ALH, μm), hiperaktivite parametreleri kaydedilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Çözüm Sonu Motilitenin CASA Cihazı ile Değerlendirilmesi

CASA ile yapılan analizde kullanılan kinetik parametreler aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

1. VCL (Curvilinear Velocity): Eğrisel hız ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoonun iki boyutlu ortamda eğrisel yolda sahip olduğu hız.

2. VSL (Velocity straight line): Doğrusal hız ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoonun hareketine başladığı ilk nokta ile hareketini tamamladığı son nokta arasındaki hızı.

3. VAP (Velocity average path): ortalama yörünge hızı ($\mu\text{m/s}$). Spermatozoonun yörünge üzerinde ki ortalama hızıdır. Bu yol eğrisel yolun CASA sistemindeki algoritmalarla göre düzeltilmesi ile hesaplanır.

4. STR (Straightness): Doğrusallık (μm) ($\text{STR} = (\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$). Spermatozoonun yörüngesi üzerindeki ortalama doğrusal yol.

5. LIN (Linearity): Lineerlik/Çizgisellik (%) ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$). Spermatozoonun 2-boyutlu alanda gösterdiği lineer çizginin 3-boyutlu ortam algoritması ile hesaplanmasıdır. Dairesel hareketi yüksek olan spermatozoanın

linearitesi de düşüktür. Yüksek lineariteye sahip spermatozoon ise düşük ALH'ye sahiptir (Mortimer, 1997).

6. ALH (Lateral Head Displacement): Spermatozoon başının ortalama yoldan laterale sapma uzaklığı (μm). Spermatozoon kuyruğunu yaklaşık baştan sapma mesafesinin göstergesidir. Baş ve sentriol halkası arasındaki yüzme açısını tanımlamak için kullanılır.

7. BCF (Beat Cross Frequency): Spermatozoon kuyruğunun ritim frekansını tanımlamak için kullanılır.

8. WOB (Wobble): Dalgalanma. $WOB = (VAP/VCL) \times 100$ Spermatozoon yörüngesi üzerinde ilerlerken yaptığı dalgalanma hareketinin ölçüsüdür. Eğrisel gerçekleşen hızın progresivite oranının ölçüsüdür.

9. Hiperaktivite (Hyperactivity): Kapasitasyon öncesinde gözlemlenen kuyruk hareketini tanımlamak için kullanılır ($Hiperaktivite = VCL \times ALHX$).

2.4. Anormal Spermatozoon Oranının Belirlenmesi

Donmuş spermaların çözüm sonu anormal spermatozoon oranlarının belirlenmesi için sperma morfoloji kiti (Sperm Blue®, Microptics®, Spain) kullanılmıştır. İnceleme CASA ile sisteme bağlı faz-kontrast mikroskop ve kamera yardımıyla x600'lük büyütmede yapılmıştır. Çözdürülen payetlerden froti yöntemiyle hazırlanan sürme preparatlar boyama tepsisine yerleştirilerek fikzasyon solüsyonu ile 10 dakikada fikze edildikten sonra 15 dakika boyama işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda boya uzaklaştırılarak preparatın üzeri lamel ile kapatılmıştır ve preparatlar değerlendirilmiştir. Çözüm sonu anormal normal oranının yanı sıra; farklı çözdürme sıcaklıklarının spermatozoon başı ve orta kısmı üzerindeki ortalama değişim de değerlendirilmiştir. Baş ve orta parçanın boyutları manuel olarak seçilerek, yazılım sistemi tarafından aynı anda ölçülmüştür ve μm birimi olarak kaydedilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. CASA Cihazında Morfoloji Değerlendirmesi

2.5. Ölü Canlı Spermatozoon Oranının Belirlenmesi

Gruplara ait dondurulmuş payetlerin çözüm sonu ölü-canlı oranları belirlenirken ikili floresan boyama yöntemi (Duo Vital, Microptics, Spain) kullanılmıştır ve değerlendirme Bilgisayar Destekli Sperma Analiz Cihazı (CASA), Sperm Class Analyzer (SCA v.4.2)'na entegre olan floresan mikroskopta yapılmıştır. Bu amaçla 5 μ l çözdürülmüş sperma lam üzerine konulduktan sonra sperma damlasının üzerine 1 μ l yeşil floresan boya ve 1 μ l kırmızı boya damlatılarak pipete edilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İkili floresan boyamanın uygulaması

Hazırlanan preparat üzerine 22x22'lik lamel kapatılarak CASA sistemine entegre floresan mikroskopta x200'lük büyütmede en az 200 spermatozoon olmak üzere değerlendirilmiştir. Kırmızı boya alan spermatozoonlar ölü, yeşil boya alanlar canlı olarak kaydedilerek; inceleme sonunda ölü spermatozoon oranı % olarak belirlenmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Boyama sonrası ölü canlı oranının CASA cihazında değerlendirilmesi

2.6. İstatiksel Değerlendirme

Verilere ilişkin tanımlayıcı istatistikler ANOVA ile hesaplanarak “Aritmetik Ortalama \pm Standart Hata” şeklinde gösterilmiştir. Her bir değişken için grup etkisi mixed modeller yardımıyla incelenerek; oluşturulan modelde, sperma ölçümlerinin tekrarları rastgele (random) etki; derece, süre temel etkileri sabit (fixed) etki olarak dahil edilmiştir. Etkileşim teriminin anlamlı bulunduğu durumlar için Bonferroni düzeltmeli basit etkiler (simple effects) analizi uygulanmıştır. Tüm istatistiksel analizler için $p < 0,05$ kriterinden yararlanılmıştır. Analizler Stata 12/MP4 (Lisans No: 50120500264) istatistik paket programı aracılığı ile gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Çözüm Sonrası Spermatojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Spermatozoa motilitesi ve kinetik parametreleri (spermatozoa motilitesi %, progresif motilite %, VCL $\mu\text{m/s}$, VSL $\mu\text{m/s}$, VAP $\mu\text{m/s}$, % LIN, % STR, ALH, BCF, % WOB, % hiperaktivite) olarak kaydedilmiştir. Ölü-Canlı spermatozoa oranı (%), Anormal Normal spermatozoa oranı (%) değerlendirilmesi için sperma tankı içerisinde örnekler randomize olarak seçilmiştir. Kontrol grubu 37 °C'de 20 sn olup; gruplar 25 °C ve 37 °C'de 30, 40, 50, 60 sn; 40 °C'de 10, 15, 20, 25 sn; 70 °C'de 3, 6, 9 ve 12 sn'lerde spermalar çözdürülerek parametreler değerlendirilmiştir. Üç ırk boğadan 9 tekrarda gruplar çalışılarak, toplamda 153 payet çözdürülmüştür.

3.1.1. CASA Motilite ve Progresivite Değerleri

Farklı sıcaklık ve sürelerde çözdürülen boğa spermalarının motilite ve progresif spermatozoa yüzdeleri sonuçları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Her bir grup için 9 tekrarda çözdürülen boğa spermalarından 37 °C'de 60 saniyede çözdürülenlerde diğer sıcaklık ve sürelerde çözdürülen spermalara göre $80,61 \pm 3,89$ değeri ile daha iyi motilite verileri alınmasına rağmen gruplar arası farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Bu sıcaklık ve süredeki motilite değerine yakın olarak 70 °C 3 saniye'de $80,52 \pm 6,42$ değeri bulunmuştur.

Progresif motilite değeri en yüksek 37 °C 40 saniye'de $18,35 \pm 3,26$ olarak belirlenmiştir. Progresif motilite için istatistiki açıdan gruplar arasındaki farklar anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$). Non-progresif motilite açısından bakıldığında 70°C 6 saniyede $52,18 \pm 6,63$ değeri ile en düşük değer alınmıştır. Bu verilere dayanarak; standart olarak kabul edilen ve kontrol grubu olan 37 °C'de 20 saniye'ye göre daha yüksek motilite değeri elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. Farklı sıcaklık ve sürelerde çözdürülen spermaların kontrol grubu ile CASA'ya ait motilite parametreleri

Grup (n=9)	Arit. Ort. ± Std. Hata		
	Motilite (%)	Non-progresif motilite (%)	Progresif motile (%)
Kontrol (37°C 20 sn)	71,01 ± 5,58	58,07 ± 3,11	12,93 ± 2,82
37°C 30 sn	67,20 ± 3,20	55,24 ± 3,08	11,96 ± 1,63
37°C 40 sn	77,52 ± 3,75	61,77 ± 2,06	18,35 ± 3,26
37°C 50 sn	75,82 ± 5,04	58,46 ± 2,91	17,35 ± 2,6
37°C 60 sn	80,61 ± 3,89	64,53 ± 1,61	14,16 ± 2,94
25°C 30 sn	69,48 ± 3,87	60,66 ± 3,13	8,83 ± 1,63
25°C 40 sn	68,25 ± 2,26	59,14 ± 1,43	9,24 ± 1,37
25°C 50 sn	67,47 ± 3,06	59,62 ± 2,71	7,86 ± 1,44
25°C 60 sn	65,18 ± 2,77	56,91 ± 2,26	8,27 ± 1,83
40°C 10 sn	70,08 ± 4,92	54,70 ± 3,12	15,38 ± 2,32
40°C 15 sn	77,72 ± 4,02	61,77 ± 2,60	15,95 ± 3,20
40°C 20 sn	71,62 ± 4,27	57,15 ± 2,16	14,47 ± 2,43
40°C 25 sn	71,64 ± 4,95	57,51 ± 2,03	14,13 ± 3,54
70°C 3 sn	80,52 ± 6,42	62,32 ± 2,30	18,21 ± 5,59
70°C 6 sn	66,34 ± 9,67	52,18 ± 6,63	14,16 ± 3,60
70°C 9 sn	79,08 ± 4,84	64,44 ± 3,03	14,64 ± 2,63
70°C 12 sn	-	-	-

Motilite: P= 0,321; Non-Progressive Motilite: P= 0,238; Progresif Motilite: P= 0,098

3.1.2. CASA Kinetik Parametreler

Çözüm sonu spermatozoa kinetik değerleri Çizelge 3.2'de "Kinetik parametre ortalamalarının gruplara göre dağılımları" olarak özetlenmiştir. Veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P>0,05$). En yüksek VCL değeri 70 °C'de 6 saniyede çözdürülen spermalarda $164,47 \pm 4,88$ belirlenmiştir. VAP değeri en yüksek 70 °C'de 3 saniyede $114,76 \pm 4,14$ değeri ile yine aynı sıcaklık ve sürede VSL değeri $70,76 \pm 3,17$ olduğu görülmüştür. STR değeri 25 °C 50 saniye'de çözdürülen spermalarda $54,9 \pm 1,62$ değeri ile en yüksek değerde belirlenmiştir. LIN ve WOB değeri sırasıyla, $42,06 \pm 2,91$ ve $73,03 \pm 1,17$ değerleri ile 37 °C'de 50 saniyede en yüksek düzeyde saptanmıştır. Çalışmada elde edilen en düşük ALH değeri $4,64 \pm 0,59$ olarak 25 °C'de 50 saniyede; BCF değeri ise $5,58 \pm$

0,48 ile 25 °C’de 30 saniyede belirlenmiştir. Hiperaktivite’de 40 °C’de 15 saniyede $2,75 \pm 0,31$ değeri ile en yüksek değer saptanmıştır.

Çizelge 3.2. Kinetik parametre ortalamalarının gruplara göre dağılımları

Grup (n=9)	Arit. Ort. \pm Std. Hata			
	VCL	VAP	VSL	STR
Kontrol (37°C 20 sn)	144,54 \pm 10,58	95,18 \pm 7,11	58,29 \pm 4,04	50,1 \pm 2,43
37°C 30 sn	146,2 \pm 9,73	97,55 \pm 6,19	59,38 \pm 4,22	54,29 \pm 2,25
37°C 40 sn	156,96 \pm 5,54	105,01 \pm 4,48	63,73 \pm 1,85	49,9 \pm 2,88
37°C 50 sn	150,64 \pm 11,42	104,96 \pm 7,52	65,02 \pm 4,26	54,14 \pm 2,65
37°C 60 sn	158,95 \pm 5,23	109,5 \pm 4,67	68,91 \pm 4,62	51,01 \pm 2,98
25°C 30 sn	145,17 \pm 4,43	98,25 \pm 4,73	62,1 \pm 2,62	52,67 \pm 1,44
25°C 40 sn	139,96 \pm 8,7	94,26 \pm 7,11	58,37 \pm 5	53,26 \pm 1,75
25°C 50 sn	118,95 \pm 14,33	84,49 \pm 10,07	53,18 \pm 6,18	54,9 \pm 1,62
25°C 60 sn	132,24 \pm 14,29	86,67 \pm 9,38	53,07 \pm 5,72	54,52 \pm 0,92
40°C 10 sn	155,25 \pm 4,65	102,44 \pm 4,21	63,58 \pm 2,56	50,84 \pm 2,13
40°C 15 sn	152,04 \pm 12,01	102,91 \pm 7,49	62,2 \pm 3,67	51,93 \pm 3,46
40°C 20 sn	154,42 \pm 4,48	101,52 \pm 5,59	61,82 \pm 3,36	47,28 \pm 1,9
40°C 25 sn	146,4 \pm 12,54	98,72 \pm 8,47	58,29 \pm 4,81	50,99 \pm 1,56
70°C 3 sn	162,73 \pm 6,69	114,76 \pm 4,14	70,76 \pm 3,17	48,26 \pm 2,02
70°C 6 sn	164,47 \pm 4,88	107,55 \pm 4,83	63,67 \pm 3,04	49,66 \pm 3,26
70°C 9 sn	142 \pm 15,94	94,49 \pm 9,96	56,36 \pm 5,48	53,02 \pm 3,84
70°C 12 sn	-	-	-	-

