



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**AYGIR SPERMASI DONDURULMASINDA
SULANDIRICIYA EKLENEN SPERMİN VE SPERMİDİN'İN
ÇÖZÜM SONU SPERMATOLOJİK PARAMETRELER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Kemal Tuna OLĞAÇ

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

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ergun AKÇAY**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AYGIR SPERMASI DONDURULMASINDA
SULANDIRICIYA EKLENEN SPERMİN VE
SPERMİDİN'İN
ÇÖZÜM SONU SPERMATOLOJİK PARAMETRELER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Kemal Tuna OLĞAÇ

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

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ergun AKÇAY**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun
17H0239003 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2019**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Aygır Sperması Dondurulmasında Sulandırıcıya Eklenen Spermin ve Spermidin’in Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Kemal Tuna Olğaç
07. 03. 2019
İmza

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda Kemal Tuna OLĞAÇ tarafından hazırlanan “Aygır Sperması Dondurulmasında Sulandırıcıya Eklenen Spermin ve Spermidin'in Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07.03.2019

İmza
Prof. Dr. Ergun AKÇAY
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Ongun UYSAL
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof. Dr. M. Rıfat VURAL
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Muzaffer TAŞ
Namık Kemal Üniversitesi
Üye

İmza
Doç. Dr. Deniz YENİ
Kocatepe Üniversitesi
Üye

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

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Atların Temel Reprodüktif Özellikleri	4
1.2 Aygırlarda Reprodüktif Anatomi	8
1.3 Aygırlarda Reprodüktif Fizyoloji	15
1.4 Aygırlarda Sperma ve Ejakülasyon	17
1.5 Aygır Spermasının Dondurulması	20
1.6 Poliaminler	23
1.6.1 Poliaminlerin Reprodüksiyon Alanındaki Görev ve Etkileri	25
2. GEREÇ ve YÖNTEM	29
2.1 Hayvan Materyali	29
2.2 Spermanın Dondurulması	30
2.3 Çözüm Sonu Spermatolojik Analizler	31
2.3.1 Motilite, Progresif Motilite ve Spermatozoon Hareket Özellikleri	31
2.3.2 Anormal Spermatozoon Oranı	32
2.3.3 DNA Fragmentasyon İndeksi	33
2.3.4 Plazma Membran Bütünlüğü ve Akrozom Sağlamlığı	34
2.3.5 Kapasitasyon İndeksi	36
2.4 İstatistiksel Analiz	37
3. BULGULAR	39
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
ÖZET	60
SUMMARY	61
KAYNAKLAR	62
EKLER	72
Ek-1. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı	72
ÖZGEÇMİŞ	74

ÖNSÖZ

İlk defa Orta Asya bozkırlarında avcılık ve toplayıcılık yaparak yaşamlarını sürdüren Türk kavimleri tarafından, M.Ö. 4 bin yıllarında evcilleştirildiği ve insanlık tarihinde evcilleştirilen ilk hayvanlardan biri olduğu bilinen at; gücü, hızı ve dayanıklılığıyla ilk çağlardan beri insan yaşamının vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Atın evcilleştirilmesiyle avcı-toplayıcı yaşamdan atlı göçebe hayat tarzına geçen insanoğlu, yaşadığı bölgenin iklim ve besin kaynaklı olumsuzluklarından kurtulmanın yolunu bulmuş, göç eden hayvan sürülerini takip ederek yeni yerler keşfetmiş, ürettiği bilgi ve beceriyi keşfettiği bölgelerde yaşayan topluluklarla paylaşarak kavimler arası sosyal, ekonomik ve siyasi değerleri geliştirmiştir. Yerleşik hayatı benimseyen toplumların kültürlerinde de kendine özel bir yer bulan at, medeniyetin temellerini atacak gelişmelerin ortaya çıkmasında önemli rol oynamıştır. Tarım ve hayvancılık alanında, geniş otlakların uzak su kaynaklarının hızla dolaşılabilmesi sayesinde atlı çoban kültürüne sahip toplumların bu alanda daha hızlı gelişmesini sağlamıştır. Ulaşım ve haberleşme aracı olarak atı kullanan toplumlar bu sayede mesafe ve zaman engelinin üstesinden gelmeyi başarmıştır. Savaş alanlarında orduların birbirlerine karşı üstünlüklerini kıyaslamak için atlı birliklerinin büyüklüğü önemli bir ölçüt olarak kullanılmıştır.

Tarihte at hakkında rastlanmış en eski kaynak, Arap Yarımadası'nda bulunan mağara duvarlarına çizilmiş M.Ö. 2500'lü yıllara ait at figürleridir. Bu nedenle dünyanın en eski at ırkının Arap atı olduğu kabul edilmektedir. Günümüzde dünya üzerinde yetiştirilen neredeyse tüm sıcakkanlı at ırklarında Arap atına ait DNA kalıntılarının bulunması da tarihi kayıtlarla ortaya çıkartılmış bu bilgiyi farklı bir açıdan desteklemektedir. Fakat hem çöl iklimine uygun olmaması hem de benzer mağara figürlerinin Kuzey Mezopotamya ve Kafkasya'da da bulunması, atın Arap Yarımadası'na başka bir yerden, özellikle de batıya göç eden Türkler tarafından Orta Asya'dan getirildiğini düşündürmektedir. Kökeni ne olursa olsun Arap atının safkan bir at ırkı olmasında ve bugünkü şöhretine kavuşmasında Arap Yarımadası'ndaki at kültürünün, sevgisinin ve yetiştiricilik tekniklerinin büyük önemi bulunmaktadır.

Arap atı, eski zamanlarda Arap Yarımadası'ndaki kavimler arasında zenginliğin ve asaletin göstergesi olmuş, bir kişinin sahip olduğu atlar ne kadar safkan olursa o oranda zengin ve soylu olduğu kabul edilmiştir. Bu düşünce nedeniyle at sahipleri arasında gelişen safkan Arap atı yetiştirme yarışı, bugünkü adıyla “ıslah” olarak bilinen yetiştirme tekniğini ortaya çıkarmıştır. Bu yarışta, sahip olduklarından daha değerli at soylarını kendi sürülerine katmak isteyen Arap atı sahipleri, değerli aygırlardan yaralanmak istemiş; sahip olamayacakları aygırların spermalarını elde ederek kendi kısraklarına nakletmek yoluyla “suni tohumlama”yı keşfetmişlerdir. Tarihte ilk defa Arap atı yetiştiriciliğinde 14. yüzyılın başlarında kullanılan bu ilkel suni tohumlama yönteminin keşfiyle reproduktif biyoteknolojinin ilk adımları atılmıştır. Ne yazık ki reproduktif teknolojinin doğuşunda bu kadar etkisi olan at, günümüzde bu teknolojinin uygulanmasında en çok sorun yaşanan hayvan türülerinden biridir.

Gerek dişlerinde gerekse erkeklerinde olsun atların kendilerine özgü özellikleri, reproduktif biyoteknolojik uygulamaların yeterli sayılabilecek başarıya ulaşmasının önündeki en büyük engeldir. Yaklaşık 300 yıl önce kullanılmaya başlanan spermanın dondurulması ve uzun süreli saklanması teknolojisi, bugün birçok hayvan türünde gelişimini tamamlamış olsa da aygır sperması dondurulması işleminin geliştirilmeye çalışılması hala güncelliğini koruyan bir araştırma sahasıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar bilim insanlarını, aygır spermasının dondurulmasında bireysel farklılıkların ve aygır spermatozoonuna ait yapısal özelliklerin belirleyici olduğu sonucuna ulaştırmıştır. Aygır spermatozoonuna ait ve dondurma işlemine karşı hassas olan yapısal özelliklerine uygun, bu işlemin zararlı etkilerinden mümkün olan en yüksek seviyede koruyabilecek maddeleri içeren bir sulandırıcı geliştirilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmada bu soruna bir çözüm yolu aranmış; hayvan ve insan spermatozoonu üzerindeki etkisi bilinen Spermin ve Spermidin adlı poliaminler ilk defa aygır sperması dondurulmasında standart sulandırıcıya eklenerek çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerine etkisi araştırılmıştır.

Bu araştırma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun “Aygır Sperması Dondurulmasında Sulandırıcıya Eklenen Spermin ve Spermidin'in

Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi” başlıklı ve 17H0239003 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Doktora öğrenimim boyunca, akademik yaşantımda ve çalışmalarımnda sahip olduğu tüm bilgi, beceri ve tecrübesiyle bana destek olan, yol gösteren danışmanım sayın Prof. Dr. Ergun AKÇAY’a; doktora öğrenimimdeki ilk danışmanım sayın Prof. Dr. Necmettin TEKİN’e; bana akademik hayatı öğreten, sevdiren gayriresmi danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Borga TIRPAN’a; tez çalışmam boyunca emeklerini ve yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Beste ÇİL ve Vet. Hek. Mustafa Oğuzhan ŞAHİN’e; bu tez çalışmasının tamamlanmasında ve metin halini almasında fikir ve yorumlarıyla katkı sağlayan Vet. Hek. Büşra GÜNBÜKÜ’ye; Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’nın tüm akademik ve idari personeline; her zaman beni destekleyen, varlıklarını her adımda yanımda hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
(M x D) _{ij}	Madde ve doz etkileşimi
<	Küçüktür
>	Büyüktür
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
10 ⁶	Milyon
10 ⁹	Milyar
ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
ACS	Agarose Cell Support
ALH	Yalpalama büyüklüğü
ATP	Adenozin Trifosfat
BCF	Kesişim frekansı
BSL	Base Lysis Solution
C	Santigrat
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik Adenozin Monofostaf
CASA	Bilgisayar destekli sperma analizi
Cl	Klor
cm	Santimetre
°	Derece
D _j	Doz etkisi
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
e _{ijk}	Hata terimi
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
µ	Genel ortalama
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
Hz	Hertz
Ig A	İmmünoglobülin A

Ig E	İmmünoglobülin E
Ig G	İmmünoglobülin G
Ig M	İmmünoglobülin M
K	Potasyum
LH	Lüteinleştirici Hormon
LIN	Çizgisellik
m	Metre
M.Ö.	Milattan önce
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
M _i	Madde etkisi
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
Na	Soydum
ODC1	Ornitin dekarboksilaz
P	Fosfor
PBS	Fosfatlı tampon solüsyon
pH	Hidrojen gücü
PMOT	Progresif motilite
PRL	Prolaktin
RA	Reducing Agent
RNA	Ribonükleik Asit
SAT1	Asetiltransferaz
SCA [®]	Sperm Class Analyzer
sn	Saniye
Sp	Spermin
Spd	Spermidin
STR	Doğrusallık
TİGEM	Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü
TJK	Türkiye Jokey Kulübü
TMOT	Total motilite
VAP	Ortalama yol hızı

VCL	Eğri-çizgisel hız
VSL	Doğru-çizgisel hız
WOB	Yalpalama
Y_{ijk}	Bağımlı değişken
Zn	Çinko

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Günümüzde farklı kullanım alanlarında at fotoğrafları	2
Şekil 1.2. Aygırlarda kan plazmasında bulunan FSH'nın 9 aylık değişim grafiği	6
Şekil 1.3. Aygırlarda kan plazmasında bulunan LH'nın 9 aylık değişim grafiği	6
Şekil 1.4. Aygırlarda kan plazmasında bulunan Testosteronun 9 aylık değişim grafiği	7
Şekil 1.5. Penis, prepişyum ve çevre dokulara ait longitudinal kesit görüntüsü	10
Şekil 1.6. Testis, skrotum ve penisin vertikal kesit görüntüsü	13
Şekil 1.7. Aygırlarda eklenti bezleri	15
Şekil 1.8. Putresin, Spermidin ve Spermin adlı poliaminlerin moleküler yapıları	23
Şekil 1.9. Poliamin biyosentez metabolizması	25
Şekil 2.1. Çalışma sırasında aygırlardan sperma alınması işlemi	29
Şekil 2.2. Çözüm sonu aygır spermasının CASA ile motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket özelliklerinin analizi	32
Şekil 2.3. Çözüm sonu aygır spermasının CASA ile Anormal Spermatozoon Oranı analizi	33
Şekil 2.5. Çözüm sonu aygır spermasının FITC/PNA/PI floresan boyama yöntemiyle Plasma Membranı - Akrozom Bütünlüğü ve Canlılık analizi	34
Şekil 2.6. Çözüm sonu aygır spermasının CTC floresan boyama yöntemiyle Kapasitasyon indeksi analizi	35
Şekil 2.7. Çözüm sonu aygır spermasının CASA ile DNA fragmentasyon indeksi analizi	37

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Yıllara göre Dünya ve Türkiye at varlıkları	3
Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye’de kayıtlı at sayıları	4
Çizelge 2.1. Kontrol ve deney grubu sulandırıcılarının bileşenleri	30
Çizelge 3.1. Taze aygır sperması temel spermatolojik özellikleri	39
Çizelge 3.2. Kontrol ve deney gruplarına ait çözüm sonu motilite ve progresif motilite bulguları	40
Çizelge 3.3. Kontrol ve deney gruplarına ait çözüm sonu çizgisel hareket parametreleri bulguları	40
Çizelge 3.4. Kontrol ve deney gruplarına ait çözüm sonu doprusal ve hiperaktif hareket özellikleri bulguları	41
Çizelge 3.5. Kontrol ve deney gruplarına ait çözüm sonu anormal, plazma membran bütünlüğü, kapasitasyonindeksi, akrozom reaksiyonu ve DNA fragmentasyon indeksi oranları	43

1. GİRİŞ

At, Atgiller (Equidae) familyasına dâhil otçul, memeli bir hayvandır. Erkeği aygır, dişisi kısırak olarak adlandırılmaktadır. İnsan elinde yetiştirilen ve çeşitli işlerde kullanılan evcil atlar olduğu gibi, Amerika bozkırlarında Mustang ve Altay dağlarının her iki yanındaki açık arazilerde Prezevalski denen yabani atlar sürüler halinde yaşamaktadırlar. Anadolu'da da tabiatta serbest olarak dolaşan ve özel bir ırk olmamakla birlikte yolkı adı verilen yarı evcil atlar bulunmaktadır. Bugün bilinen 170 adet at ırkı olmakla beraber Arap, İngiliz, Macar Nonius, Haflinger ve Hannover yetiştirilmesine önem verilen at ırklarındandır. Atın canlılar âlemindeki yeri şu şekildedir:

Âlem:	Animalia (Hayvanlar)
Şube:	Chordata (Omurgalılar)
Sınıf:	Mammalia (Memeliler)
Alt sınıf:	Eutheria
Üst takım:	Laurasiatheria
Takım:	Perissodactyla (Tek tırnaklılar)
Familya:	Equidae (Atgiller)
Cins:	Equus
Tür:	E. ferus
Alt tür:	E. f. Caballus (At) (Anonim, 2018a)

At, insanoğlunun ilk evcilleştirdiği hayvanlardandır. Atın M.Ö. 4000 yıllarında Türkler tarafından evcilleştirildiği, insanlık tarihinde meydana gelen bu gelişme ile atlı çoban kültürünün ortaya çıktığı ve medeniyetin bugüne gelmesinde Türklerin bu buluşunun büyük yeri olduğu bilinmektedir (Yılmaz, 2012). Sadakati, gücü ve dayanıklılığı sayesinde at, evcilleştirildiği günden bu yana insan yaşamının önemli bir parçası olmuştur (Çebi, 2013).

Geçmişte atların gücünden, etinden ve sütünden yararlanılmıştır (Çebi, 2013). Atlar 20. yüzyılda mekanizasyonun ilerlemesi ve motorlu taşıtların yaygın olarak kullanılmaya başlamasına kadar en önemli ulaşım, savaş ve tarım aracı olarak kullanılmıştır (Yılmaz, 2012). Fakat zaman içinde insanların atlardan yararlanma alanları farklılaşmış ve günümüzde atıcılık çoğunlukla koşu ve engel yarışlarının ağırlıkta olduğu büyük bir sektör haline gelmiştir (Çebi, 2013).

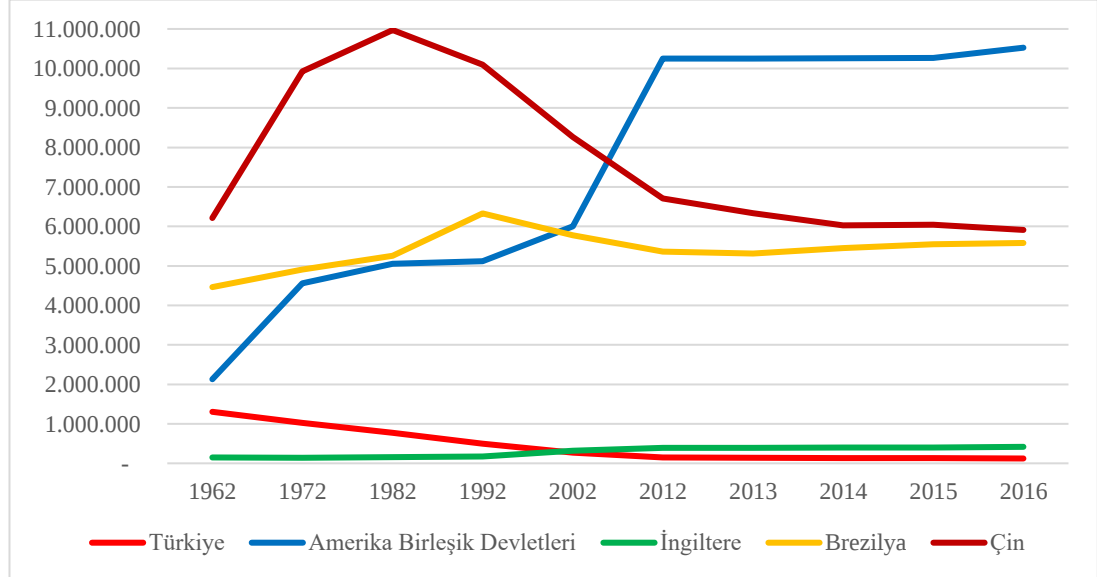


Şekil 1.1. Günümüzde farklı kullanım alanlarında at fotoğrafları.