VCL: P=0,150; VSL: P=0,221; VAP: P=0,240; STR: P=0,537

Çizelge 3.3. Kinetik parametre ortalamalarının gruplara göre dağılımları

Grup (n=9)	Arit. Ort. \pm Std. Hata				Hiperaktivite (%)
	LIN	WOB	ALH	BCF	
Kontrol (37°C 20 sn)	37,53 \pm 2,57	69,99 \pm 1,25	5,61 \pm 0,44	7,51 \pm 0,44	2,45 \pm 0,23
37°C 30 sn	41,11 \pm 2,14	70,68 \pm 1,6	5,67 \pm 0,4	7,63 \pm 0,8	2,43 \pm 0,19
37°C 40 sn	36,85 \pm 2,94	69,36 \pm 1,65	5,97 \pm 0,27	7,77 \pm 0,68	2,66 \pm 0,27
37°C 50 sn	42,06 \pm 2,91	73,03 \pm 1,17	5,62 \pm 0,47	8,04 \pm 1,16	2,5 \pm 0,26
37°C 60 sn	38,77 \pm 3,04	71,83 \pm 1,53	6,03 \pm 0,21	7,25 \pm 0,59	2,64 \pm 0,29
25°C 30 sn	39,8 \pm 1,25	71,74 \pm 0,69	5,7 \pm 0,22	5,58 \pm 0,48	2,23 \pm 0,17
25°C 40 sn	39,27 \pm 1,64	70,35 \pm 0,96	5,42 \pm 0,37	6,27 \pm 0,72	2,16 \pm 0,09
25°C 50 sn	41,91 \pm 2,15	72,86 \pm 1,81	4,64 \pm 0,59	5,65 \pm 0,54	1,97 \pm 0,18
25°C 60 sn	41,91 \pm 2,09	70,36 \pm 1,61	5,28 \pm 0,61	6,47 \pm 1,13	2,07 \pm 0,12
40°C 10 sn	39,85 \pm 2,96	69,3 \pm 1,13	6 \pm 0,15	8,04 \pm 0,93	2,59 \pm 0,19
40°C 15 sn	39,35 \pm 3,6	71,27 \pm 1,82	5,72 \pm 0,51	8,04 \pm 0,9	2,75 \pm 0,31

Çizelge 3.3. Devamı Kinetik parametre ortalamalarının gruplara göre dağılımları

40°C 20 sn	34,06 ± 1,59	67,73 ± 0,83	6,02 ± 0,11	6,96 ± 0,76	2,66 ± 0,22
40°C 25 sn	37,48 ± 1,52	69,94 ± 1,15	5,66 ± 0,49	7,32 ± 0,73	2,66 ± 0,22
70°C 3 sn	34,4 ± 1,53	68,45 ± 0,35	5,69 ± 0,32	7,66 ± 0,68	2,62 ± 0,43
70°C 6 sn	36,85 ± 3,62	69,14 ± 1,85	6,38 ± 0,23	6,52 ± 1	2,59 ± 0,27
70°C 9 sn	40,58 ± 4,3	72,08 ± 2,23	5,46 ± 0,63	7,77 ± 0,45	2,33 ± 0,31
70°C 12 sn	-	-	-	-	-

LİN: P=0,584; WOB: P=0,340; ALH: P=0,496; BCF: P=0,384; Hiperaktivite: P=0,412

3.1.3. CASA Canlı/Ölü Spermatozoa Oranı

Canlı/Ölü Spermatozoa oranlarının CASA cihazına ait sonuçları Çizelge 3.3'te verilmiştir. CASA cihazında analizi yapılan spermatozoa canlılık oranına göre deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P>0,05$). 70 °C'de 3 saniyede çözdürülen spermalarda ortalama değer $81,5 \pm 6,06$ olarak belirlenmiştir. 70 °C'nin diğer çözdürme süresi olan 12 saniyede canlı spermatozoa olmadığı görülmüştür. 70 °C'de 3 saniye çözdürülen spermaların CASA parametrelerine bakıldığında canlı/ölü oranı yüksek olarak belirlenirken; aynı zamanda motilite değerlerinde de yüksek oranlar elde edilmiştir.

Çizelge 3.4. CASA cihazında belirlenen Canlı/Ölü spermatozoa oranı

Grup (n=9)	Arit. Ort. ± Std. Hata
	Canlı/Ölü %
Kontrol (37°C 20 sn)	72,22 ± 5,47
37°C 30 sn	69,89 ± 3,21
37°C 40 sn	79,67 ± 3,4
37°C 50 sn	77,78 ± 4,86
37°C 60 sn	82,33 ± 3,8
25°C 30 sn	71,33 ± 3,89
25°C 40 sn	70,22 ± 2,31
25°C 50 sn	69,11 ± 3,09
25°C 60 sn	67 ± 2,88
40°C 10 sn	71,78 ± 4,97
40°C 15 sn	79 ± 3,93
40°C 20 sn	73,33 ± 4,33
40°C 25 sn	73,11 ± 4,86
70°C 3 sn	81,5 ± 6,06

Çizelge 3.4. Devamı CASA cihazında belirlenen Canlı/Ölü spermatozoa oranı

70°C 6 sn	67,44 ± 9,7
70°C 9 sn	80,83 ± 4,81
70°C 12 sn	0

Canlı/Ölü : P= 0,321

3.1.4. CASA Anormal Normal Spermatozoa Oranı

Anormal ve normal spermatozoa oranının CASA cihazı ile değerlendirme sonuçları Çizelge 3.4’te sunulmuştur. Anormal ve normal spermatozoa oranı yönüyle istatistiksel olarak önemli farklılıklar saptandı (P<0,05). Kontrol grubu olan 37 °C’de 20 saniye’de morfolojik olarak normal spermatozoa oranı ortalaması 75,67 ± 3,58 olarak belirlenmiştir. Deneysel gruplar arasında ise, 37 °C’de 30 saniye’de 65,33 ± 2,35 bulgusu ile en yüksek oranda normal spermatozoa değeri elde edilmiştir. Anormal spermatozoa oranı 78,89 ± 2,02 ile 70 °C’de 12 saniyede belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. Çözüm sonu CASA morfoloji değerleri

Grup (n=9)	Arit. Ort. ± Std. Hata	
	Normal (%)	Anormal (%)
Kontrol (37°C 20 sn)	75,67 ± 3,58 ^a	24,33 ± 3,58 ^g
37°C 30 sn	65,33 ± 2,35 ^{ab}	34,67 ± 2,35 ^{fg}
37°C 40 sn	64,44 ± 1,98 ^{ab}	35,56 ± 1,98 ^{fg}
37°C 50 sn	61,44 ± 2,86 ^{abc}	38,56 ± 2,86 ^{efg}
37°C 60 sn	53,44 ± 3,83 ^{bcd}	46,56 ± 3,83 ^{cdef}
25°C 30 sn	54,56 ± 2,82 ^{bode}	45,44 ± 2,82 ^{def}
25°C 40 sn	55,56 ± 4,96 ^{bcd}	44,44 ± 4,96 ^{ef}
25°C 50 sn	35,11 ± 7,46 ^{efgh}	64,89 ± 7,46 ^{abcd}
25°C 60 sn	56,89 ± 2,55 ^{abcd}	43,11 ± 2,55 ^{efg}
40°C 10 sn	57,22 ± 2,66 ^{abcd}	42,78 ± 2,66 ^{efg}
40°C 15 sn	65 ± 3 ^{ab}	35 ± 3 ^{fg}
40°C 20 sn	49,11 ± 5,19 ^{bcd}	49,78 ± 5,58 ^{bcd}
40°C 25 sn	43,11 ± 2,19 ^{cd}	56,89 ± 2,19 ^{bde}
70°C 3 sn	30,89 ± 5,66 ^{gh}	69,11 ± 5,66 ^{ab}
70°C 6 sn	41,67 ± 5,52 ^{defg}	58,33 ± 5,52 ^{bde}
70°C 9 sn	33,78 ± 3,64 ^{fgh}	66,22 ± 3,64 ^{abc}
70°C 12 sn	21,11 ± 2,02 ^h	78,89 ± 2,02 ^a

Normal spermatozoa: P<0,001; Anormal spermatozoa: P<0,001

Aynı sütün ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,005).

Çizelge 3.6. Çözüm sonu CASA morfoloji değerlerine göre anormal kısım dağılımları

Grup (n=9)	Arit. Ort. ± Std. Hata		
	Baş anormalliği(%)	Orta kısım anormalliği(%)	Kuyruk anormalliği(%)
Kontrol (37°C 20 sn)	20,78 ± 3,98 ^f	0,67 ± 0,67 ^d	4,11 ± 1,05 ^b
37°C 30 sn	23,89 ± 3,31 ^{ef}	2,56 ± 1,06 ^{cd}	9,11 ± 2,88 ^{ab}
37°C 40 sn	28,44 ± 2,5 ^{def}	3,22 ± 1,66 ^{bcd}	6,44 ± 1,71 ^b
37°C 50 sn	27,33 ± 3,6 ^{def}	5,11 ± 2,21 ^{abcd}	6,67 ± 2,2 ^{ab}
37°C 60 sn	40,11 ± 3,8 ^{abcde}	2,78 ± 1,21 ^{cd}	11,33 ± 3,2 ^{ab}
25°C 30 sn	31,44 ± 3,27 ^{def}	5,78 ± 1,64 ^{abcd}	14 ± 4,96 ^{ab}
25°C 40 sn	38,89 ± 4,06 ^{abcdef}	2,78 ± 1,21 ^{cd}	5 ± 2,04 ^b
25°C 50 sn	39,67 ± 3,82 ^{abcde}	15 ± 2,2 ^a	29,44 ± 8,8 ^a
25°C 60 sn	32 ± 2,41 ^{bcdef}	3 ± 0,78 ^{cd}	15,78 ± 5,16 ^{ab}
40°C 10 sn	33,11 ± 2,96 ^{bcdef}	3 ± 1,36 ^{cd}	11,33 ± 2,38 ^{ab}
40°C 15 sn	26,67 ± 3,54 ^{def}	3,89 ± 1,11 ^{bcd}	11,78 ± 2,86 ^{ab}
40°C 20 sn	37,33 ± 4,46 ^{abcdef}	11,89 ± 4,35 ^{abc}	13,33 ± 6,4 ^{ab}
40°C 25 sn	42 ± 3,74 ^{abcde}	10,56 ± 2,94 ^{abcd}	12,33 ± 2,57 ^{ab}
70°C 3 sn	49,33 ± 3,34 ^{abc}	13,78 ± 3,09 ^{ab}	17,11 ± 8,23 ^{ab}
70°C 6 sn	43,56 ± 5,82 ^{abcd}	12 ± 2,41 ^{abc}	8,56 ± 2,44 ^{ab}
70°C 9 sn	52,78 ± 1,8 ^a	9,44 ± 2,42 ^{abcd}	15,44 ± 3,77 ^{ab}
70°C 12 sn	50,11 ± 3,77 ^{ab}	10,67 ± 2,24 ^{abcd}	24,56 ± 7,12 ^{ab}

Anormal spermatozoa: P<0,001

Aynı sütün ve satırlar arasında farklı harfleri taşıyan ortalama değerler arası fark istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,005).

3.1.5. Spermatozoa Başının ve Orta Kısımının Değerlendirilmesi

Sıcaklığın ve sürenin spermatozoanın baş çapında ya da şeklinde bir değişiklik oluşturup oluşturmadığı yönünde veriler değerlendirildiğinde istatistik olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir (P>0,05). Sıcaklık ve süreler göre spermatozoon başına ve orta kısmına ait veriler Çizelge 3.7. ve Çizelge 3.8.'de gösterilmiştir. Baş uzunluğunun en fazla 70°C 12 sn'de 6,30 ± 0,09 µm olduğu belirlenmiştir. Genişlik değerinin de 2,96 ± 0,06 µm aynı süre ve sıcaklıkta fazla olduğu saptanmıştır. Aynı sıcaklık değerinin 6 ve 9 sn'lerde de spermatozoon baş

genişliğinin aynı değere sahip olduğu görülmüştür ($P>0,05$). En az baş alanına sahip spermatozoonlar $16,54 \pm 0,43 \mu\text{m}^2$ değeri ile 25°C 50 sn'de görülmüştür. Baş çevresi ise 70°C 3 sn çözdürülen spermalarda $13,03 \pm 0,19 \mu\text{m}$ değeri ile en düşük değere sahiptir. Orta kısım genişlikleri değerlendirildiğinde 25°C 'de 50 sn çözdürülenlerde $0,60 \pm 0,03 \mu\text{m}$ olarak en düşük değer saptanmıştır. Orta kısım alanı ise, 25°C 40 sn'de diğer gruplara göre $5,26 \pm 1,58 \mu\text{m}^2$ değeri ile daha fazla olduğu belirlenmiştir ($P>0,05$).