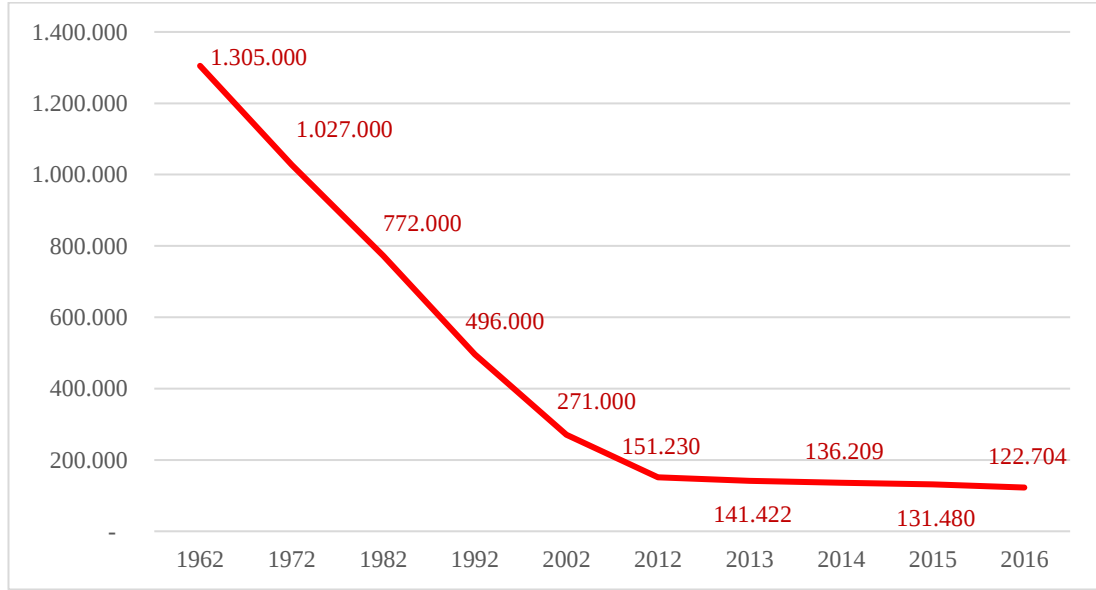
Osmanlı döneminde at, başta ordu olmak üzere pek çok alanda kullanılmış, Çifteler, Sultansuyu ve Çukurova haraları yine bu dönemde kurulmuştur. Fakat dönemin imkânsızlıkları nedeniyle bu haralar işleyişlerine ara vermek zorunda kalmışlardır. Cumhuriyet döneminde at yetiştiriciliğinin yeniden hayata döndürülmesi amacıyla bugünkü adıyla Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM) bünyesinde ilk olarak Karacabey harasının kurulmasını (1924), Sultansuyu (1930), Çifteler (Anadolu) (1934), Konya (1934-1957) ve Çukurova (1935-1979) haraları izlemiştir. Daha sonra Karaköy (1949-1971) ve Altındere (1950-1982) haraları açılmıştır. Cumhuriyet döneminde kurulan 7 harayla at yetiştiriciliğine hızlı bir giriş yapılmış olsa da bu haralardan Karacabey (447 baş), Sultansuyu (390 baş) ve Anadolu (383 baş) olmak üzere yalnızca 3'ü günümüzde işlevlerine devam etmektedir. At yetiştirilmesi amacıyla bu haralara ilk olarak Arap, İngiliz, Yerli Anadolu, Percheron, Hannover,

Anglo-Norman, Orlof, Nonius ve Haflinger ırkı getirilmiş; bunlardan Arap, İngiliz, Yerli Anadolu, Nonius ve Haflinger ırkları damızlık olarak kullanılmıştır. Konkur atı yetiştirilmesi amacıyla Macaristan'dan getirilen Nonius atının, saf ve yarım kan şeklinde yetiştiriciliği yapılmış, 1941 yılında Nonius, Arap ve Karacabey atlarının melezlenmesiyle konkura uygun bir kombinasyon oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalara 1962 yılında Karacabey Atı ve Karacabey Noniusları ile tekrar hız kazandırılmış, ancak 1970 yılında durdurulmuştur. Haflinger yetiştiriciliği, hem bakım ve yönetim kolaylığı, hem de güçlü olması açısından çok yönlü kullanıma uygun bir iş ve binek hayvanı olarak 1961 yılında başlatılmış, 1995 yılına kadar sürdürülmüştür. Günümüzde sadece gen kaynağı olarak az sayıda Haflinger atı muhafaza edilmektedir. İşletmede 1928 yılında İngiliz atı yetiştiriciliğine başlanmış, 1981 yılında son verilmiştir. İngiliz ırkı atların yetiştirilmesi ise başta Türkiye Jokey Kulübü (TJK) olmak üzere özel işletmeler tarafından sürdürülmektedir (Anonim, 2018b, Yener ve ark., 2006).

Çizelge 1.1. Yıllara göre Dünya ve Türkiye at varlıkları (FAO, 2018).



Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye’de kayıtlı at sayıları (FAO, 2018).

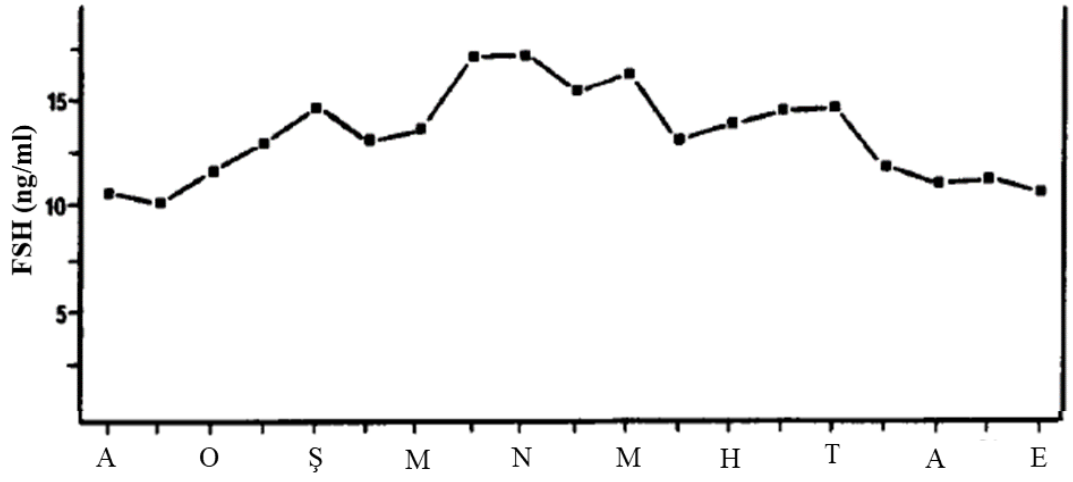


Tarihinde ve kültüründe bu kadar önemli bir yeri olmasına karşın, Türkiye’nin at varlığının giderek düşmesinin nedeni atların çiftlik hayvanı kimliğinden uzaklaşıp günümüzde çoğunlukla koşu ve gösteri amaçlı kullanılmasına bağlı olarak atçılığın masraflı ve bir o kadar pahalı bir uğraş haline gelmesidir. Türkiye’deki mevcut sosyo-ekonomik durum göz önüne alındığında da at varlığındaki azalış normal karşılanmaktadır.

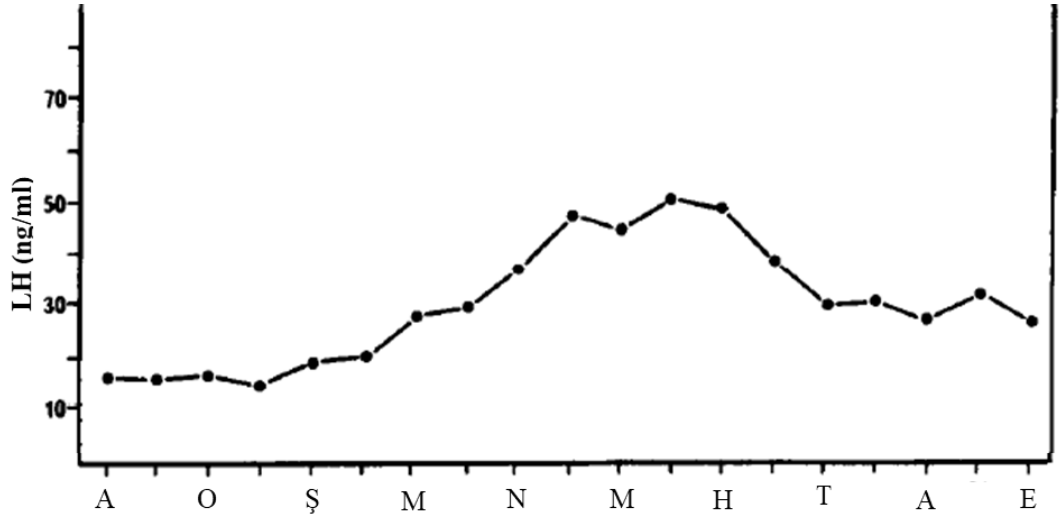
1.1 Atların Temel Reprodüktif Özellikleri

Atlar cinsel olgunluğa 12-24 aylık yaşlarda, yetiştirme olgunluğuna ise 24-60 aylık yaşlarda ulaşırlar. Atlar için tavsiye edilen ilk yetiştirme yaşı ise 3 yaş civarındır. Atlarda reprodüktif aktivite mevsimsel olarak, günlerin uzamaya başladığı mevsimlerde gelişir (Sönmez, 2007). Gün ışığına maruz kalma süresinin artmasıyla melatonin salınımının azalması; bu hormonun gonadotropik hormonlar üzerindeki baskısının ortadan kalkmasını ve dolayısıyla cinsel aktivitenin başlamasını sağlamaktadır. Atlarda cinsel aktivite Nisan-Haziran ayları arasında yoğun olarak gözlemlense de bu dönem Aralık ayından Eylül ayına kadar uzayan bir zaman dilimine