Çizelge 3.7. Spermatozoon başına ait CASA verileri

Grup (n=9)	Arit. Ort. \pm Std. Hata			
	Baş Uzunluğu (μm)	Baş Genişliği (μm)	Baş Alanı (μm^2)	Baş Çevresi (μm)
Kontrol (37°C 20 sn)	$6,15 \pm 0,07$	$2,92 \pm 0,04$	$16,88 \pm 0,38$	$13,28 \pm 0,17$
37°C 30 sn	$6,21 \pm 0,11$	$2,95 \pm 0,06$	$17,27 \pm 0,5$	$13,36 \pm 0,24$
37°C 40 sn	$6,11 \pm 0,08$	$2,9 \pm 0,05$	$16,7 \pm 0,39$	$13,21 \pm 0,15$
37°C 50 sn	$6,16 \pm 0,12$	$2,93 \pm 0,06$	$16,9 \pm 0,64$	$13,22 \pm 0,23$
37°C 60 sn	$6,07 \pm 0,09$	$2,89 \pm 0,05$	$16,65 \pm 0,42$	$13,15 \pm 0,21$
25°C 30 sn	$6,1 \pm 0,06$	$2,93 \pm 0,03$	$16,69 \pm 0,41$	$13,18 \pm 0,12$
25°C 40 sn	$6,22 \pm 0,09$	$2,95 \pm 0,06$	$17,33 \pm 0,53$	$13,38 \pm 0,18$
25°C 50 sn	$6,11 \pm 0,08$	$2,92 \pm 0,05$	$16,54 \pm 0,43$	$13,23 \pm 0,18$
25°C 60 sn	$6,15 \pm 0,08$	$2,93 \pm 0,05$	$17,11 \pm 0,48$	$13,31 \pm 0,17$
40°C 10 sn	$6,15 \pm 0,06$	$2,93 \pm 0,04$	$16,93 \pm 0,33$	$13,23 \pm 0,14$
40°C 15 sn	$6,13 \pm 0,07$	$2,92 \pm 0,05$	$16,86 \pm 0,39$	$13,32 \pm 0,15$
40°C 20 sn	$6,15 \pm 0,09$	$2,96 \pm 0,07$	$17,09 \pm 0,49$	$13,32 \pm 0,22$
40°C 25 sn	$6,18 \pm 0,09$	$2,94 \pm 0,05$	$17,16 \pm 0,5$	$13,37 \pm 0,23$
70°C 3 sn	$6,04 \pm 0,09$	$2,91 \pm 0,05$	$16,78 \pm 0,44$	$13,03 \pm 0,19$
70°C 6 sn	$6,12 \pm 0,07$	$2,96 \pm 0,06$	$17,01 \pm 0,43$	$13,29 \pm 0,16$
70°C 9 sn	$6,21 \pm 0,09$	$2,96 \pm 0,06$	$17,33 \pm 0,48$	$13,39 \pm 0,19$
70°C 12 sn	$6,3 \pm 0,09$	$2,96 \pm 0,06$	$17,42 \pm 0,49$	$13,43 \pm 0,22$

Baş Uzunluğu: $P= 0,930$; Baş Genişliği: $P=0,994$; Baş Alanı: $P= 0,993$; Baş Çevresi: $P=0,997$

Çizelge 3.8. Spermatozoon orta kısmına ait CASA verileri

Grup (n=9)	Arit. Ort. \pm Std. Hata	
	Orta Kısım Genişliği (μm)	Orta Kısım Alanı (μm^2)
Kontrol (37°C 20 sn)	$0,64 \pm 0,02$	$3,53 \pm 0,12$
37°C 30 sn	$0,65 \pm 0,01$	$3,81 \pm 0,08$
37°C 40 sn	$0,67 \pm 0,01$	$3,65 \pm 0,1$
37°C 50 sn	$0,65 \pm 0,02$	$3,61 \pm 0,18$

37°C 60 sn 0,65 ± 0,01 3,76 ± 0,1

Çizelge 3.8. Devamı Spermatozoon orta kısmına ait CASA verileri

25°C 30 sn	0,64 ± 0,02	3,48 ± 0,18
25°C 40 sn	0,68 ± 0,01	5,26 ± 1,58
25°C 50 sn	0,6 ± 0,03	3,34 ± 0,12
25°C 60 sn	0,66 ± 0,01	3,73 ± 0,15
40°C 10 sn	0,65 ± 0,02	3,6 ± 0,14
40°C 15 sn	0,63 ± 0,01	3,62 ± 0,05
40°C 20 sn	0,66 ± 0,03	3,52 ± 0,17
40°C 25 sn	0,67 ± 0,01	3,66 ± 0,17
70°C 3 sn	0,65 ± 0,02	3,79 ± 0,12
70°C 6 sn	0,65 ± 0,03	3,45 ± 0,18
70°C 9 sn	0,65 ± 0,01	3,7 ± 0,12
70°C 12 sn	0,64 ± 0,01	3,52 ± 0,08

Orta Kısım Genişliği: P=0,514; Orta Kısım Alanı; P=0,381.

4. TARTIŞMA

Sperm kriyoprezervasyonu en hızlı ilerlemeyi boğa alanında elde etmiştir. Bu türlerin spermatozoasının dondurulmasında uzun yıllardır seleksiyon uygulanmaktadır. Boğalar projeny test ve genomik seleksiyon yöntemleri ile sperma istasyonlarına aday olarak seçilmektedir. Ancak burada en dikkat çekici olan; bireylerin uzun yıllardır uygulanan, son seçim kriteri olarak spermasının yüksek dondurulabilirliğe sahip olmasıdır (Vishwanath, 2003).

Hayvanlardan normal bir dölverimi alınabilmesi, suni tohumlama ile ilgili temel bilgileri edinmek ve suni tohumlamayı etkileyen yapısal ve çevresel faktörleri kontrol altında tutmakla olasıdır. Boğalardan spermanın alınması, muayenesi, değerlendirilmesi, sulandırılması, dondurulması, saklanması, alana gönderilmesi ve bu spermaların tohumlamada kullanılması birbirine bağlı olaylar zinciridir. Bu zincirin bir yerinde yapılacak bir hata dölverimi düşüklüklerine neden olmaktadır (Yılmaz ve Yurdaydın, 1993).

Kriyoprezervasyon işlemi, spermatozoanın ejakülasyon sonrasındaki maturasyon ve fertilizasyon sürecinde oluşan yapay bir kesintiyi temsil etmektedir. Bugüne kadar geliştirilen tekniklerle dahi kriyoprezervasyon işlemi, spermatozoon üzerinde hasarlara sebep olmaktadır. Kriyoprezervasyon ile oluşturulan yapay kesintiden sonraki süreçte elde edilecek sonucu bireylerin sperma kalitesi belirlemektedir. Bu bakımdan sperması dondurulacak bireyde işlem öncesinde gerçekleştirilecek spermatolojik testler önemlidir. Dondurma ve sonrasındaki çözündürme işlemiyle oluşan değişimlerle, spermatozoonlar kriyoprezervasyon öncesi spermatozoondan fizyolojik olarak farklılık göstermektedir. Spermatozoonlar, *in vitro* ve *in vivo* ortamdaki her türlü strese karşı hassas hale gelmektedir. Sonuçta taze spermanın fertilité oranı dondurulmuş spermaya göre daha yüksek olmaktadır (Tekin, 2017).

Spermanın ortam sıcaklığında depolanması tek başına spermatozoanın fertilitasını önemli ölçüde düşürmemekte, ancak depolamanın potansiyel süresini sınırlamakta, bu nedenle uzun vadeli saklama için sıvı azotta -196 °C'de kriyoprezervasyon gerekmektedir. Kritik sıcaklık aralığındaki dondurma hızları, kriyoprezervasyon işlemi sırasında çok önemlidir. Çünkü bu durum, spermatozoanın kendi hücre dışı ortamlarıyla dengede kalabileceğini veya gittikçe aşırı soğuyarak hücre içi buz oluşumu ihtimalinin artmasını belirlemektedir (Kumar ve ark., 2003). Yavaş soğutma sırasında, spermatozoa dehidrasyonu en fazla, intraselüler ve ekstraselüler boşluk arasındaki ozmotik denge noktasına kadar ve sıklıkla da zararlı olan hücresel dehidrasyona kadar ilerleyebilmektedir. Ancak, soğutma oranının çok fazla yükseltilmesi, yavaş dehidrasyondan ötürü hücre içi buz oluşumunu engellememektedir. Bu nedenle, spermatozoanın canlı kalabilmesi optimum soğutma oranına bağlıdır. Optimal soğutma oranı ile hücre içi çözünenlerin konsantrasyonunun aşırı artışı ve hücre içi dehidrasyon azaltılmakta ve böylece sperm hücrelerinin aşırı büzülmesinin önüne geçilmektedir. Bununla birlikte, optimum soğutma oranlarında dahi, spermatozoa, kısa bir süre boyunca olumsuz koşullara karşı savunmasız kalmaktadır (Woelders, 1997).

Boğa spermasının kalitesi uygulanan suni tohumlamanın başarılı sonuç vermesi açısından oldukça önem arz etmektedir. Uygulanan tohumlamadan alınacak sonuç; kullanılan spermanın kalitesi kadar uygulayıcının da doğru şekilde uygulama yapmasına bağlıdır. Standart olarak belirlenen sıcaklık ve sürenin dışına çıkılmasının tohumlama başarısına olan etkisi yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Damızlık boğa spermasının progresif motil spermatozoon değerinin > % 50, teke ve koç için > % 70 aygır için > % 60, köpek için > % 55 olması gerekmektedir. Ancak bu değerlendirme tek başına damızlık bir hayvanın reproduktif performansının ve döl veriminin ortaya konması için yeterli değildir. Motilite tayini gerçekleştirilirken, değerlendirilecek olan sperm örneğinin herhangi bir dış faktörden en az miktarda etkilenmesi gerekmektedir. Spermanın soğuk ya da sığa maruz kalması, sperm toplama kadehindeki herhangi bir kalıntı, sulandırıcının yüksek, düşük Ph yada osmolariteye sahip olması motiliteye negatif etki etmektedir (Verstegen ve ark., 2002).

Çalışmada değişken faktör sıcaklık ve süre olarak belirlendiğinden; belirlenen üç ırktan birer boğanın sperması kullanılmıştır. Böylece çalışma sonucunda elde edilen verilerin yorumlanmasında bireysel ve irksal farklılıklardan ziyade, süre ve sıcaklık değişkenine bağlı olarak farklılıkların olup olmayacağı konusunda bir sonuç elde edilmek istenilmiştir.

Suni tohumlamada başarı oranının artması spermatozoon motilitesi ile doğrudan ilişkilidir. Çözdürülen donmuş spermadaki spermatozoonların motilite değerleri de spermanın kaç derecede kaç saniye çözdürüldüğüyle bağlantılıdır. Elde edilen sonuçlar yıllardır süregelen standart sıcaklık ve zaman aralığının belirlenen yeni değerler ile karşılaştırılmasını sağlamıştır.

Motilite, ileri yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösteren spermatozoonlara oranı olarak ifade edilir. Spermatozoonlar epididimisten sonraki izlediği kanal boyunca motil olarak kabul edilirler. Sperm motilitesi fertilizasyon esnasında çok kritik öneme sahiptir, çünkü oositin katmanları ve zona pellucidayı geçmesi için motil olması ve gerekli enzimleri bu bölgeye ulaştırması gerekmektedir. Biyoteknolojik uygulamalar olmadan motil olmayan ya da anormal olan spermatozoonlar oositi dölleme yeteneğine sahip değildirler. Bu yüzden sperma muayenesinde kullanılan en önemli kalite kriteri motilite tayini olarak kabul edilmektedir (Walker ve ark., 1982). Birçok türde sperma motilite değerlendirilmesinde, spermatozoon immotil, progresif motil ve non-progresif motil olarak sınıflandırılmaktadır. Progresif motil olarak kabul edilen bir spermatozoon ileri doğru ve özellikle düzgün doğrusal hareket eder, non-progresif motil spermatozoon ise hareket yeteneğine sahiptir ancak anormal bir yörüngede ve dairesel hareket etmektedir (Malo ve ark., 2006).

Yapılan çalışmada grupların çözüm sonu motilite değerleri karşılaştırıldığında 37 °C'de 60 saniyede çözdürülenlerde diğer sıcaklık ve sürelerde çözdürülen spermalara göre $80,61 \pm 3,89$ değeri ile daha iyi motilite verileri alınmasına rağmen gruplar arası farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Ayrıca 70

°C 3 saniyede $80,52 \pm 6,42$ değeri bulunarak, 37 °C'de 60 saniyede çözdürülen spermalara yakın bir motilite değeri elde edilmiştir. Kontrol grubu olan 37 °C'de 20 saniyede $71,01 \pm 5,58$ 'lik motilite değeri ile bu sıcaklık ve sürelerde daha yüksek motilite değerleri alınmıştır. Lyashenko (2015) 65, 67 ve 70 °C'lerde çözdürdüğü boğa spermalarında 65-70 °C'de 6-7 saniyede çözdürülenlerin tohumlama ve motilite değerlerinde kontrol grubuna (37 °C'de 20 sn) göre daha yüksek sonuçlar almıştır. Çalışmaya benzer olarak elde edilen sonuçlarda 70 °C 3 saniyede kontrol grubuna göre yüksek bir motilite değeri elde edilmiştir. Ancak bu değer istatistik açısından anlamlı bulunmamıştır. Köpeklerde (Pena ve ark., 2000), kedilerde (Chatdarong ve ark., 2010), koçlarda (Paulenz ve ark., 2004; Dobrin ve ark., 2014) ve domuzlarda (Eriksson ve ark., 2000; Córdova-Izquierdo ve ark., 2006) yapılan çalışmalarda donmuş spermanın 70 °C'de 6-8 saniyede çözdürülmesi spermatozoon canlılığı ve motilitesi üzerine olumlu etkide bulunmuştur. Yıllar boyunca yapılan çalışmalar sonucu 37 °C'de 20 saniyenin optimum sıcaklık ve zaman olduğu saptanmıştır. Ancak yapılan başka bir çalışmada 40 °C'de 60 sn, 60 °C'de 15 sn ve 80 °C'de 5 sn çözdürme sonrası 60 °C'de 15 sn çözdürmenin diğer sıcaklık ve zaman aralıklarına göre motilite açısından daha iyi olduğu belirlenmiştir (Dhami ve ark., 1996). Yılmaz ve Yurdaydın'ın yapmış olduğu çalışmada (1993), 40 °C' de 10 sn' de çözülen 53 payette ortalama spermatozoa motilitesi $\% 65.7 \pm 0.4$ olarak saptanmıştır. Çalışma bulguları ile karşılaştırıldığında $70,08 \pm 4,92$ motilite değeri ile yakın bulgular elde edilmiştir.

Sıcaklık 37 °C olmak üzere spermanın çözdürme sıcaklığı 60 saniyeye çıktığında motilite değeri artmıştır. 70 °C 12 saniyede çözdürülen spermalarda ırk farketmeksizin motil spermatozoon oranı 0 bulunarak spermatozoonlarda hareket saptanmamıştır. Bu da sıcaklık ve sürenin arttırılmasının spermatozoon motilitesi üzerine olumsuz sonuçları olduğunu göstermiştir. Sperma çözdürüldükten sonra CASA cihazında yapılan analiz sonrası spermatozoonlarda bu süre ve sıcaklıkta hareket görülmemiştir. Sperma çözdürmenin hızlı olması gerekliliği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Çünkü yavaş çözülme (5 °C' de) hücre içindeki buzun yeniden kristalleşmesine izin vererek membran hasarına neden olmaktadır. Spermanın 70 °C'de 5 saniye boyunca çözdürülmesi, 37 °C'de 30 saniye ve 50 °C'de

15 saniye süreyle çözdürmeyle kıyaslandığında spermatozoon hareketliliğinin yanı sıra akrozom bütünlüğünün ve sperm hücrelerinin hayatta kalma oranının önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Nicola ve ark., 2014).

Progresif motilite değeri en yüksek 37 °C 40 saniyede $18,35 \pm 3,26$ olarak bulunmuştur. Progresif motilite için istatistiki açıdan gruplar arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Non-progresif motilite açısından bakıldığında 70°C 6 saniyede $52,18 \pm 6,63$ değeri ile en düşük değer alınmıştır. Jotanović ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (2016) 38 °C'de 30 saniye ve 50 °C'de 15 saniyede çözdürülen spermalarda çözüm sonu progresif motilite değerlendirmesinde dikkate değer bir fark görülmemiştir (74 vs. 71.7%). Çözdürme sonrası ölü canlı spermatozoon oranı düşük çözdürme sıcaklıklarında daha düşük saptanmıştır. Ayrıca membran hasarı da düşük sıcaklıklarda çözdürülen spermatozoonlarda daha fazla görülmüştür. Çalışmada da kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta 40 saniyede çözdürülen spermalarda progresif motilite değeri yüksek bulunmuştur. Kontrol grubuna göre daha yüksek sıcaklıklarda progresif motilite değerinin daha iyi olduğu saptanmıştır ($P>0,05$).

VCL, VSL, BCF ve ALH kinetik parametreleri ile gebelik oranı arasında yüksek pozitif korelasyonlar saptanmıştır. VSL, VAP ve VCL spesifik yollara göre spermatozoon hızının ölçümleri olduğundan bu değerler yüksek mobiliteye sahip olarak sınıflandırılan spermatozoonun daha düşük mobilitelerle sınıflandırılanlardan daha hızlı yüzdüğünü göstermektedir (King ve ark., 2000; İnanç ve ark., 2018). Gebelik başarısını tahmin ederken ALH değerlerinin geleneksel sperma kalitesi kriterlerinden daha güvenilir olduğu tespit edilmiştir (Hirano ve ark., 2001; İnanç ve ark., 2018). Spermatozoon transportunda VSL'nin rolü, dişi üreme kanalından geçişte ve oosit penetrasyonu sırasında olduğu düşünülmektedir (Gillan ve ark., 2008; İnanç ve ark., 2018). ALH'nin de fertilizasyon oranları ile bir ilişkisi vardır (İnanç ve ark., 2018). İn vitro fertilizasyon oranlarının STR ile anlamlı derecede bağlantılı olduğu görülmüştür (Donnelly ve ark., 1998; İnanç ve ark., 2018). VCL, VSL ve VAP değerleri in vivo fertilizasyonun tahmininde önemliyken; STR, LIN ve WOB değerlerinin ise, in vitro fertilizasyon oranlarıyla pozitif korelasyona sahiptir. Bu

yüzden bu verilerin değeri çözdürme sıcaklık ve süresinin olumlu ya da olumsuz etkisi hakkında fikir vermektedir. CASA kinetik parametreleri değerlendirildiğinde en yüksek VCL değeri 70 °C'de 6 saniyede çözdürülen spermalarda $164,47 \pm 4,88$ belirlenmiştir. VAP değeri en yüksek 70 °C'de 3 saniyede $114,76 \pm 4,14$ değeri ile yine aynı sıcaklık ve sürede VSL değeri $70,76 \pm 3,17$ olduğu görülmüştür. STR değeri 25 °C 50 saniye'de çözdürülen spermalarda $54,9 \pm 1,62$ değeri ile en yüksek değerde belirlenmiştir. LIN ve WOB değeri sırasıyla, $42,06 \pm 2,91$ ve $73,03 \pm 1,17$ değerleri ile 37 °C'de 50 saniyede en yüksek düzeyde saptanmıştır. Çalışmada elde edilen en düşük ALH değeri $4,64 \pm 0,59$ olarak 25 °C'de 50 saniyede; BCF değeri ise $5,58 \pm 0,48$ ile 25 °C'de 30 saniyede belirlenmiştir. Hiperaktivite'de 40 °C'de 15 saniyede $2,75 \pm 0,31$ değeri ile en yüksek değer saptanmıştır. Veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P>0,05$).

CASA cihazı ile yapılan morfoloji değerlendirmesinde anormal ve normal spermatozoa oranı yönüyle istatistiksel olarak önemli farklılıklar saptandı ($P<0,05$). Kontrol grubu olan 37 °C'de 20 saniye'de morfolojik olarak normal spermatozoa oranı ortalaması $75,67 \pm 3,58$ olarak belirlenmiştir. Deneysel gruplar arasında ise, 37 °C'de 30 saniye'de $65,33 \pm 2,35$ bulgusu ile en yüksek oranda normal spermatozoa değeri elde edilmiştir. Anormal spermatozoa oranı $78,89 \pm 2,02$ ile 70 °C'de 12 saniyede belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre sıcaklık arttıkça ve süre uzadıkça spermatozoa morfolojisinde olumsuz değişiklikler olmaktadır. Fertilizasyonda spermatozoa morfolojisi en az motilite kadar önem arz etmektedir. Hem motilite hem morfoloji bakımından değerlendirildiğinde 70 °C sıcaklıkta çözdürme süresi uzadığında motilite saptanmazken aynı zamanda morfolojik olarak da spermatozoonların hasar aldığı belirlenmiştir. En fazla hasarın spermatozoonun başında olduğu belirlenmiştir. Jotanović ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın (2016) sonucuna göre ise, daha yüksek sıcaklıklarda çözdürmenin fertilizasyon kabiliyetinin iyi olmasını sağlayarak boğa spermasının kalitesini olumlu yönde etkilediği ortaya konulmuştur. Normal spermatozoa morfolojisinin değerlendirilmesi de dahil olmak üzere spermanın rutin değerlendirmesi, dondurma işleminin ve çözdürme prosedürlerinin etkilerini değerlendirmek için uzun süredir kullanılmaktadır. Anormal spermatozoa morfolojisi, aygır ve boğalarda fertilizasyon

kabiliyetinin azalmasının önemli bir göstergesidir. Spermatozoa başı anormallikleri erken embriyonik kayıp, embriyo kalitesinde azalma ve ovuma bağlanma kapasitesinde azalma ile ilişkilendirilmiştir (Maroto-Moralesa ve ark., 2010).

Başarılı bir suni tohumlamada spermanın çözümü sonu motilitesi önemli bir faktördür. Çözdürme prosedürü dondurma prosedürü kadar spermatozoa canlılığında önem teşkil etmektedir. Donmuş spermanın hızlı çözülmesi spermatozoon membran ve sitoplazma hasarlarının engellemesinde etkili olmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar donmuş spermanın 60-80 °C sıcaklık aralığında çözülmesinin spermatozoon canlılığında daha iyi sonuçlar alındığını göstermiştir. 65-70 °C sıcaklıklarda 6-7 saniyede çözümlenen spermalarda canlılık ve motilite oranlarının daha iyi olduğu saptanmıştır. Spermatozoon için kritik sıcaklıklar olan sıcaklık aralıklarının çözülme sırasında hızlı geçilmesi spermatozonda oluşacak hasarı düşürmektedir. Sperma çözülürken 60 °C ve 80 °C sıcaklık aralığının olabildiğince hızlı geçilmesi hasar gören spermatozoa sayısının düşük olması bakımından önemlidir. Yüksek çözülme sıcaklığı protein denatürasyonuna sebep olduğundan; yüksek sıcaklık değerlerinde sperma çözülmesi minimuma düşürülmelidir (Jotanović ve ark., 2016). Yapılan bu çalışmada ise, 70 °C'de 3 saniyede çözümlenen spermalarda ortalama değer $81,5 \pm 6,06$ olarak belirlenmiştir. 70 °C'nin diğer çözülme süresi olan 12 saniyede spermatozoon canlılığının olmadığı belirlenmiştir. Yüksek sıcaklık ve sürelerde spermatozoa canlılığı olumsuz etkilenmektedir. Aynı sıcaklık değerinde çözülme süresi uzadıkça spermatozoonlar canlı kalamamaktadır. 70 °C'de 3 saniye çözümlenen spermaların CASA parametrelerine bakıldığında canlı/ölü oranı yüksek olarak belirlenirken; aynı zamanda motilite değerlerinde de yüksek oranlar elde edilmiştir ($P>0,05$). Sıcaklık arttıkça spermatozoonların da canlı kalma olasılığı düşmektedir. Aynı şekilde çok düşük sıcaklıklarda da spermatozoon canlılığı saptanamamaktadır.

Spermatozoon kromatini kriyoprezervasyon sürecinde değişikliğe uğramaktadır (Karabinus ve ark., 1991). Bu değişikliğin, spermatozoon nükleokromatinin aşırı yoğunlaşmasından kaynaklanabilecek sperm başı yüzey alanındaki bir azalmadan sorumludur. (Royere ve ark., 1988). Kromatinde meydana

gelen değişikliklerin boğalarda spermatozoonun fertilizasyon kabiliyetinde azalma ile ilişkili olduğu görülmektedir (Januskauskas ve ark., 2003). Kromatin yapısındaki değişiklik ve spermatozoon başının yüzey alanının azalması sonucunda spermatozoon başında anormal morfolojik yapı ortaya çıkabilir. Anormal kromatin yapısı, boğaya ait spermatozoon başının morfolojik anormallikleri ve ejaklattaki normal spermatozoon başının yüzdesindeki azalma boğalardaki fertilitte kaybını oluşturmaktadır (Saacke ve White, 1972). Kriyoprezervasyonun kromatin yapısını etkilediği ve spermatozoon başına ait morfometrik verileri değiştirdiği belirlenmiştir (Gravance ve ark., 1998). Çalışmada spermatozoa başı çapında ya da şeklinde bir değişiklik oluşturup oluşturmadığı yönünde veriler değerlendirildiğinde istatistik olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir ($P>0,05$). Kontrol grubu olan 37 C 20 saniyede baş alanı $16,88 \pm 0,38$ olarak belirlenirken; 70 C 12 saniyede $17,42 \pm 0,49$ olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklıkta spermatozoon morfolojisinin de olumsuz etkilendiği bilinmektedir. Yukarıda belirtilen çalışmalara paralel olarak baş alanındaki değişim dikkat çekmektedir. Buna dayanarak spermatozoon başına dair oluşan değişikliklerin morfolojiye dair olumsuzlukları da gösterdiği belirlenmektedir. Daha yüksek zdrme sıcaklıkları daha da hızlı ısıtma sağlamaktadır, ancak 37 C'nin yzerinde algılanan hücre hasarı riski nedeniyle genellikle tercih edilmemektedir (Calamera ve ark., 2010).

Gravance ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (2009), sperma dondurma öncesi ve sonrası baş uzunluğu ve genişliği karşılaştırılmış, dondurma öncesi baş uzunluğu 8,67 olarak belirlenirken, dondurup zdrme sonrası ise 8,45 olduğu belirlenmiştir. Baş genişliğinin ise; 4,55'ken 4,39'a düştüğü görülmüştür. Yapılan çalışmada ise, spermatozoon baş uzunluğu değerlendirildiğinde, en düşük spermatozoon baş uzunlukları 70C 3 sn çözdürülenlerde 6.04 ± 0.09 m; en yüksek değer ise, yine aynı sıcaklık değerinde 12 saniyede çözdürülen spermalarda 6.30 ± 0.09 olarak saptanmıştır. Bu sıcaklık değerindeki diğer parametrelere bakıldığında canlı spermatozoon olmadığı ve morfolojik olarak da anormal spermatozoa oranının diğer gruplara göre yüksek olduğu görülmüştür. 70 C 6,9 ve 12 saniyelerde çözdürülen spermatozoonların baş genişliğinin ise $2,96 \pm 0,06$ değeri ile aynı olduğu görülmüştür. Aynı sıcaklık değerinin 3 saniye olarak çözdürülen spermatozoonlarda

2,91 ± 0,05 olduğu saptanmıştır (P>0,05). Kromatin yoğunlaşmasını ve spermatozoanın morfolojisini araştıran çalışmalar, anormal kromatin yoğunlaşmasının morfolojik anormalliklerden etkilenebileceğini veya bunlara yol açabileceğini düşündürmektedir. Spermatozoon başı ölçümlerindeki değişim boğalarda fertilité potansiyeli ve anormal kromatin yapısı ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Sailer ve ark., 1996). Ayrıca, boğaların skrotal izolasyonundan sonra spermatozoon kromatin yapısındaki değişiklikler, morfolojik olarak anormal spermatozoa yüzdesinde bir artışla paralel hale geldiği saptanmıştır (Karabinus ve ark., 1997). Anilin mavisi ve akridin turuncu boyaması ile değerlendirilen epididimal kedi spermatozoasında kromatin yoğunlaşması, baş anormallikleri olan spermatozoonlarda sadece kuyruk kusurlu spermatozoonlardan önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Hingst ve ark., 1995). Bazı anormallikleri olan insan spermatozoasının %95 kadarında anormal kromatin yoğunlaşması görülmüştür. Normal kromatin yoğunlaşması gösteren spermatozoa yüzdesinin spermatozoa başındaki anormallikleri olanlardan daha düşük olduğu saptanmıştır (Dadoune ve ark., 1998).