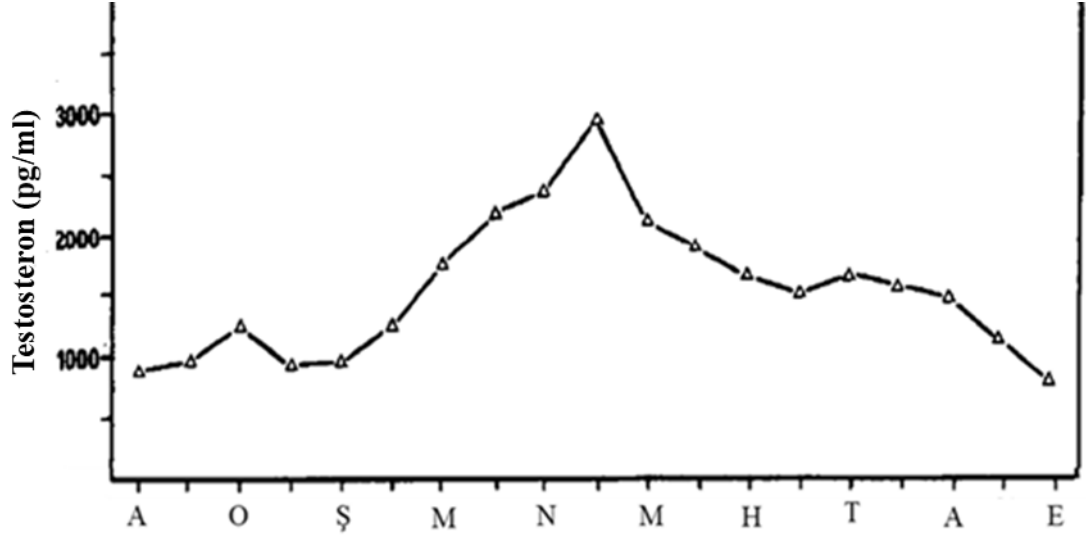
yayılma göstermektedir. Mevsime bağılı seksüel aktivite belirgin olarak kısıraklarda gözlemlenmektedir. Kısıraklar, aşım sezonu olarak adlandırılan bu dönem içerisinde gebe kalmadıkları sürece 21-22 günde bir kızgınlık göstermektedirler. Bu süre aşım sezonunun başlangıç ve bitiş dönemlerinde düzensizleşir, aşım sezonu dışında ise kısırakların anovulatör reproduktif özellik gösterdiği bilinmektedir (İleri ve ark., 2008). Aygırlarda da kısıraklarda olduğu gibi cinsel aktivite gün ışığı ve mevsime bağılı olarak değişkenlik gösterse de reproduktif faaliyetler yıl boyu devam etmektedir. Ancak reproduktif sistemle ilişkili tüm dokular ve eklenti bezlerinin sekretör aktivitesi endokrin kontrol altında olduğundan aygırlarda da reproduktif açıdan mevsime bağılılık söz konusudur (Katila ve Kareskoski, 2006). Gün ışığı süresindeki artış reproduktif hormon salınımını, testis büyüklüğü, sperm üretimi ve libidodaki değişiklikleri olumlu yönde etkilemektedir (Küçük, 2005). Testis boyutları ve dokusunda bulunan destek hücreleri ve germinatif hücrelerin sayısında da mevsime bağılı değişkenlik olmaktadır. Bu hücrelerin sayısı çiftleşme sezonunun başlangıcı olan ilkbahar aylarında artmaya başlar ve Mayıs-Haziran aylarında en yüksek seviyesine ulaşır. Temmuz ayından sonra tekrar düşmeye başlar ve bir dahaki aşım sezonuna kadar bazal seviyede kalır. Hormonal regülasyonda da çiftleşme sezonunda serum FSH, LH, Prolaktin ve Tetosteron seviyelerinde belirgin bir artış gözlenmektedir (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 101). Çiftleşme sezonu dışında ise aygırlarda spermatozoon üretiminde belirgin bir düşüş gözlene de reproduktif hormonların bazal seviyede üretimi ve salgılanması azoospermi gelişimini engellemektedir.



Şekil 1.2. Aygırlarda kan plazmasında bulunan FSH'nın 9 aylık değişim grafiği (Harris ve ark., 1983).



Şekil 1.3. Aygırlarda kan plazmasında bulunan LH'nın 9 aylık değişim grafiği (Harris ve ark., 1983).



Şekil 1.4. Aygırlarda kan plazmasında bulunan testosteronun 9 aylık değişim grafiği (Harris ve ark., 1983).

Mevsime bağlı olarak belli dönemlerde seksüel aktivite gösteren aygırların ejakülatlarında, seminal plazma kompozisyonu ve miktarında mevsimsel farklılık görülmektedir (Gebauer ve ark., 1976). Yapılan çalışmalarda en düşük sperma hacmi ve yoğunluk kış aylarında gözlemlenmiştir. Motilite değerleri yaz aylarında en yüksek değerlerde seyrederken en düşük motilite değeri kış aylarında elde edilmiştir. Normal spermatozoon oranının en yüksek olduğu ve majör anomalilerin, akrozom ve DNA defektlerinin en az görüldüğü dönem ilkbahar dönemi olarak kaydedilmiştir. Canlı spermatozoon oranı ise kış mevsiminde en düşük değerlerdeyken diğer mevsimlerde benzerlik göstermektedir (Augusto ve ark., 1997; Janett ve ark., 2003; Jasko ve ark., 1990). Sezon içi spermatolojik değerlerin aygırın aşım sayısı, sıklığı ya da aygırın bireysel performansına göre değişkenlik gösterdiği görülse de sezon dışı değerlerden daha düşük olmadığı belirtilmiştir. Sezon içi en yüksek spermatolojik değerler ise yaz ve sonbahar aylarında ölçülmüştür (Jasko ve ark., 1990; Johnson, 1991).

At yetiştiriciliğinin amaçlarından bir tanesi atların soylarının devam ettirilmesi, özellikleri açısından seçilmiş damızlıkların, ortalama 336 gün süren gebeliğin sonunda doğan sağlıklı yavrularının alınabilmesidir. Bu amaç doğrultusunda sürülerin istenmeyen özellikler yönünden ıslah edilmesi, istenen özelliklerin devamlılığının

sağlanması için hedeflenen yılda bir yavru beklentisinin %50-60 oranında elde edilmesi başarılı bir yetiştiriciliğin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Hayvan yetiştiriciliğinde genetik ıslah hem erkeklere, hem de dişilere uygulanmakla birlikte verimlerin genetik aktarımında en önemli pay, damızlık değeri yüksek erkeklerdedir. Çünkü bir dişiden yılda yalnız bir yavru alınırken, bir erkekten binlerce yavru alınabilmektedir. Erkeğin yetiştiricilikteki etkisi donmuş sperma ve suni tohumlamanın da uygulanmasıyla daha yaygın ve büyük olmaktadır. Öyle ki aygır ve kısırakların serbest olarak çiftleşmesine izin verildiği yetiştiricilikte bir aygırın kapasitesi 6-16 kısırağı döllemeye yeterken bu sayı kontrollü bir elde sıfat uygulamasıyla 40-80'e, suni tohumlama ile 250-400'e kadar çıkabilmektedir. Öte yandan damızlık olarak kullanılacak erkek birçok genç aday arasından seçilmekte, dolayısıyla damızlık olarak ayrılan bireyin, seçildiği popülasyona göre genetik üstünlüğü de bununla orantılı olarak yüksek olmaktadır (Aksoy, 2003). At reproduksiyonunun başarısını engelleyen faktörlerden en önemlisi damızlık kısırak ya da aygır seçiminde reproduktif özelliklerin neredeyse göz ardı edilerek performans, vücut yapısı ve bu özelliklerin genetik aktarım gücünün dikkate alınmasıdır. Bu durumda da damızlık bir attan olabildiğince çok sayıda verim elde etme amacı at yetiştiriciliğinde önemi gün geçtikçe artan bir yetiştiricilik hedefi haline gelmektedir. Bu amaç ve var olan aksaklıklar nedeniyle aygır spermasının dondurma ve fertilite başarısını artırmaya yönelik çalışmalar at reproduksiyonu alanında güncelliğini kaybetmeyen bir araştırma sahası haline gelmiştir. Çünkü aygır sperması dondurulmasında istenen başarının sağlanması, damızlık aygıra ait genetik materyalin uzun süre saklanabilmesine, coğrafik engellerin ortadan kalkmasına, çiftleşme ya da temas yoluyla bulaşabilecek hastalıkların önüne geçilmesine olanak sağlayacaktır.