Orta kısım, fosfolipid hidroperoksit glutamat peroksit ve ATP sentaz beta alt birimi olan tirozin fosforil proteinleri içerdiğinden kapasitasyon için çok önemlidir. Her ikisi de sperm motilitesinde birincil bir role sahiptir (Shivaji ve ark., 2009). Bu proteinlerin sentezlerinin bozulması fertilitéde düşüğe yol açmaktadır. Aynı zamanda orta kısımda bulunan mitokondri, hücre solunumun normal bir ürünü olan Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) bir kaynağıdır. Normalde bunlar antioksidan savunma mekanizmaları ile hücrelerden çıkarılır. Spermatozoonda, ROS orta parçada birikebilir ve mitokondriye zarar verebilmektedir (Desai ve ark., 2010). Orta kısım uzunlukları ölçülen belirli boğalardan toplanan spermayla tohumlanan ineklerde Geri Çevirme Oranları (NRR), daha uzun orta kısma sahip olanlarda geri çevirme oranında % 5'e varan bir azalma olduğu belirlenmiştir (Shahani ve ark., 2010). Memelilerde, toplam spermatozoon uzunluğundaki değişkenlik esas olarak orta parçanın ve flagellumun uzunluğundaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Cummins ve Woodall, 1985). Spermatozoa orta parçası, hacmini flagellar atım frekansını belirleyen hücreyi itmek için enerji sağlayan yoğun bir helis dizi

mitokondri içermektedir (Cardullo ve Baltz, 1991). Spermatozoa orta kısmının büyüklüğü spermatozoon rekabetinin sonucunu belirlemede önemli olabilmektedir. omurgalılar arasındaki karşılaştırmalı çalışmalar spermatozoon boyutunun yüzme hızı ile arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir (Fitzpatrick ve ark., 2009; Lüpold ve ark., 2009). Yapılan çalışmalar, orta parça hacmindeki artışların daha yüksek yüzme hızına dönüşebileceğini ve dolayısıyla spermatozoon rekabetinde bir avantaj sağladığını göstermektedir (Anderson ve Dixson, 2002). Kırmızı geyik (*Cervus elaphas*) üzerinde yapılan bir çalışmada, spermatozoon orta parça uzunluğu ile spermatozoon yüzme hızı arasında negatif bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Uzun baş ve daha kısa orta kısımları olan spermatozoonlar daha hızlı yüzmektedir. Ancak spermatozoon hızı ile flagellum veya toplam spermatozoon uzunlukları arasında bir ilişki bulunamamıştır (Malo ve ark., 2006). Bu durum diğer memelilerde bu ilişkinin daha fazla tür araştırması gereğini vurgulamaktadır. Genel olarak, daha uzun kuyruğa sahip spermatozoonlar, dişi genital kanalında hareket ederken ovuma daha çabuk ulaşma ve daha kısa kuyruklu olanlara kıyasla daha hızlı yüzme eğilimine sahip olduğu belirlenmiştir (Gomendio ve Roldan, 1991). Spermatozoonun yüzme hızı, dişi genital kanalını daha kolay geçmeyi ve ovuma daha kolay ulaşmayı sağlamaktadır. Yapılan çalışmada farklı süre ve sıcaklıklarda çözdürülen spermalara ait spermatozoon orta kısım genişlikleri değerlendirildiğinde 25 °C'de 40 saniye çözdürülenlerde $0,68 \pm 0,01$ değeri en yüksek değer olarak saptanmıştır. Orta kısım alanına bakıldığında da aynı süre ve sıcaklık değerinin $5,26 \pm 1,58$ ile en fazla orta kısım alanına sahip olduğu saptanmıştır ($P>0,05$). Bu sıcaklık ve süredeki motilite değerine bakıldığında $\% 68,25 \pm 2,26$ olduğu görülmüştür.

Chatterjee ve Gagnon (2001), 40 ° C'de çözdürüldükten sonra gözlenen motilite kazanımının artma potansiyelinin, sperm enzimatik antioksidan aktivitesinin daha hızlı bir iyileşme oranı ile olacağını belirlemişlerdir. Çözdürme sırasında hücre hasarı derecesini sonlandıran iki işlem vardır; [1] oksijen radikali üretimi miktarı ve [2] enzimatik antioksidan aktivitenin geri kazanım oranı. Prensipte olarak, sıcaklık ne kadar yüksek olursa, enzimatik antioksidan aktivitenin geri kazanımı o kadar hızlı gerçekleşir. Bu nedenle, 40 ° C'de çözdürüldükten sonra, çözdürme sırasında meydana gelen oksijen-radikal üretimindeki artışın 37 ° C'de olduğundan daha verimli bir şekilde nötralize edilebileceği bildirilmiştir. Test edilen farklı çözdürme

sıcaklıklarında oksijensiz radikal kökenli sperm hasarını tespit etmek için sperm DNA bütünlüğü ve ATP içeriği değerlendirildiğinde, 40 °C'de çözdürmenin DNA bütünlüğü üzerinde gözlemlenebilir bir belirleyici etkisi yoktur. 40 ° C'de çözdürülen ve 37 ° C' de çözdürülen spermalar arasında ATP içeriğinde dikkate değer bir fark gözlemlenmemiştir. Yapılan çalışmada, 37 °C 20 sn'de çözdürülen kontrol grubuyla 40 °C 10 sn'de çözdürülen spermalardaki spermatozoaların baş uzunluğu parametrelerinin $6.15 \pm 0.07 \mu\text{m}$ ve $6.15 \pm 0.06 \mu\text{m}$ değerleri ile birbirine çok yakın olduğu belirlenmiştir. Uzunluk, çevre ve baş alanı değerlendirildiğinde, 37 °C 30 sn ($6.21 \pm 0.11 \mu\text{m}$ / $13.36 \pm 0.24 \mu\text{m}$ / $17.27 \pm 0.5 \mu\text{m}$) ve 40 °C 25 sn ($6.18 \pm 0.09 \mu\text{m}$ / $13.37 \pm 0.23 \mu\text{m}$ / $17,16 \pm 0,5 \mu\text{m}$) gruplarında diğer gruplara göre daha yüksek parametre değerleri elde edilmiştir. Chatterjee ve Gagnon'un yapmış olduğu çalışmaya paralel olarak, bu çalışmada da 37 °C ile 40 °C arasında benzer parametrelerin olduğu saptanmıştır. 37 °C 40 sn ve 40 °C 25 sn arasındaki orta parça genişliğinin $0,67 \pm 0,01 \mu\text{m}$ olarak aynı olduğu belirlenmiştir. Bu parametrelere dayanarak, 37 °C ve 40 °C sıcaklık değerlerinin spermatozoon morfolojisi üzerinde benzer bir etkisi olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, Simental, Holstein ve Brown Swiss ırkı boğaların spermaları kullanılarak; farklı süre ve sıcaklıklarda çözdürülen spermaların CASA cihazı verileriyle değerlendirilmesi yapılmıştır.

Elde edilen istatistik verilerine göre, 37 °C’de 60 saniyede en yüksek motilite değeri $80,61 \pm 3,89$ olarak belirlenmiştir. 70 °C’de 3 saniye çözdürülen spermaların CASA parametrelerine bakıldığında canlı/ölü oranı $81,5 \pm 6,06$ olarak belirlenirken; aynı zamanda motilite değerlerinde de $80,52 \pm 6,42$ ile yüksek oranlar elde edilmiştir. VAP değeri en yüksek 70 °C’de 3 saniyede $114,76 \pm 4,14$ değeri ile yine aynı sıcaklık ve sürede VSL değeri $70,76 \pm 3,17$ olduğu görülmüştür. Bu sıcaklık ve süredeki deney grubunda normal spermatozoon oranı $30,89 \pm 5,66$ olarak saptanmıştır. Spermatozoon motilitesi yüksek olsa da sıcaklığın etkisi ile morfoloji olumsuz etkilenmekte ve anormal spermatozoon sayısı artmaktadır. Sıcaklık spermatozoon hareketliliğinde artış oluşturmakta ancak baş ve orta kısım anomalilerinde de artışa sebep olmaktadır.

Yapılmış olan bu çalışmada 37 °C’den 70 °C’ye değişen sıcaklıklarda çözdürülen spermaların aynı sıcaklık değerinde farklı sürelerde çözdürülmesi ile süredeki küçük farklılıkların dahi ne kadar büyük farklar doğurabildiği görülmüştür. Özellikle 70 °C gibi kritik bir sıcaklıkta sürenin ne kadar etkili olduğu görülerek; spermatozoonların canlılığının muhafazası için süreye ve sıcaklığa dikkat edilmesi hususunda bilgi sahibi olunmuştur. Çalışmadaki en yüksek sıcaklık değeri olan 70 °C’de farklı sürelerde çözdürülen spermaların CASA cihazıyla değerlendirilmesi sonucu spermatozoonlara ait hareket parametreleri ile morfoloji parametrelerinin tam tersi oranlar gösterdiği görülmüştür. İstatiksel olarak da sıcaklık ve çözdürme süresi arttıkça spermatozoon morfolojisinin olumsuz etkilendiği ortaya konulmuştur.

Laboratuvar şartlarında ortaya konulan bu değerler göstermektedir ki; oda sıcaklığı olarak da bilinen 25°C’de 30 saniyede çözdürülen spermaların da motilite değeri $69,48 \pm 3,87$ olarak belirlenmiştir. Canlı/ölu oranı $71,33 \pm 3,89$ olarak belirlenmiş olup; bu değer diğer gruplarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir değerdir. Ayrıca normal spermatozoon oranı $54,56 \pm 2,82$ olarak saptanmıştır.

Sperma çözdürme prosedüründe kullanılan 37 °C’de 20 saniyeye yakın olan ortalama sıcaklık ve sürelerde motilite değerleri arasında belirgin farklılıklar görülmemektedir. Ancak sıcaklık arttıkça ve spermanın çözdürme süresi uzadıkça motilite üzerinde belirgin farklılıklar görülmüştür. 70 °C sıcaklığın 12 saniye olan çözdürme grubunda spermatozoa hareketliliği görülmemiştir. Bu sıcaklık ve sürede spermatozoa canlılığının devam etmediği görülmüştür.

Motilite verilerine paralel olarak canlı ve ölu spermatozoa oranı paralellik göstermektedir. Sıcaklık arttıkça canlı oranının da arttığı ancak istatistik olarak belirgin bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Motilite değeri her ne kadar yüksek sıcaklıkta fazla olarak belirlense de aynı durum morfoloji konusunda söylenememektedir. İstatistiksel olarak da sıcaklık ve süre arttıkça anormal oranının arttığı ortaya konulmuştur. Çözdürme sıcaklığı ve süresi üzerine değerlendirme yapılırken, motiliteye göre yapılan değerlendirme yeterli olmamaktadır. Motilitesi yüksek olan spermatozoonların morfolojik açıdan anormal ya da normal oluşu fertilizasyon kabiliyetini etkilediği için spermatozoon morfoloji önemli bir parametreyi oluşturmaktadır. Motil olan ve belli bir motilite değerine sahip olan spermatozoonların aslında sadece motil olmasının başarılı bir fertilizasyon açısından yeterli olmadığı bilinmektedir. Çalışmada da görülmüştür ki; motilite olarak yüksek yüzdeye sahip olan spermatozoonlar morfolojik olarak normal olmayabilmektedir. Bu durum çözdürme sıcaklık ve süresinin önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Suni tohumlama başarısı, dişinin uygun tohumlama zamanında olması ile tohumlamada kullanılan spermadaki spermatozoonların dölleme kabiliyetine bağlıdır. Payette bulunan spermatozoonlar her bakımdan normal değerleri taşıya bile

uygulayıcı hatası veya çevresel koşullardan da etkilenebilmektedir. Aynı sıcaklığın farklı sürelerinin çalışılmış olması sıcaklık sabitken sürenin spermatozoonun belli parametreleri üzerine etkisinin ortaya konulmasını sağlamıştır. Laboratuvar şartlarında sperma çözdürülürken standart koşullar uygulanmaktadır. Suni tohumlamanın uygulandığı saha şartları, standart prosedürlerin uygulanması konusunda her zaman aynı olmamaktadır. Bu durum uygulayıcının tohumlamaların gebelikle sonuçlanmasını engelleyebilmektedir. Sonuca neden olan sebepler değerlendirildiğinde, sperma kalitesi açısından değerlendirilmeler yapılmışsa sebebin sperma etkenli olmadığı bilinmektedir. Dışı uygun tohumlama zamanında ise gebelik oluşmamasının sebebi uygulayıcının çözdürme sırasında standartlara bağlı kalmaması olabilmektedir. Spermatozoonların zarar görebileceği şartların önüne geçilmesi adına dondurulmuş spermanın çözdürme aşamasına azami özen göstermek gerekmektedir.

İrk bazında tekrar sayısına göre alınan ortalama değerlere göre Simental ırkı boğanın diğer iki ırk boğaya göre bazı sıcaklıklarda farklı motilite değerleri verdiği görülmüştür. Bu durum ırka bağlı olarak önemsiz olup bireysel bir sebebe dayalı olabilmektedir. Yapılan çalışma ırktan çok sıcaklık ve süre değişkenini baz aldığı için bu parametrelere odaklanılarak veriler değerlendirilmiştir. Aynı ırktan tek bir boğanın spermaları kullanılarak bireysel farklılıklar göz ardı edilmiş ve çalışmanın temeli olan çözdürme sıcaklık ve sürelerinin farklılığı ile elde edilen sonuçlara odaklanılmıştır. Buna dayanarak; suni tohumlamanın yoğun olarak uygulandığı saha şartlarında donmuş spermanın çözdürülmesi sırasında uygulanan farklı sıcaklık ve sürenin spermatozoon fertilizasyonu üzerine olumlu ya da olumsuz etkisinin değerlendirilmesi sağlanmıştır. Çalışmaya dair veriler uygulayıcılara uygulama yaparken optimum sıcaklık ve sürenin yanı sıra hangi sıcaklık ve sürenin tohumlama başarısında daha etkin olduğu bakımından fikir vermektedir. İrk bazında yapılacak olan çalışmalarla ırka dayalı bir parametre değeri oluşturulabilir.

Çok yüksek ve çok düşük sıcaklık değerlerinin spermatozoa açısından zararlı olduğu bilinmektedir. Yapılan bu çalışma ile de yüksek sıcaklıklarda spermatozoa

her ne kadar aktif olsa da morfolojik olarak zarar görebilmektedir. Fertil bir spermatozoonun motil olması kadar morfolojik olarak da normal olması gerekmektedir. Saha şartlarında suni tohumlama yapan uygulayıcının spermayı çözdürürken sıcaklık ve süreye önem vermesinin gerekliliği yapılmış olan çalışma ile ortaya konulmuştur. Standart sıcaklık ve süre olarak belirlenen kriterlerden ne kadar uzaklaşırsa spermatozoon o kadar zarar görmektedir. Bu durumda ekonomik kayıplara ve zaman kaybına sebep olmaktadır. Çalışma sonuçlarına göre; çözdürme sıcaklık ve süresinin doğru uygulanmasının suni tohumlama başarısını etkileyen başlıca faktörlerden bir tanesi olduğu CASA verilerine dayanarak ortaya konulmuştur. CASA cihazı ile verilerin ortaya konulması sonucu konvansiyonel yöntemlerin aksine daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Güncel olarak kullanılan diğer cihazlar ile CASA cihazının karşılaştırmalı verilerinin değerlendirilebileceği çalışmaların yapılması gereklidir.

Farklı süre ve sıcaklıklarda çözdürülmüş spermalar arasında orta kısım genişliklerine bakıldığında 25 °C'de 40 saniye çözdürülenlerde $0,68 \pm 0,01$ değeri en yüksek değer olarak saptanmıştır. Orta kısım alanına bakıldığında da aynı süre ve sıcaklık değerinin $5,26 \pm 1,58$ ile en fazla orta kısım alanına sahip olduğu saptanmıştır. Spermatozoonun orta kısmının hareket açısından önemli olduğu düşünülünce elde edilen verilerin tohumlama sonrası gebelik oranlarıyla desteklenmesi çalışmanın sonuçlarını da destekleyici nitelikte olacaktır.

Spermatozoon başının kriyoprezervasyon etkisi hakkında yapılan çalışmalarla ortaya konulan veriler mevcuttur. Yapılan çalışmada sıcaklık ve sürelerle göre spermatozoon başının ve orta kısmının ne derecede etkilendiği ortaya konulmuştur. Baş çapının ve şeklinin spermatozoon morfolojisi ile doğrudan ilişkisi olduğu düşünülünce, bu veriler üzerine kurgulanacak farklı çalışmalar ile daha kapsamlı sonuçlar elde edilmesi mümkün olacaktır.

ÖZET

Farklı sıcaklık ve sürelerde çözdürülen dondurulmuş boğa spermalarının CASA parametreleri ile değerlendirilmesi

Dondurulmuş boğa spermalarının çözüm sonu parametreleri uygulanan suni tohumlamanın başarısı açısından oldukça önemlidir. Dişi hayvanlara uygulanan suni tohumlamalarda kriter olarak belirlenen 37 °C'de 20 saniye'de çözdürülmesi gereken boğa spermaları saha şartlarında her ne kadar uygulanılmaya çalışılsa da bazı zamanlarda pek mümkün olmamaktadır. Çevresel koşullar ve insan faktörü göz önüne alındığında sıcaklığa ya da süreye dair değişiklikler gözlemlenebilmektedir. Bu durum uygulanan suni tohumlamanın başarısını da etkileyen başlıca faktör olabilmektedir. Bu çalışmada, saha şartlarında en çok kullanılan boğa ırklarından olan Simental, Holstein ve Brown Swiss ırkı boğaların dondurulmuş spermaları kullanılmıştır. Çalışmada gruplar; kontrol grubu 37 °C'de 20 sn.; deney grupları ise, 25 °C ve 37 °C'de 30, 40, 50 ve 60 sn.; 40 °C'de 10, 15, 20 ve 25 sn.; 70 °C'de 3, 6, 9, 12 sn. olarak belirlenmiştir. Üç ırk boğadan 9 tekrarda gruplar çalışılarak spermalar CASA parametreleri açısından değerlendirilmiştir.

Çözüm sonu en yüksek motilite, ırklardan bağımsız olarak en yüksek 37 °C'de 60 saniyede çözdürülen spermalarda $80,61 \pm 3,89$ elde edilmiştir. Kontrol grubuna ve motilitenin en yüksek belirlendiği grup olan 37 °C'de 60 saniye grubuna yakın motilite parametresi 70 °C 3 saniye'de $80,52 \pm 6,42$ olarak saptanmıştır ($P>0,05$). Progresif motilite değeri en yüksek 37 °C 40 saniye'de $18,35 \pm 3,26$ elde edilmiştir. Non-progresif motilite açısından bakıldığında 70°C 6 saniyede $52,18 \pm 6,63$ değeri ile en düşük değer alınmıştır ($P>0,05$). En yüksek VCL değeri 70 °C'de 6 saniyede çözdürülen spermalarda $164,47 \pm 4,88$ belirlenmiştir. VAP değeri en yüksek 70 °C'de 3 saniyede $114,76 \pm 4,14$ değeri ile yine aynı sıcaklık ve sürede VSL değeri $70,76 \pm 3,17$ olduğu görülmüştür. STR değeri 25 °C 50 saniye'de çözdürülen spermalarda $54,9 \pm 1,62$ değeri ile en yüksek değerde belirlenmiştir. LIN ve WOB değeri sırasıyla, $42,06 \pm 2,91$ ve $73,03 \pm 1,17$ değerleri ile 37 °C'de 50 saniyede en yüksek düzeyde saptanmıştır. En düşük ALH değeri $4,64 \pm 0,59$ olarak 25 °C'de 50 saniyede; BCF değeri ise $5,58 \pm 0,48$ ile 25 °C'de 30 saniyede belirlenmiştir. Hiperaktivite'de 40 °C'de 15 saniyede $2,75 \pm 0,31$ değeri ile en yüksek değer saptanmıştır. Kontrol grubu olan 37 °C'de 20 saniye'de morfolojik olarak normal spermatozoa oranı ortalaması $75,67 \pm 3,58$ olarak belirlenmiştir. Deneysel gruplar arasında ise, 37 °C'de 30 saniye'de $65,33 \pm 2,35$ bulgusu ile en yüksek oranda normal spermatozoa değeri elde edilmiştir. Anormal spermatozoa oranı $78,89 \pm 2,02$ ile 70 °C'de 12 saniyede belirlenmiştir. Sıcaklık ve süre arttıkça spermatozoon morfolojisinin olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir ($P<0,005$). 70°C'de 3 saniye'de çözdürülen spermalarda ortalama değer $81,5 \pm 6,06$ olarak belirlenmiştir. 70 °C'nin diğer çözdürme süresi olan 12 saniyede canlı spermatozoa olmadığı görülmüştür ($P>0,05$). Sıcaklık ve süreler göre spermatozoon başına ve orta kısmına ait CASA verileri ölçümüne göre gruplar arasında bir fark görülmemiştir ($P>0,05$). Orta kısım genişlikleri değerlendirildiğinde 25 °C'de 40 saniye çözdürülenlerde $0,68 \pm 0,01$ değeri en yüksek değer olarak saptanmıştır. Orta kısım alanına bakıldığında da aynı süre ve sıcaklık değerinin $5,26 \pm 1,58$ ile en fazla orta kısım alanına sahip olduğu saptanmıştır. 37 °C 20 saniyede baş alanı $16,88 \pm 0,38$ olarak belirlenirken; 70 °C 12 saniyede $17,42 \pm 0,49$ olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: boğa sperması, CASA, çözdürme sıcaklığı, çözdürme zamanı

SUMMARY

Evaluation of bull semen frozen and thawed at different temperatures and time periods with CASA parameters

The post-thaw parameters of frozen bull semen are too important for the success of artificial insemination. Bull semen, which should be dissolved in 20 seconds at 37 °C, which is determined as a criterion in artificial insemination applied to female animals, is not possible at some times even though it is tried to be applied in field conditions. Considering the environmental conditions and the human factor, changes in temperature or time can be observed. This may be the main factor affecting the success of the artificial insemination applied. In this study, frozen semen of Simental, Holstein and Brown Swiss bulls, which are the most used bull breeds in field conditions, were used. Groups in the study; control group thawed for 20 seconds at 37 °C; and experimental groups were thawed for 30, 40, 50 and 60 s at 25 °C and 37 °C; for 10, 15, 20 and 25 s at 40 °C; for 3, 6, 9, 12 s at 70 °C, determined as. Sperms were evaluated in terms of CASA parameters by analyzing in groups of 9 repeat from three bulls.

At the end of thawing, the highest motility, $80,61 \pm 3,89$ was obtained in the sperm dissolved in the highest 37 °C at 60 seconds regardless of the bull breeds. The motility parameter close to the 60 seconds group at 37 °C, which is the highest group in the control group and motility, was determined as $80,52 \pm 6,42$ in 70 °C 3 seconds ($P>0,05$). The highest progressive motility value was achieved in 37 °C 40 seconds $18,35 \pm 3,26$. In terms of non-progressive motility, the lowest value was taken with a value of $52,18 \pm 6,63$ in 70 °C 6 seconds ($P>0,05$). The highest VCL value was determined as $164,47 \pm 4,88$ in sperms that were dissolved at 70 °C 6 in 6 seconds. It was observed that the VAP value was $70,76 \pm 3,17$ at the same temperature and time with the value of $114,76 \pm 4,14$ in 3 seconds at the highest 70 °C. STR value was determined as the highest value with $54,9 \pm 1,62$ value in semen dissolved in 25 °C 50 seconds. LIN and WOB values were found to be the highest in 50 seconds at 37 °C with $42,06 \pm 2,91$ and $73,03 \pm 1,17$, respectively. The lowest ALH value was $4,64 \pm 0,59$ at 25 °C 50 in 50 seconds; BCF value was determined at 5.5 ile with $5,58 \pm 0,48$ in 30 seconds. The highest value was detected in hyperactivity at 40 °C with a value of $2,75 \pm 0,31$ in 15 seconds. Morphologically normal spermatozoa ratio was determined as $75,67 \pm 3,58$ in 20 seconds in control group 37 °C. Among the experimental groups, the highest rate of normal spermatozoa was obtained with a finding of $65,33 \pm 2,35$ in 30 seconds at 37 °C. Abnormal spermatozoa ratio was determined in 78 seconds at $78,89 \pm 2,02$ with 12 seconds. It has been determined that spermatozoon morphology is adversely affected by increasing temperature and time ($P<0,005$). The mean value was determined as $81,5 \pm 6,06$ in semen dissolved in 70 °C at 3 seconds. It was observed that 70 °C did not have live spermatozoa in the other thawing time of 12 seconds ($P> 0,005$). There was no difference between groups according to the measurement of CASA data per spermatozoon and its middle part according to temperature and duration ($P>0,05$). When the middle piece widths were evaluated, $0,68 \pm 0,01$ value was determined as the highest value in those who were thawed for 25 seconds at 25 °C. When looking at the middle piece area, it was determined that the same duration and temperature value had the highest middle piece area

with 5.26 ± 1.58 . While the head area was determined as 16.88 ± 0.38 in 37 °C 20 seconds; It has been determined as 17.42 ± 0.49 in 70 °C 12 seconds.

Keywords: bull semen, CASA, thawing temperature, thawing time

KAYNAKLAR

- ABDELHAFEZ F, BEDAIWY M, EL-NASHAR SA, SABANEH E, DESAI N (2009). Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: A systematic review. *Hum. Reprod.*, **15**: 153–164.
- AGARWAL A, VARGHESE AC, SHARMA RK (2009). Markers of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Integrity. In: Park-Sarge OK, Curry T, editors. MOLECULAR ENDOCRINOLOGY. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), Vol 590. Totowa, NJ: Humana Press, s: 377–402.
- AITKEN RJ (1995). Free radicals, lipidperoxidation and spermfunction. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**: 659–68.
- ALQUÉZAR-BAETA C, GIMENO-MARTOS S, MIGUEL-JIMÉNEZ S, SANTOLARIA P, YÁNIZ J, PALACÍN I (2019). OpenCASA: a new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput. Biol.* **2019**.
- ALVAREZ M, TAMAYO-CANUL J, ANEL E, BOIXO JC, MATA-CAMPUZANO M, MARTINEZ-PASTOR F (2012). Sperm concentration at freezing affects postthaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*, **77**:1111–1118.
- AMANN RP, WABERSKI D (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, **81**:5–17.
- ANDERSON MJ VE DIXSON AF (2002). Motility and the mid-piece in primates. *Nature*, **416**: 496.
- ARAV, A (1999). Device and methods for multigradient directional cooling and warming of biological samples. *Israel: Interface Multigrad Tech*, s: 1–10.
- BAILEY JL, BE'RUBE' B (1998). Mechanisms of cryopreservation-induced capacitation of bovine sperm. *J. Androl*, 20:13.
- BARBAS JP, MASCARENHAS RD (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, **10**: 49-62.
- BENSON JD, WOODS EJ, WALTERS EM, CRITSER JK (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, **78**: 1682–1699.
- BIGGERS JD (1991). Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. *Journal of Reproduction and Fertility* **93**: 173–186.

- BLACKSHAW AW (1995). Factors affecting the reveal of bull and ramspermatozoa after freezing to -79°C. *Aust. Vet. J.*, **31**: 238-241.
- BOGLE OA, KUMAR K, ATTARDO-PARRINELLO C, LEWIS SEM, ESTANYOL JM, BALLESCÀ JL (2017). Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology.*, **5**:10–22.
- BORGES E JR, ROSSI LM, LOCAMBO DE FREITAS CV, GUILHERME P, BONETTI TC, IACONELLI A, PASQUALOTTO FF (2007). Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Fertil. Steril.*, **87**: 316–320.
- BRATTON RW, FOOTE RH, CRUTHERS JC (1955). Preliminary Fertility Results with Frozen Bovine Spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, **38(1)**: 40-46.
- BUCAK MN, ATES SAHIN A, YÜCE A (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rumin. Res.* **75**:128–134.
- CALAMERA JC, BUFFONE MG, DONCEL GF, BRUGO OLMEDA S, VINCENTIIS S, CALAMERA MM, STOREY BT, ALVAREZ JG (2010). Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa. *Fertility and Sterility.*, **93(3)**: 789-794.
- CARDULLO RA VE BALTZ JM (1991). Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **19**: 180–188.
- CHATDARONG K, THUWANUT P, MANEE-İN S, LOHACHİT C, AXNÉR E (2010). Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. *Reprod. Dom. Ani.*; **45(2)**: 221-227.
- CHATTERJEE S, GAGNON C (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, **59**: 451–458.
- CLARKE GN (2006). A.R.T. and history, 1678-1978. *Human Reproduction*, **21**: 1645–1650.
- COOPER TG, WOOLLEY DM (1982). Stroboscopic illumination for the assessment of hyperactivated motility of mouse spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, **223(3)**: 291-294.
- COPPOLA G, DI CAPRIO G, WILDİN GM, FERRARO P, ESPOSITO G, DI MATTEO L (2014). Digital holographic microscopy for the evaluation of human sperm structure. *Zygote*, **22**: 446–54.
- CÓRDOVA-IZQUIERDO A, OLİVA JH, LLEÓ B, GARCÍA-ARTİGA C, CORCUERA BD (2006). Effect of different thawing temperatures on the viability, in vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 mL straws. *Anim. Reprod. Sci.*; **92(1-2)**:145-154.