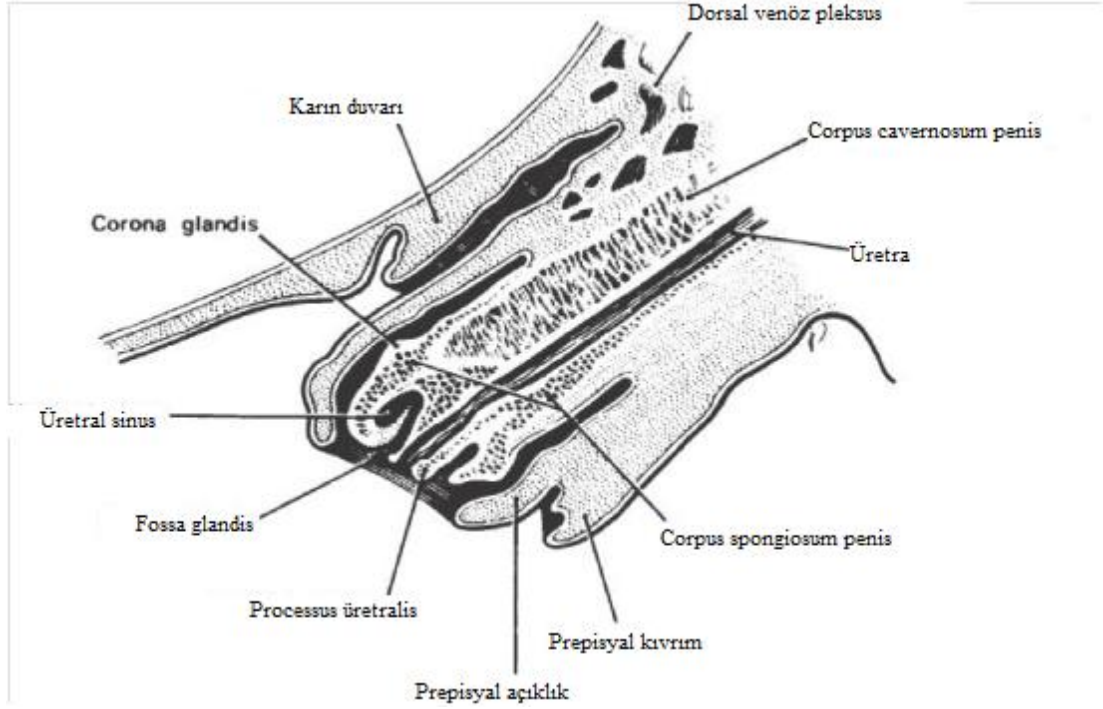
1.2 Aygırlarda Reprodüktif Anatomi

Aygırlarda iyi gelişmiş erektile çiftleşme organı olan penis, işial kemere sıkıca bağlanmış radiks penis, penisin esas kısmını oluşturan korpus penis, genişleyebilen ve serbest son kısım olan glans penis olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır. Glans penisin kranial yüzünde üretranın dışa açıldığı prosesüs üretralisin bulunduğu üretral

sinus adı verilen bir çukurluk bulunmaktadır (Varner, 2003). Penisin fonksiyonel yapıları korpus kavernosum, korpus spongiosum, üretra ile kan ve lenf damarları olarak sıralanabilir. Aygır penisi muskulokavernöz yapıdadır ve ereksiyon sırasında genişliğinde ve uzunluğunda artış gözlenmektedir. Aygır penisinde erektile doku miktarı fazla olduğundan erektile olmadığı zamanlarda 50 cm uzunluğunda, 2,5-5 cm çapında olan penis, ereksiyon esnasında çapı 1,5; boyu ise 3-4 katı uzunluğuna kadar ulaşabilmektedir (McKinnon ve ark., 2011). Glans penis ise ereksiyon esnasında 15-20 cm çap uzunluğuna ulaşabilmektedir (Anonim, 2014c).

Üretra sidik kesesinden penisin serbest ucuna kadar uzanan, mukus salgılayıcı mukoza epiteliyle örtülü uzun bir kanaldır (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95). İdrar ve sperma için müşterek bir kanal olarak görev yapmakta, pelvik ve penil olarak iki bölüme ayrılmaktadır (Constantinescu, 2007). Pelvik bölümü, ejakülasyon sırasında güçlü kontraksiyonlarla kasılan musculus uretralis adı verilen kalın bir çizgili kas tabakasıyla sarılmış durumdadır. Penil üretra, kavernöz ve erektile özellikteki korpus spongiosum penis ile çevrelenmiştir. Bu kavernöz doku pelvik uretranın etrafını saran stratum kavernosum tabakasının bir uzantısıdır (Varner, 2003). Son bölümü prosesus uretralis adı verilen serbest bir çıkıntıyla bitmektedir (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95).

Prepisyum erekte olmayan penisin distal bölümünü örten, derinin iki kere invaginasyon yapması şeklinde oluşmuş bir yapıdır (Anonim, 2018c). Eksternal katmanda yağ bezleri, internal katmanda hem yağ hem ter bezleri bulunmaktadır. Prepisyal açıklık, eksternal ve internal lamina için sınır teşkil etmekte (Constantinescu, 2007) ve penis erekte olmadığı zamanlarda, prepisyumun yalnızca eksternal laminası görülebilmektedir (Varner, 2003). Prepisyumun eksternal katmanı diğer hayvan türlerindeki prepisyuma eşdeğer bir yapı göstermektedir. Fakat internal lamina içerde penise direkt olarak bağlanmadan bir girinti yaparak penis üzerinde seyrine devam etmektedir ve penis üzerinde prepisyal halka denen ikinci bir kıvrım yaparak sonlanmaktadır. Bu kıvrım internal laminayı penisin serbest ucundan ayıran sınırı teşkil etmektedir (Constantinescu, 2007).



Şekil 1.5. Penis, prepisyum ve çevre dokulara ait longitudinal kesit görüntüsü (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95).

Skrotum, her biri bir testis için gelişmiş ve birbirinden septum scroti ile ayrılan iki adet keseyi kapsayan, derinin dışa doğru çıkıntı yapması ile oluşmuş bir organdır (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95). Skrotum üzerinde, iki kesenin birleştiği yerde longitudinal olarak uzanan bir orta hat bulunmaktadır. Aygırlarda diğer çiftlik hayvanlarına göre daha az pendülöz yapıda ve abdomene daha yakın konumdadır (Anonim, 2018c). Testislerin birinin daha büyük olmasından dolayı oluşan bir asimetri normaldir. Katmanları arasında bulunan çok sayıda ter bezi ve ince kas fibrilleri ile testislerin termoregülasyonunda önemli bir rol oynar (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95). Yetişkin bir aygırın skrotal genişliği 9,5 - 11,5 cm aralığındadır (Brinsko ve ark., 2011).

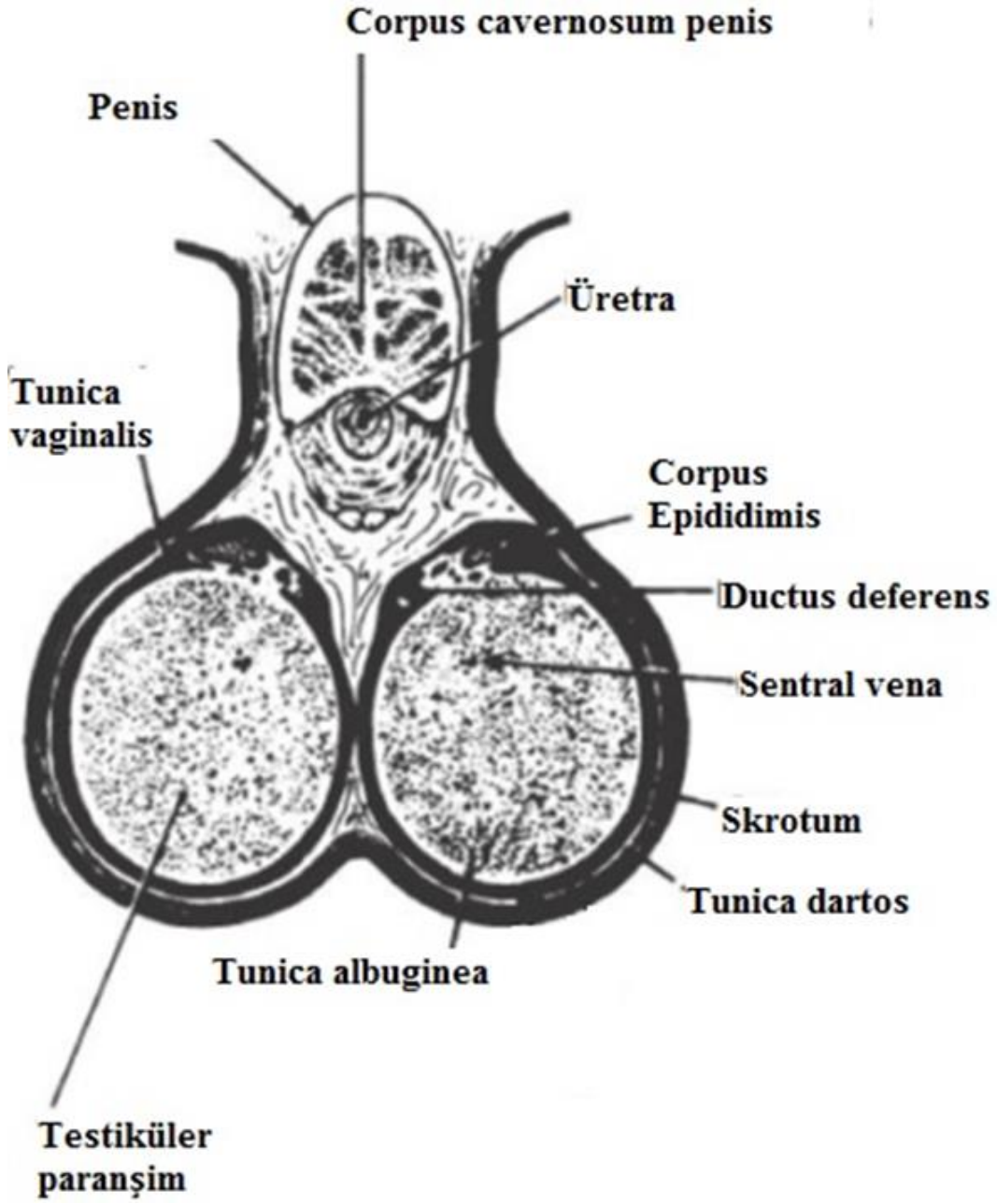
Spermatogenezis aracılığıyla spermatozoonların üretildiği ve erkek cinsiyet hormonu olan testosteronun salgılandığı testisler, erkek reproduktif organların esasını oluşturur. Oval bir yapıya sahip olan testislerin baş ve kuyruk kısmı, lateral ve medial yüzeyleri ile serbest ve epididimal kenarları bulunmaktadır (Constantinescu, 2007). Uzun eksenleri skrotum içinde horizontal olarak uzanmaktadır (Aman, 2011). Testis

boyutları genişlik, yükseklik ve uzunluk olarak sırasıyla 4,5-6 cm, 5-6,5 cm ve 8,5-11 cm değerlerindedirler (Brinsko ve ark., 2011).