- CORREA JR, RODRIGUEZ MC, PATTERSON DJ ve ZAVOSP M (1996). Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*, **46**: 413-420.
- CORREA JR, PACE MM, ZAVOS PM (1997). Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, **48**: 721-731.
- CUMMINS JM ve WOODALL PF (1985). On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.*, **75**: 153-175.
- CURRY MR ve WATSON FB (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, **31**: 39-46.
- CURRY MR (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, **5**: 46-52.
- DADOUNE PJ, MAYAUX MJ, GUIHARD-MOSCATO ML (1988). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*, **20**: 211-217.
- DAI DH, QAZI IH, RAN MX, LIANG K, ZHANG Y, ZHANG M (2019). Exploration of miRNA and mRNA profiles in fresh and frozen-thawed boar sperm by transcriptome and small RNA sequencing. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**: 802.
- DAVID G, SERRES C, JOUANNET P (1981). Kinematics of human spermatozoa. *Gamete Res.*, **4**: 83-95.
- DE ANGELIS A, MANAGÒ S, FERRARA MA, NAPOLITANO M, COPPOLA G, DE LUCA AC (2017). Combined raman spectroscopy and digital holographic microscopy for sperm cell quality analysis. *J. Spectrosc.*, **2017**: 9876063.
- DELLAL İ, TAN S (2001). Türkiye’de süt sektörü ve sütçülük politikaları. *Tarım Ekonomisi Dergisi*, 27-39.
- DESAI N, SABANEKH E, KIM T, AGARWAL A (2010). Free radical theory of aging: Implication in male fertility. *Urology*, **75**: 14-19.
- DHAMI, AJ, SAHNI KL, MOHAN G, JANI VR (1996). Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology*, **46(1)**: 109-120.
- DI SANTO M, TAROZZI N, NADALINI M, BORINI A (2012). Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol.*, **12**: 854-837.
- DOBRIN N, ZAMFIRESCU S, COPREAN D, ANGHEL AH (2014). Effect of thawing time and temperature variation on the quality of frozen-thawed ram semen. *Romanian Biotechnol. Lett.*, **19(1)**: 8935-8940.

- DONNELLY ET, LEWIS SEM, MCNALLY JA, THOMPSON W (1998). In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil. Steril.*, **70**: 305-314
- DROBNIS EZ, CROWE LM, BERGER T, ANCHORDOGUY TJ, OVERSTREET JW, CROWE JH (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.*, **265**:432–437.
- DVORÁKOVÁ K, MOORE HDM, ŠEBKOVÁ N, PALEČEK J (2005). Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction*, **130**: 61–69.
- EID LN, LORTON SP, PARRISH JJ, (1994). Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol. Reprod.*, **51**: 1232–1237.
- EINSPANIER R, KRAUSE I, CALVETE JJ, TÖPFER-PETERSEN E, KLOSTERMEYER H, KARG H (1994). Bovine seminal plasma ASFP: Localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. *FEBS Lett.*, **344**: 61–64.
- ERDEMİR F, FIRAT F, GENÇTEN Y (2011). Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi. *Turk Urol. Sem.*, **2**: 11-17.
- ERIKSSON BM, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H (2000). Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat Packs and Maxi-straws. *Ani. Reprod. Sci.* **63(3-4)**: 205-220.
- ESMAEILI V, SHAHVERDI AH, MOGHADASIAN MH, ALIZADEH AR (2015). Dietary fatty acids affect semen quality: A review. *Andrology*, **3**: 450–461.
- EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, **210**: 1131–1133.
- FATTAH A, SHARAFI M, MASOUDI R, SHAHVERDI A, ESMAEILI V, NAJAFI A (2017). L-carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, **74**: 148–153.
- FERRARA MA, DE ANGELIS A, DE LUCA AC, COPPOLA G, DALE B, COPPOLA G (2016). Simultaneous holographic microscopy and Raman spectroscopy monitoring of human spermatozoa photodegradation. *IEEE J Sel Top Quant Electr.* **22**:27–34.
- FISHER PS, AINSWORTH L, FAIRFULL RW (1987). Evaluation of anew diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, **28**: 599–607.
- FITZPATRICK JL, MONTGOMERIE R, DESJARDINS JK, STIVER KA, KOLM N VE BALSHINE S (2009). Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**: 1128–1132.
- FITZPATRICK JL, LUPOLD S (2014). Sexual selection and the evolution of sperm quality. *Mol. Hum. Reprod.*; **20**: 1180–1189.
- FOOTE RH (2002). The history of artificial insemination: selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, **80**: 1–10.

- FULLER BJ (2004). Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters*, **25**: 375–388.
- GALANTINO-HOMER HL, VISCONTI PE, KOPF GS (1997). Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 39,59-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.*, **56**:707–719.
- GARCIA-HERREROS M, LEAL CL (2014). Sperm morphometry: a tool for detecting biophysical changes associated with viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia*; **46**: 820–822.
- GARCIA-VAZQUEZ FA, GADEA J, MATAS C, HOLT WV (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology*, **18**: 844–850.
- GARNER DL, JOHNSON LA, YUE ST, ROTH BL, HAUGLAND RP (1994). Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.*, **53**:276–284.
- GARNER DL, THOMAS CA, JOERG HW, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* **57**:1401–1406.
- GAO DY, LIU J, LUI C, MCGANN LE, WATSON PF, KLEINHANS FW, MAZUR P, CRITSER ES, CRITSER JK (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.*, **10**:1109–1122.
- GAO DY ve CRITSER JK (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Institute of Laboratory Animal Resources Journal*, **41**:187–196.
- GARRETT C, LIU DY, CLARKE GN, RUSHFORD DD, BAKER HW (2003). Automated semen analysis: “zona pellucida preferred” spermmorphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum. Reprod.*, **18**:1643–1649.
- GILLAN L, EVANS G, MAXWELL WMC (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, **63**:445– 457.
- GILLAN L, KROETSCH T, CHIS MAXWELL WM, EVANS G (2008). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, **103**: 201-214.
- GOMENDIO M VE ROLDAN ERS (1991). Sperm size and sperm competition in mammals. *Proc. Roy. Soc. London B.*, **243**: 181-185.
- GÖKÇEN H (2015). Türkiye’de Sun’i Tohumlamanın Tarihsel Gelişim Süreci. Erişim linki: <http://www.hazimgokcen.net/mesleki-tarih/turkiyede-suni-tohumlamanin-tarihsel-gelisim-sureci/>. Erişim tarihi: 30.05.2020.
- GRAHAM JK (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, **68**: 239–247.

- GRAVANCE CG, VISHWANATH R, PITT C, GARNER DL, CASEY PJ (1998). Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J. Androl.*, **19**: 704–709.
- GRAVANCE CG, CASEY ME, CASEY PJ (2009). Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. *Anim Reprod Sci*, 114: 81–8.
- GROTTER GL, CATTANEO L, MARINI PE, KJELLAND ME, FERRE LB (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, **54(4)**: 655-665.
- GUTHRIE HD, WELCH GR (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J. Anim. Sci.* **84**: 2089–2100.
- GÜNEY HO ve İLERİ IK (1991). Paillette yöntemine göre dondurulmuş boğa spermasının farklı ısı ve sürelerde eritilmesinin ve eritme sonrası düşük ısı uygulamalarının spermatozoitlerin motilite ve morfolojik yapıları üzerine etkisi. *I.U. Vet. Fak. Derg.*, **17**: 75-91.
- GÜRLER H, MALAMA E, HEPPELMANN M, CALISICI O, LEIDING C, KASTELIC JP (2015). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, **86**:562–71.
- HALLIWELL B, GUTTERRIDGE J (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, **1**:1396–1398.
- HAMMERSTEDT RH, GRAHAM JK, NOLAN JP (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.*, **11**: 73-88.
- HEZAVEHEI M, SAHARAFI M, KOUCHESFAHANI HM, HENKEL R, AGARVAL A, ESMAEILI V, SHAHVERDI A (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, **37(3)**: 327-335.
- HINGST O, BLOTTNER S, FRANZ C (1995). Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia*, **27**: 275–279.
- HIRANO Y, SHIBAHARA H, OBARA H, SUZUKI T, TAKAMIZAWA S, YAMAGUCHI C, TSUNODA H, SATO I (2001). Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J. Assist. Reprod. Gen.*, **18**: 215-220.
- HOLT WV (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, **53**: 47-58.
- HOLT WV, DEL VALLE I, FAZELI A (2015). Heat shock protein A8 stabilizes the bull sperm plasma membrane during cryopreservation: effects of breed, protein concentration, and mode of use. *Theriogenology*, **84**:693–701.
- İNANÇ ME, ÇİL B, TEKİN K, ALEMDAR H, DAŞKIN A (2018). The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turk J Vet Anim Sci*, **42**: 452-458.

- ISACHENKO E, GOHAR R, PETER M, RAUL S, ISACHENKO V (2002). Novel approaches to the cryopreservation of human spermatozoa: History and development of the spermatozoa vitrification technology. *J Reprod Stem Cell Biotechnol* **2**:128-145.
- ISACHENKO E, ISACHENKO V, KATKOV II, DESSOLE S, NAWROTH F (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: From past practical difficulties to present success. *Reprod. Biomed*, **6**:191–200.
- ISACHENKO E, RAHIMI G, MALLMANN P, SANCHEZ R, ISACHENKO V (2011). Novel approaches to the cryopreservation of human spermatozoa: history and development of the spermatozoa vitrification technology. *J Reprod Biotechnol Fertil.*, **2**:128-145.
- İLİLERİ İK ve AK K (1993). Payet yöntemine göre dondurulmuş boğa spermasının eritilmesinde eritme ısı ve sürelerinin spermatozoitlerin motilite ve akrozom yapıları üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Munich Ludwig-Maximilian Üniversitesi Veteriner Fakültesi Türk-Alman Günleri, 29-30 Nisan-Mayıs Tebliğler, 58-62.
- JANUSKAUSKAS A, JOHANNISON A, RODRIGUEZ-MARTINEZ H (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure and field fertility. *Theriogenology*, **60**: 743–758.
- JEYENDRAN RS VE GRAHAM EF (1980). An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa. *Cryobiology*, **17**: 458–464.
- JOBIM MI, OBERST E, SALBEGO C, SOUZA D, WALD V, TRAMONTINA F (2004). Twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, **61**:255–66.
- JOHN MORRIS, ACTON E, MURRAY BJ, FONSECA F (2012). Freezing injury: the special case of the sperm. *Cryobiology*, **64**: 71-80.
- JOHNSON LA, WELCH GR, RENS W (1999). The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *J. Anim. Sci.* **77**: 213.
- JOHNSTON SD, SATAKE N, ZEE Y, LÓPEZ-FERNÁNDEZ C, HOLT WV, GOSÁLVEZ J (2012). Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. *Reproduction*, **143**:787–97.
- JOTANOVIĆI S, JOVIĆIĆ M, SAVIĆI D, VEKIĆ M, BOSANČIĆ B, STANČIĆ I (2016). Impact of thawing temperature on quality parameters of bull's semen. VII International Scientific Agriculture Symposium “Agrosym 2016”.
- KARABINUS DS, EVENSON DP, KAPROTH MT (1991). Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *J. Dairy Sci.*, **74**: 3836–3848.

- KARABINUS DK, VOGLER CJ, SAACKE RG, EVENSON DP (1997). Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation in Holstein bulls. *J Androl.*; **18**: 549–555.
- KASHIR J, HEYNEN A, JONES C, DURRANS C, CRAIG J, GADEA J (2011). Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reprod. Biomed Online*, **23**:263–267.
- KATHIRAVAN P, KALATHARAN J, KARTHIKEYA G, RENGARAJAN K, KADIRVEL G (2011). Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reproduction in Domestic Animals*, **46** (1): 165-72.
- KATZ DF, JAMES W, OVERSTREET MD (1981). Sperm motility assessment by videomicrography. *Fertility and Sterility*, **35**:2.
- KEMPER B, VON BALLY G (2008). Digital holographic microscopy for live cell applications. *Appl. Opt.* **47**:53–61.
- KHALIL WA, EL-HARAIRY MA, ZEIDAN AEB, HASSAN MAE, MOHEY ELSAEED O (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, **6**: 49-56.
- KING LM, HOLSBERGER DR, DONOGHUE AM (2000). Correlation of casa velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in Turkeys. *J. Andro*, **21**: 65-71.
- KODAMA H, KURIBAYASHI Y, GAGNON C (1996). Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J. Androl.*, **17**:151–157.
- KOPEIKA J, THORNHILL A, KHALAF Y (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum. Reprod. Update*, **21**:209–27.
- LEWIS SEM, AITKEN RJ (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.*, **322**: 33–41.
- LI N, CHEN D, XU Y, LIU S, ZHANG H (2014). Confocal Raman micro-spectroscopy for rapid and label-free detection of maleic acid-induced variations in human sperm. *Biomed. Opt. Express.*, **5**: 1690–1699.
- LONERGAN P (2018). Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*, **12**: S1, 4–18.
- LUPOLD S, CALHIM S, IMMLER S, BIRKHEAD TR (2009). Sperm morphology and sperm velocity in passerinebirds. *Proc. R. Soc. B*, **276**: 1175–1181.
- LUPOLD S, FITZPATRICK JL (2015). Sperm number trumps sperm size in mammalian ejaculate evolution. *Proc. Biol. Sci.*; **282**: 2015-2122.
- LYASHENKO A (2015). Effect of different thawing procedures on the quality and fertility of the bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **4**(1): 17-21.

- MALDJIAN A, PIZZI F, GLIOZZI T, CEROLINI S, PENNY P, NOBLE R (2005). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, **63**: 411–421.
- MALO AF, GOMENDIO M, GARDE J, LANG-LENTON B, SOLER AJ, ROLDAN ERS (2006). Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* **2**: 246–249.
- MALO AF, GOMENDIO M, GARDE J, LANG-LENTON B, SOLER AJ, ROLDAN ERS (2006). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Biol. Lett.*, **2**: 246–249.
- MARCO-JIMENEZ F, VIUDES-DE-CASTRO MP, BALASCH S, MOCE E, SILVESTRE MA (2006). Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*; **52**: 295–304.
- MAROTO-MORALES A, RAMONA M, GARCIA-ALVAREZB O, SOLERA AJ, ESTESOC MC, MARTINEZ-PASTORD F, PEREZ-GUZMANB MD, GARDEA JJ (2010). Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology*, **73**: 437–473.
- MAZUR P (1970). Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, **168**: 939–94.
- MAZUR P, LEIBO SP, CHU EH (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research*, **71**: 345–355.
- MAZUR P (1977a). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, **14**: 251–272.
- MAZUR P (1977b). Slow-freezing injury in mammalian cells. In K. Elliott, & J. Whelan (Eds.), Ciba Foundation Symposium 52 - the freezing of mammalian embryos, **s**: 19–48.
- MCCARTHY MJ, BAUMBER J, KASS PH, MEYERS SA (2009). Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biol Reprod.*, **82**:644–51.
- MEDEIROS CM, FORELL F, OLIVEIRA AT, RODRIGUES JL (2002) Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology*, **57**:327–344.
- MEROLA F, MICCIO L, MEMMOLO P, DI CAPRIO G, GALLI A, PUGLISI R (2013). Digital holography as a method for 3D imaging and estimating the biovolume of motile cells. *Lab. Chip.*, **13**:4512.
- MERYMAN HT (1974). Freezing injury and its prevention in living cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, **3**: 341–363.
- MILARDI D, COLUSSI C, GRANDE G, VINCENZONI F, PIERCONTI F, MANCINI F (2018). Olfactory receptors in semen and in the male tract: from proteome to proteins. *Front. Endocrinol.*, **23**:379.
- MOCE E, FAJARDO AJ, GRAHAM JK (2016). Human sperm cryopreservation. *Eur Med J.*, **1**: 86-91.