Testiste spermatozoonların üretildiği yer olan seminifer tübül, germinatif epitel olarak adlandırılan özelleşmiş epitel katman ve lümeninden meydana gelen kanal şeklinde bir yapıdır. Germinatif epitel sertoli hücreleri ve bu hücreler arasındaki farklı olgunlaşma dönemlerinde bulunan germ hücrelerinden oluşmaktadır. Primer eşey hücreleri, olgun spermatozoonlara doğru gelişimini sürdürürken aynı zamanda epitel duvarın bazalinden lümenine doğru ilerlemektedirler. Gelişimini tamamlayan olgun eşey hücreleri ise seminifer tübüllerin lümenine bırakılmaktadırlar (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 97). Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantı, kan-testis bariyerini oluşturmaktadır. Kan - testis bariyeri somatik hücrelerden farklı olan germinal hücreleri aygırın immun sisteminden izole eder. Çünkü farklılaşmış hücreler olan spermatosit ve spermatidler immun sistem tarafından yabancı yapılar olarak algılanmaktadırlar. Bu nedenle kan - testis bariyeri tarafından sağlanan bu izolasyon olmadığında germinal hücreler immun sistem tarafından yok edileceklerdir. Kan - testis bariyerinin zarar görmesi aygırlarda ender rastlanan bir olgudur fakat olması durumunda testis hasarı, spermatozoal üretimin düşmesi ve hatta steriliteye neden olur (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95).

Epididimis erkek genital sisteminin salgı yapan ilk organıdır. Testise bağlı ve kanalcıklar sisteminin devamı olan duktuli efferentes ve duktus epididimidis adı verilen kanallardan oluşmuş ve etrafı testisin tunika albuginea tabakası ile sarılmış bir yapıdır. Duktus epididimidis tüm hayvan türlerinde fazlaca kıvrımlı ve oldukça uzundur (Constantinescu, 2007). Epididimis anatomik olarak kaput, korpus ve kauda olmak üzere üç bölüme ayrılmaktadır. Kaput epididimis oldukça yassı ve testise sıkıca bağlanmış durumdadır. Korpus epididimis testisin dorsal yüzüne gevşek olarak bağlanmış silindirik bir yapı olarak devam etmektedir. Kauda epididimis ise büyük, küre şeklinde bir yapıya sahiptir ve testisin kaudal kutbuna gevşek olarak bağlanmıştır. Epididimisin başlangıcında 13 - 15 adet yumak halinde kanalcıklar olarak ilerleyen duktuli efferentesler yine bu kısım içinde birleşerek tek bir duktus epididimidis halini alır. Yaklaşık 45 m uzunluğunda olan bu tek kanal kıvrımlar yaparak korpus ve kauda

epididimis içinde seyreder. Fonksiyonel açıdan değerlendirildiğinde ise epididimis 3 segmentten oluşmaktadır. Duktuli efferenteslerin epitelinden oluşan ilk segment testiküler sıvıların büyük çoğunluğunun rezorpsiyonunda ve bazı bileşiklerin salgılanmasında görev almaktadır. Kaput ve korpus epididimisin büyük bir kısmını içine alan orta segment, buradaki epitel hücrelerinin salgıları yardımıyla spermatozoal maturasyonda rol oynar. Kauda epididimis ve duktus deferensin proksimal kısmında bulunan son segment ise fertil spermatozoonların ejakülasyon anına kadar depo edildiği yer olarak bilinmektedir (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95).



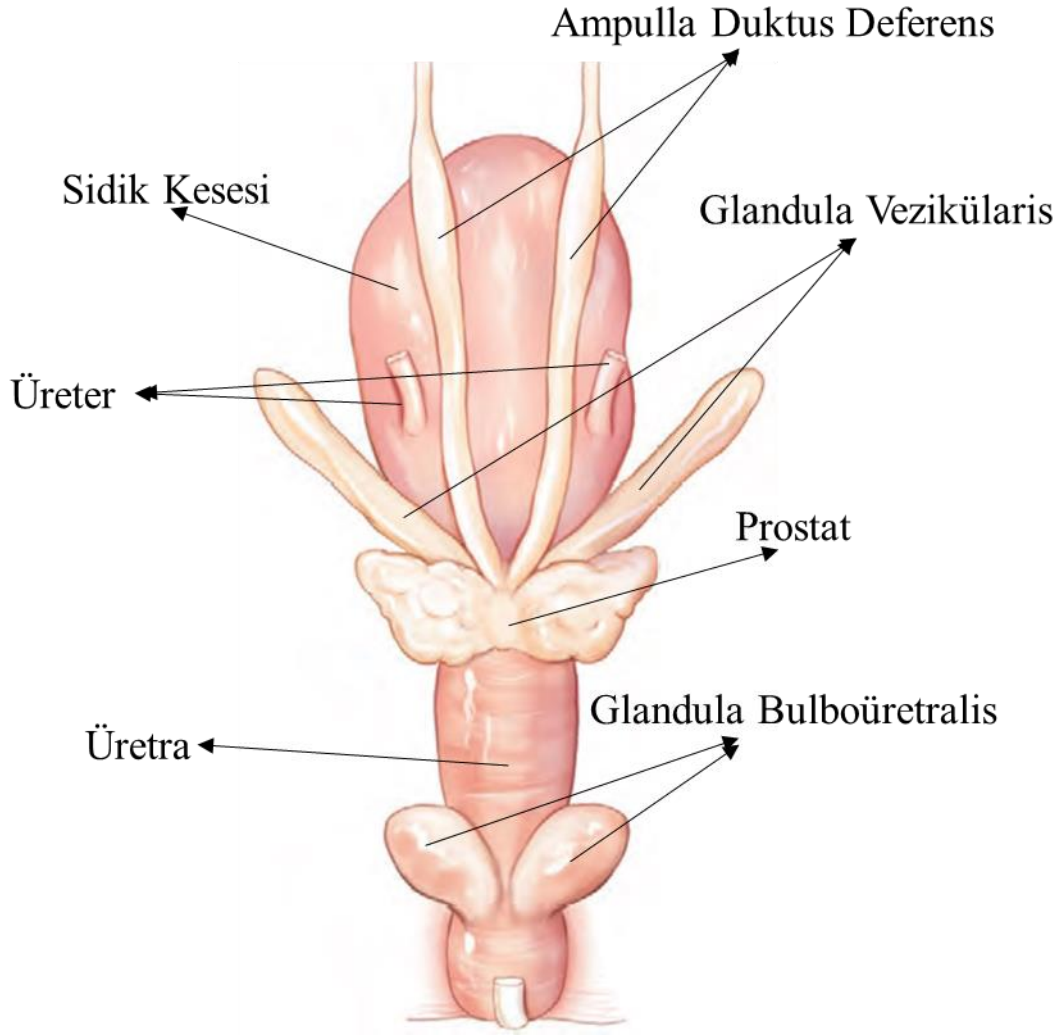
Şekil 1.6. Testis, skrotum ve penisin vertikal kesit görüntüsü (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95).

Duktus deferens epididimal kanalın uzantısı olarak kauda epididimisten funikulus spermatikus içinde pelvik üretraya kadar uzanmaktadır. Duktus deferens oldukça kalın bir düz kas tabakasına sahiptir ve duktus deferensin proksimal kısmı bu sayede skrotal deriden kolaylıkla palpe edilebilmektedir. Duktus deferensin pelvik üretraya yakın bölgesi, ampulla duktus deferens adı verilen bir genişleme göstermektedir. Normal seyrinde 4 – 5 mm genişliğe sahip olan duktus deferens, ampulla kısmında 18 mm genişliğe ulaşabilmektedir. Bu genişlemeden kript ve salgı

yapan hücrelerin oluşturduğu tabakadaki kalınlaşma sorumlu tutulmaktadır (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95).

Funikulus spermaticus, inguinal abdominal halkadan testise kadar uzanan, testisi skrotum içinde asma ve çeşitli yapılar için geçiş yolu olma görevi üstlenen bir kanaldır (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95). Duktus deferens, tunika vaginalis ile sarılı bir paket halinde seyreden testisin kan ve lenf damarları ile sinirleri, beyaz kas fibrilleri ile birlikte bu geçiş yolunu kullanır (Constantinescu, 2007). Muskulus kremaster eksternus, belirgin olarak bu kanalın lateral yüzeyinde seyretmesine rağmen bu kanala ait bir yapı değildir. Testisin skrotum içinde asılı olarak durmasında ve testisin termoregülasyonunda görev almaktadır (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95).

Eklenti bezleri, kimi zaman ampulla duktus deferensin de bu gruba dâhil edilmesine karşın, çoğunlukla glandula vezikülaris, prostat ve glandula bulboüretalis olarak sıralanmaktadır. Eklenti bezlerinden salgılanan sekresyonlardan her biri, seksüel uyarım sırasında belirli bir sırayla ve birbirinden bağımsız olarak üretraya aktarılır. Bu nedenle seminal plazmanın kompozisyonu da fraksiyonlar arasında farklılık göstermektedir (McKinnon ve ark., 2011, Chapter 95). Ampulla duktus deferensden salgılanan sekresyonların temel bileşenini N-asetil glikoprotein ve spermin oluşturmaktadır (Katila ve Kareskoski, 2006). Aygırlarda veziküler bezlerin sekresyonu laktik asit ve sitrik asit bakımından zengin früktoz bakımından diğer türlere göre yoksundur ve aygır spermasının jel fraksiyonunu oluşturmaktadır (Çebi, 2013; Katila ve Kareskoski, 2006). Laktik asit prostattan salgılanan sekresyonların temel bileşeni olarak bilinmektedir (Katila ve Kareskoski, 2006). Prostat salgısında bulunan bazı iz elementler spermatozoonların hareket ve fertilite yeteneğini artırmaktadır. Bulboüretal bezin sekretleri ise, alkali özellikleri sayesinde, ejakülasyondan önce üretranın asidik ortamını sperma geçişine uygun hale getirmektedir (Sönmez, 2007).



Şekil 1.7. Aygırlarda eklenti bezleri (Brinsko ve ark., 2011)

1.3 Aygırlarda Reprodüktif Fizyoloji

Reprodüktif aktivitenin kontrolü nöroendokrin sistem adı verilen özelleşmiş sinir hücreleri ve hormon salgılayan endokrin dokulardan oluşan kompleks etkileşim mekanizması sayesinde gerçekleştirilmektedir. Bu mekanizma fotoperiyod olarak adlandırılan jeofiziksel ve çevresel uyaranlar tarafından kontrol edilmektedir. Fotoperiyodik uyarım nöroendokrin yollar vasıtasıyla gonadal aktiviteyi regüle eden hormon sinyallerine dönüştürülmektedir. Epifizyal hormon olan melatonin, mevsime bağlı reprodüktif aktivitenin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Retina ile

algılanan ışık, sinirsel uyarımla epifiz bezine iletilmekte, bu uyarımlar melatoninin biyosentetik enzimlerinin aktivitesini etkileyerek hormon üretimini baskılamaktadır. Retinanın ışık maruziyeti azaldığında ise melatonin biyosentezindeki baskı ortadan kalkmakta, dolayısıyla hormon üretimi ve salınımı en yüksek seviyelerine ulaşmaktadır.

Aygırlarda gün ışığına maruz kalma süresinin artmasıyla günlük melatonin salınım miktarındaki düşüş GnRH salınımını arttırmaktadır. Hipotalamustan salınan GnRH, hipotalamus ile hipofiz arasındaki portal damarlar aracılığıyla adenohipofizin pars distalisine direkt olarak aktarılır. GnRH etkisiyle adenohipofizden en az altı tane tropik hormon salgılanmasına rağmen bunlardan sadece üç tanesi erkek reproduksiyonunda rol oynar. Bunlar Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH), Lüteinleştirici Hormon (LH) ve Prolaktin (PRL)'dir. Hipofizden kan yoluyla genital organlara ulaşan bu hormonlardan FSH, testisteki Sertoli hücrelerini uyararak bu hücrelerden Androjen Bağlayıcı Protein (ABP), İnhibin, Aktivin ve Östrojen; Leydig hücrelerini uyaran LH ise Testosteron üretimini sağlamaktadır. Leydig hücrelerinde LH etkisiyle üretilen Progesteronun büyük bir çoğunluğunun metabolize olmasıyla oluşan Testosteron, venöz dolaşıma karışarak temelde ikincil cinsiyet karakterinin gelişimini, erkek genital kanal sisteminin oluşmasını, seksüel davranışların ortaya çıkmasını, eklenti bezlerinin fonksiyonlarının düzenlenmesini ve spermatogenezisin oluşumunu ve sürekliliğini sağlamaktadır.

Testosteronun spermatogenezis üzerindeki etkisi, Sertoli hücrelerinde FSH etkisiyle üretilen ABP ile gerçekleşmektedir. Plazma membranında androjen hormon reseptörü olarak görev alan ABP, bu hücrelerin kan dolaşımındaki Testosteron'a duyarlılığını artırarak spermatogenezisin başlamasını ve devamlılığını sağlayacak reaksiyonların gelişmesine neden olmaktadır. Sertoli hücrelerinde Testosteron'un metabolize olmasıyla oluşan Östrojen'in erkek reproduksiyonundaki görevi tam olarak anlaşılamamış olsa da fötal cinsiyet gelişiminde etkili olduğu bildirilmektedir. Özellikle aygırlarda kan dolaşımında diğer hayvan türlerine göre daha fazla miktarda Östrojen bulunsu da bu hormonun metabolik aktivitesinin düşük olduğu bilinmektedir. Kan dolaşımında artan Testosteron miktarı hipotalamus ve adenohipofizi etkileyerek

GnRH ve LH salınımını; İnhibin ise hipofizyal düzeyde FSH salınımını baskılamaktadır. Aygırlarda Aktivin hormonunun reproduktif dokulardaki etki mekanizması hakkında kesin bir bilgi olmamasına rağmen bu hormonun diğer memelilerde olduğu gibi hipofiz üzerine etki ederek FSH salınımını artırdığı belirtilmektedir. Prolaktin'in aygır testis fonksiyonu üzerindeki etkisi henüz tam anlamıyla açıklanamamıştır. Fakat testiküler östrojen reseptörlerinin düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir. Ayrıca androjene duyarlı dokular üzerinde etki göstererek bu dokularda LH reseptör sayısını artırmak yoluyla dokuların LH'ya olan duyarlılığını artırdığı ve dolayısıyla androjen üretimi ve spermatogenezis üzerinde olumlu etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca Prolaktin eklenti bezleri üzerinde de etkili bir hormon olup bu dokularda seminal plazma üretilmesini sağlamaktadır. Aygırlarda ortalama plazma FSH miktarının yıl boyunca neredeyse sabit olduğu belirtilmektedir. Bunun yanında plazma LH, Prolaktin, Testosteron ve Östrojen miktarı sezon dışında belirgin bir düşüş göstermektedir (Gerlach ve Aurich, 2000; Hoffmann ve Landeck, 1999; Roser, 2001; Roser, 2008; Ruiz-Cortés, 2012).

1.4 Aygırlarda Sperma ve Ejakülasyon

Sperma; testislerde üretilen, erkek gamet hücresi olan spermatozoonlar ile testis, epididimis ve eklenti bezleri tarafından salgılanan, seminal plazma olarak adlandırılan sıvı olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Seminal plazma spermatozoondan başka bazı hücreleri ve çeşitli makromolekülleri içeren bir komplekstir (Akçay, 2008). Aygırlarda sperma hacminin %10'unu spermatozoa, %90'ını seminal plazma oluşturmaktadır (Kareskoski, 2008; Poiani, 2006). Normal bir aygır sperması ortalama 60 (30-300) ml hacme sahiptir. İçerdiği spermatozoon miktarına göre rengi griden beyaza kadar değişebilen aygır spermasının pH değeri 7,2-7,7 arasındadır. Yetişkin aygırlarda, ejakülattaki toplam spermatozoon yoğunluğu $4-12 \times 10^9$ arasında değişmektedir (Brinsko ve ark., 2011).

Spermatozoon diğer hücrelerden farklı olarak mümkün olan en düşük miktarda yükü taşımak, bu sayede dişi genital kanal içinde flagellar hareket yapabilme yeteneği

ile düzgün, doğrusal ve hızlı bir şekilde ilerleyerek olgun oosite ulaşmak ve taşıdığı genetik materyali aktarmak için tasarlanmış baş, orta kısım ve kuyruk bölümlerinden oluşmaktadır. Genel olarak eliptik yapıda olan, spatül ya da tenis raketine benzer olarak tanımlanan baş bölümünün hacminin büyük çoğunluğunu genetik materyal yani hücre çekirdeği oluşturmaktadır. Dorsoventral yönde yassılaşmıştır ve arka kısmı ön kısmından daha incedir. Spermatozoonun baş kısmı iki kat membran ile örtülmüştür. Dış membran spermatozoon hücresinin tamamını çevrelerken iç membran nükleus membranı olarak görev almaktadır. Bu iki membran arasında ön kısımda, spermatozoonun oosit çevresinde bulunan hücreleri geçebilmesi için gerekli olan enzimleri taşıyan ve akrozom adı verilen kese bulunmaktadır. Akrozom baş bölümünün yaklaşık %60'ını kaplamaktadır. Orta kısım baş bölümünün sonunda bulunan implantasyon çukurluğuna sentrioller vasıtasıyla sıkıca yerleşmiş durumdadır. Orta kısım kuyruğun hareket sistemini oluşturan; ortada iki merkezi fibril ile bunların çevresinde iç tarafta dokuz çift ince ve dışta dokuz çift kalın fibrilden oluşmuş bir aksiyal fibril yığınıdır. Bu yığının etrafını da hareket için gerekli olan enerjiyi üreten mitokondriler heliks şeklinde sarmış durumdadır. Kuruk kısmı orta kısımla aynı fakat gittikçe daralan bir yapıdadır. Kuyruğu orta kısımdan ayıran fark ise mitokondriyal heliksin yerini alan fibröz kılıftır. Orta kısımda üretilen enerjinin fibril kontraksiyonuna dönüşmesi sayesinde oluşan kuyruğun spiral hareketi spermatozoona hareket yeteneği kazandırmaktadır (Sönmez, 2007).