- MORETTI E, SUTERA G, COLLODEL G (2016). The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic research. *Syst Biol. Reprod. Med.*, **62**:171–83.
- MORRIS G (2006). Rapidly cooled human sperm: No evidence of intracellular ice formation. *Hum. Reprod.*, **21**: 2075–2083.
- MORTIMER ST, MORTIMER D (1990). Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J. Androl.*, **11**:195–203.
- MORTIMER ST (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, **3**: 403-439.
- MOSCATELLI N, SPAGNOLO B, PISANELLO M, LEMMA ED, DE VITTORIO M, ZARA V (2017). Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential. *Sci. Rep.*, **7**:17931.
- MOURA AA, MEMILI E (2016). Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. *Anim. Reprod.*, **13**:191–199.
- NAGY S, JANSEN J, TOPPER EK, GADELLA BM (2004). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.*, **68**:1828–1835.
- NAIR SJ, BRAR AS, AHUJA CS, SANGHA SPS, CHAUDHARY KC (2006). A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim. Reprod. Sci.*, **96**: 21–29.
- NICOLAE D, STELA Z, DRAGOMIR C, ANDREEA HORTANSE A (2014). Effect of thawing time and temperature variation on the quality of frozenthawed ram semen. *Romanian Biotechnological Letters*, **19(1)**: 8935-8940.
- NOILES EE, BAILEY J, STOREY BT (1995). Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 48 and 08C. *Cryobiology*, **32**:220–238.
- NOSRATI R, DRIOUCHI A, YIP CM, SINTON D (2015). Two-dimensional slither swimming of sperm within a micrometre of a surface. *Nat. Commun.*; **6**: 8703.
- NUR Z (2001). Donmuş boğa spermasına uygulanan ısı farklılıklarının eritme sonrası oluşturulan soğuk şokuna etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- NUR Z, DOĞAN I, SOYLU MK, AK K (2003). Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue Med. Vet.*, **154(7)**: 487-490.
- OMBELET W, VAN ROBAYS J (2015). Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts Vis Obgyn*. **7**:137–43.
- ORTIZ-RODRIGUEZ JM, ORTEGA-FERRUSOLA C, GIL MC, MARTÍN-CANO FE, GAITSKELL-PHILLIPS G, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H (2019). Transcriptome

analysis reveals that fertilization with cryopreserved sperm downregulates genes relevant for early embryo development in the horse. *PLoS ONE*, **14**:e0213420

OSTERMEIER GC, MILLER D, HUNTRISS JD, DIAMOND MP, KRAWETZ SA (2004). Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, **429**:154.

OZKAVUKCU S, ERDEMLI E, ISIK A, OZTUNA D, KARAHUSEYINOGLU S (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **25**:403–11.

PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, GRAHAM JK (1999). In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology*, **51**: 461–472.

PAULENZ H, SÖDERQUİST L, ÅDNØY T, NORDSTOGA AB, GULBRANDSEN B, ANDERSEN BERG K (2004). Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitube and mini straws. *Theriogenology*, **61**: 1719-1727.

PENA A, LİNDE-FORSBERG C (2000). Effects of Equex, one-or-two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, **54**: 859-875.

PEREZ LJ, VALCARCEL A, DE LAS HERAS MA, MOSES D, BALDASSARRE (1996). Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, **46**: 131-140.

PHILLIPS PH, LARDY HA (1940). A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J Dairy Sci.* **23**:399–404.

PICKETT BW ve BERNDTSON WE (1974). Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: a review. *Journal of Dairy Science*, **57**: 1287–1308.

PURDY PH ve GRAHAM JK (2004). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, **48(1)**: 36-45.

ROBLES V, MARTÍNEZ-PASTOR F (2013). Flow cytometric methods for sperm assessment. *Methods Mol. Biol.*, **927**: 175–186.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H, LARSSON B, ZHANG B, SODERQUIST L, ZHANG BR (1997). In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J. Reprod. Dev.*, **43**:1–11.

ROMAROWSKI A, VELASCO FÉLIX ÁG, TORRES RODRÍGUEZ P, GERVASI MG, XU X, LUQUE GM (2018). Super-resolution imaging of live sperm reveals dynamic changes of the actin cytoskeleton during acrosomal exocytosis. *J. Cell Sci.*, **2018**: jcs.218958.

ROYERE D, HAMAMAH S, NICOLLE C, BARTHELEMY C, LANSAC J (1988). Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Fielgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res*, **21**: 51–57.

- SAACKE RG, WHITE JM (1972). Semen quality tests and their relationship to fertility. In: NAABProceedingsoftheFourthTechnical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, s: 22–27.
- SAID TM, GAGLANİ A, AGARVAL A (2010). İmplication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod. Biomed. Online.*, **21**: 456-462.
- SAILER BL, JOST LK, EVENSON DP (1996). Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, **24**: 167–173.
- SALAMON S VE MAXWELL WMC. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, **62**: 77-111.
- SALISBURY GW, FULLER HK, WILLETT EL (1941). Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *J Dairy Sci.* **24**:905–10.
- SATHANANTHAN AH (2013). Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: a personal survey. *Micron*, **44**:1–20.
- SENGER PL (1980). Handling frozen bovine semen-factors whichinfluence viability and fertility. *Theriogenology*, **13**: 51-62.
- SERRES C, FENEUX D, JOUANNET P, DAVID G (1984). Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res.*, **9**:183–195.
- SHAHANI SK, REVELL SG, ARGO CG, MURRAY RD (2010). Mid-piece Length of Spermatozoa in Different Cattle Breeds and its Relationship to Fertility. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **13(2)**: 802-808.
- SHIVAJI S, KOTA V, SIVA AB (2009). The role of mitochondrial proteins in sperm capacitation. *J. Reproduct. Immunol.*, **83**: 14-18.
- SI W, HILDEBRANDT TB, REID C, KRIEG R, JI W, FASSBENDER M, HERMES R (2006). The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *Theriogenology*, **65**: 788–798.
- SIEME H, OLDENHOF H, WOLKERS WF (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim. Reprod. Sci.*, **169**: 2-5.
- SNOECK PPN (2003). Aspects of equine sperm cryopreservation: dilutor medium composition, cryopreservation curves and fertility [dissertation]. *Belo Horizonte (MG): Federal University of Minas Gerais*, s: 11.
- SUAREZ SS (2016). Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.*; **363**: 185–194.
- ŞEREFÖĞLU EC (2011). Bilgisayar yardımlı sperm analizi. *Turk Urol. Sem.*, **2**: 8-10.
- TEKİN K (2017). Ankara Tekesi sperması dondurulmasında polivinil alkolün spermatozoa canlılığı ve fonksiyonu üzerine etkisi. Doktora tezi, s: 72-73.

- TEPEREK M, SIMEONE A, GAGGIOLI V, MIYAMOTO K, ALLEN GE, ERKEK S (2016). Sperm is epigenetically programmed to regulate gene transcription in embryos. *Genome Res.*, **26**:1034–46.
- THURSTON LM, WATSON AJ, MILEHAM AJ, HOLT WV (2001). Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculate correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.*, **22**: 383–394.
- TOSIC J (1947). Mechanism of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of amino-acids in sperm motility. *Nature*, **159**:544.
- TOURMENTE M, GOMENDIO M, ROLDAN ER (2011). Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evol. Biol.*; **11**: 12.
- TRINCHERO GD, AFFRANCHINO MA, SCHANG LM, BECONI MT (1990). Antioxidant effect of bovine spermatozoa on lipid peroxidation. *Comp. Biol.*, **8**:339–350.
- UGUR MR, ABDELRAHMAN AS, EVANS HC, GILMORE AA, HITIT M, ARIFANTINI R, PURWANTARA B, KAYA A, MEMILI E (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Front. Vet. Sci.* **6**: 268
- VALCARCE DG, CARTÓN-GARCÍA F, HERRÁEZ MP, ROBLES V (2013). Effect of cryopreservation on human sperm messenger RNAs crucial for fertilization and early embryo development. *Cryobiology*, **67**:84–90.
- VARISLI O, SCOTT H, AGCA C, AGCA Y (2013). The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm. *Cryobiology*, **67**: 109-116.
- VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M AND ONCLIN K (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, **57 (1)**: 149- 79.
- VISHWANATH R ve SHANNON P (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, **62**: 23-53.
- VISHWANATH R (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* **59**: 571-584.
- WARDMAN P (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol. Med.* **43**: 995–1022.
- WALKER JS, WINET H, FREUND M (1982). A comparison of subjective and objective sperm motility evaluation. *J. Androl.*, **3**: 184-192.
- WALTERS EM, BENSON JD, WOODS EJ, CRITSER JK (2009). The History of Sperm Cryopreservation Importance of Sperm Cryopreservation. Cambridge University Press, s: 1-17.

- WANG P, WANG YF, WANG H, WANG CW, ZAN LS, HU JH (2014). HSP90 expression correlation with the freezing resistance of bull sperm. *Zygote*, **22**: 239–245.
- WATSON PF VE MARTIN, ICA (1973). The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5 or -196°C. *Aust. J. Biol. Sci.*, **26**: 927-35.
- WATSON PF, AND MARTIN ICA (1975). The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5OC. *Aust. J. Biol. Sci.*, **28**: 145-52.
- WATSON PF (1995). Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Domest Anim.* **31**:135–40.
- WATSON PF (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, **60-61**: 481-492.
- WHITE IG (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, **5**:639–658.
- WOELDERS H (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart.* **19**:135-138.
- YESTE M (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, **85** :47–64.
- YILMAZ N ve YURDAYDIN N (1993). Değişik süre ve ıslarda çözülmüş boğa spermalarının akrozom yapısı ve döl verimi üzerine etkisi. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, **33(1-2)**: 20-27.
- ZHANG XG, HU S, HAN C, ZHU QC, YAN GJ, HU JH (2015). Association of heat shock protein 90 with motility of post-thawed sperm in bulls. *Cryobiology*, **70**:164–9.
- ZHANG Y, DAI D, CHANG Y, LI Y, ZHANG M, ZHOU G (2017). Cryopreservation of boar sperm induces differential microRNAs expression. *Cryobiology*, **76**: 24–33.
- ZIELONKA J, VASQUEZ-VIVAR J, KALYANARAMAN B (2008). Detection of 2 hydroxyethidium cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat. Protoc.* **3**: 8–21.
- ZINAMAN MJ, UHLER ML, VERTUNO E, FISHER SG, CLEGG ED (1996). Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J. Androl.*, **17**:288-92.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Ayşe
Soyadı : DEMİRHAN
Doğum yeri ve tarihi : Kırıkkale / 25.11.1988
Uyruğu : T.C
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Ankara 0546 421 24 13

II- Eğitimi

2012- 2020 : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Doktora Programı/Ankara
2006 – 2012 : Ankara Üniversitesi Veteriner
Fakóltesi/Ankara
2002 – 2006 : Atatürk Anadolu Lisesi / Kırıkkale

2000 –2002 : Atatürk Ortaokulu / Kırıkkale
1996 – 2000 : Atatürk İlkokulu / Kırıkkale
Yabancı dil : İngilizce

III- Ünvanları

2012 : Veteriner Hekim

IV- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

1. Reprodüksiyon Suni Tohumlama ve Bilim Derneği, 2013

V- Bilimsel İlgi Alanları

Makaleler

1. DEMİRHAN AYŞE, TEKİN KORAY, DAŞKIN ALİ, UYSAL ONGUN (2020). Assesment of Morphological features of bull semen thawed at various temperatures and periods of time with CASA. Kocatepe Vet. J., 13(3), 286-293.

Sözlü Bildiriler

1. DEMİRHAN A, DAŞKIN A, (2013). Progesteron sponj ile senkronize edilen Ankara Keçilerinde tohumlama sonrası tekrar uygulanan progesteron sponjların gebelik oranlarına etkisi. VII Ulusal Reprodüksiyon ve Bilim Kongresi (Uluslararası katılımı) 1-4 Temmuz 2013, Kars.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler:

1. Farklı sıcaklık ve sürelerde çözdürülen dondurulmuş boğa spermalarının CASA parametreleri ile değerlendirilmesi. BAP 18L0239010, BÜTÇE: 29.449,00 Araştırmacı

Katıldığı Çalıştaylar:

1. Koyunlarda Laparoskopik Suni Tohumlama (2013, Kars).

VIII- Diğer Bilgiler

A. Aldığı Kurslar:

Sığırlarda Recto-Vaginal Metolla Suni Tohumlama Kursu 17-21 Haziran 2013, Ankara (Kursiyer).

Küçük Ruminantlarda Laparoskopik İntrauterin Suni Tohumlama Workshop 1-4 Temmuz 2013, Kars (Kursiyer).

BD Accuri C6 Flow Sitometri Çalıştayı 19 Mart 2014, Ankara (Kursiyer)

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası: Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi 16-25 Haziran 2014, Ankara (Kursiyer).

TS EN ISO/IEC 17025:2017'e Ait İç Denetçi Eğitimi 17 Şubat 2020, Ankara (Kursiyer)

B. Üniversite Dışı Deneyim

1. 2019-Halen Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Tüberkülin ve Mallein Üretim Laboratuvarı, Veteriner Hekim
2. 2014-2019 Kızılırmak İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Veteriner Hekim
3. 2013-2014 Kırıkkale İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Veteriner Hekim
4. 2011-2011 Pet Hospital Hayvan Hastanesi, Veteriner Öğrenci, (Ticari (Özel))
5. 2011-2011 Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi, Stajyer
6. 2010-2010 Hannover Suni Tohumlama Laboratuvarı, Stajyer