Seminal plazma birçok sperm fonksiyonu ve fertilizasyon öncesi olayların gerçekleşmesinde görev alan sıvı karışımıdır. Günümüzde seminal plazmanın içeriği hakkında çok sayıda makale olsa da seminal plazmanın fizyolojik rolü tam olarak anlaşılabilmemiş değildir. Önceleri tüm eklenti bezlerinin benzer embriyonik orjinli olması ve morfolojik yapılarıyla ilişkili olarak anatomik ve fonksiyonel açıdan benzer olduklarına inanılırdı. Fakat eklenti bezlerinden salınan sitrik asit, prostatik fosfataz, fruktoz ve fosforilkolin gibi birçok substant maddenin keşfi ile spermatozoa için olası rolleri olduğu anlaşılmış ve araştırmalar bu bezlerin aktiviteleri ve kimyasal içeriklerinin farkı üzerine yoğunlaşmıştır (Kareskoski ve ark., 2011). Seminal plazma temelde erkek gamet hücrelerini dışı genital kanalına aktaran tampon bir sıvı olarak görev yapmakta, ejakülasyon sırasında kısırak genital kanalı boyunca spermatozoanın

hareketini kolaylaştırmakta ve dişi reproduktif kanalında immün ataklara karşı spermatozoanın korunmasını sağlamaktadır (Juyena ve Stelletta, 2012). Ayrıca spermatozoonların fonksiyonlarını mobilize etmektedir. Spermatozoanın olgunlaşmasını sağlayarak dişi genital sisteminde kapasitasyon işleminin ve gamet etkileşimlerinin kompleks basamaklarını düzenlemektedir. Bunun yanında pH 6,2'nin altına düştüğünde spermatozoa immobilize olacağından tampon görevi görerek vaginanın asidik pH'sını yükseltmektedir (Çevik ve Tuncer, 2005).

Genel olarak seminal plazmada; inorganik elementler (Ca, Cl, Mg, P, Na, K, Zn, vb.), küçük moleküllü organik elementler (askorbik asit, ATP, sitrik asit, fruktoz vb.), azottan zengin küçük moleküller (amonyak, kreatin, histamin, flavin, üre vb.), peptidler, lipidler, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı proteinler bulunmaktadır. Ayrıca değişik aminoasitler ve Ig G, Ig A, Ig E, Ig M, FSH, LH, antitripsin, glikoprotein, inhibin, insülin, kininojen, prolaktin, relaksin, steroid bağlayıcı proteinler ve kan grubu antijenleri bulunmaktadır (Çebi Şen ve Akçay, 2015; Gebauer ve ark., 1976). Bu maddeler içinde bazı basit bileşikler spermatozoonun yaşama kabiliyeti üzerinde önemli etkilere sahiptir. Örneğin bikarbonat spermatozoonun motilitesini ve kapasitasyon sırasında plazma membranını; çinko ise kromatin yapının stabilizasyonunu modüle etmektedir (Katila ve Kareskoski, 2006; Rodriguez-Martinez ve ark., 2011).

Spermanın ejakülasyonu iki aşamada gerçekleşmektedir. Birincisi eklenti bezlerinden seminal sıvının, duktus deferensten de spermatozoonların pelvik üretra lümenine salgılanması (emisyon), ve ikincisi penil üretra boyunca biriken sıvının hızlıca dış ortama (ejakülasyon) bırakılmasıdır (Weber ve Woods, 1993). Aygır sperması fiziksel ve kimyasal olarak farklı 8-10 saniyelik periyodlarla ejaküle edilen, 5-10 seminal fraksiyondan oluşmaktadır. Bulboüretal bez, salgısını ejakülasyon öncesinde genital kanala aktarmaktadır. Bunu kauda epididimisten serbest bırakılan spermatozoonların genital kanalda birikmesi; ampullar, epididimal ve prostatik sekresyonlar ile birlikte bir seri fraksiyon halinde ejaküle olması izler. Spermden zengin fraksiyonlar olarak bilinen bu fraksiyonlar ejakülattaki toplam spermatozoon miktarının %70'ini içermektedir ve aygırda bulboüretal sekresyonu izleyen ilk iki

veya üç fraksiyondur (Kosiniak, 1975; Rodriguez-Martinez ve ark., 2011). Prostatik aktivitenin durmasını takiben veziküler sekresyonlar salınmaya başlar, kalan fraksiyonların içeriğini veziküler salgı domine ederken fraksiyon içindeki sperm miktarı düşmektedir. Aygır spermasının son fraksiyonu veziküler bez kaynaklı jel içermektedir (Kareskoski ve ark., 2011; Weber ve Woods, 1993). Bu fraksiyonlar üretra boyunca, bulbospongiyöz ve işiyokavernöz kaslar tarafından gerçekleştirilen güçlü, ritmik kontraksiyonlar şeklinde oluşturulmaktadır. İlk kontraksiyonlar sonrakilere oranla daha kısa sürelidir ve daha fazla miktarda seminal sıvı taşımaktadır (Kosiniak, 1975; Weber ve Woods, 1993).

1.5 Aygır Spermasının Dondurulması

Aygır spermasının dondurulmasına ilişkin ilk girişimler 1776 yılında Spallanzani tarafından gerçekleştirilmiş olsa da tam anlamıyla dondurulmuş spermanın ortaya çıkışı Polge ve asistanlarının gliserolün kriyoprotektif etkisini keşfetmesiyle gerçekleşmiştir. Günümüzde çok sayıda memeli, kanatlı ve balık türüne ait sperma başarılı sayılabilecek şekilde dondurulabilmektedir. Fakat türler arasında, hatta aynı türün bireyleri arasında bu başarı değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenliğin çok sayıda nedeni olsa da kısaca; spermanın kimyasal kompozisyonu, spermatozoanın ozmotik toleransı, hücre boyutu ve yapısı sperma dondurulmasında en önemli belirleyicilerden sayılmaktadır (Avcı ve ark., 2016; McKinnon ve ark., 2011, Chapter 102). Sperma dondurma işlemi spermatozoon yapısında kapasitasyon ve akrozom reaksiyonuna benzeyen bazı değişiklikler olmasına neden olmaktadır. Kriyoprezervasyon ile birlikte gelişen soğuk şoku ve ozmotik şok, plazma membranındaki lipid kompozisyonunun değişmesine ve akışkan özelliğinin etkilenmesine neden olmaktadır. Bu durum da membran geçirgenliğinde aksaklıklara neden olarak enzimlerin hücre dışına sızmasına neden olmaktadır (de Leeuw ve ark., 1990; Mogielnicka-Brzozowska ve Kordan, 2011).

At yetiştiriciliğinde dondurulmuş sperma ile suni tohumlamadan elde edilen başarı oranı oldukça düşüktür. Bu durum damızlık olarak kullanılmak istenen aygırın,

diğer hayvan türlerinden farklı olarak, atletik performansının, pedigree kayıtlarının ve yapısal özelliklerinin ön planda tutulması; buna karşın fertilitésinin ve spermatolojik özelliklerinin göz ardı edilmesinden kaynaklanmaktadır (Salazar ve ark., 2011). Aygır popölasyonunun büyük bir kısmı, çözüm sonu sperma kalitesi ve gebelik oranlarının düşük olması sebebiyle sperma dondurma programında kullanılmak için yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte dondurulmuş aygır spermalarının çözüm sonu kalitesinin bireyden bireye oldukça değışkenlik gösterdiği gözlemlenmiştir. Aygır spermasının dondurulma ve fertilité başarısını arttırmak amacıyla, kriyoprotektif ajanlardan antioksidanlara; tampon çözeltilerden dondurma protokollerine kadar birçok farklı konu üzerinde çalışma yapılmış fakat diğer çiftlik hayvanlarıyla karşılaştırıldığı zaman tatmin edici sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle aygırlar için sperma dondurma protokolünün optimizasyonu hala üzerinde çalışılması gereken bir konudur (Avcı ve ark., 2016; Hoffmann ve ark., 2011).

Aygır spermasının istenen başarıda dondurulamamasının nedenleri pek çok kez araştırılmış; bu çalışmalar sonucunda aygır spermatozoonlarının yapısal farklılıkları, membran lipid kompozisyonunun bu durumun sorumlularından biri olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Aurich ve ark., 1998). Aygırlarda sperma dondurma başarısını etkileyebilecek diğer bir etkenin ise santrifüj işlemi olduğu konusunda yoğun bir fikir birliği bulunmaktadır. Aygır spermasının yüksek hacim ve düşük yoğunluğa sahip olması nedeniyle dondurma işlemi öncesinde santrifüj edilmesi ve seminal plazmanın uzaklaştırılması rutin bir prosedür işlemi olarak uygulanmaktadır (Akçay ve ark., 2006; Brinsko ve ark., 2000). Bu işlemin spermatozoonlara mekanik olarak zarar vermesinin yanında seminal plazmada bulunan ve hücrelerin yaşamı ve fonksiyonu açısından önemli komponentlerin de uzaklaştırılmasına neden olarak aygırlarda sperma dondurma başarısını olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir. Birçok hayvan türünde olmakla birlikte özellikle aygırlarda seminal plazmanın sperma işlenmesinde faydalarının ya da zararlarının araştırıldığı çalışmalar sıklıkla yapılmaktadır.

Bu çalışmalardan birkaçında (Akçay ve ark., 2006; Kareskoski ve Katila, 2008), %5 veya daha az miktarda seminal plazma içerisinde bulundurulmuş aygır spermasının

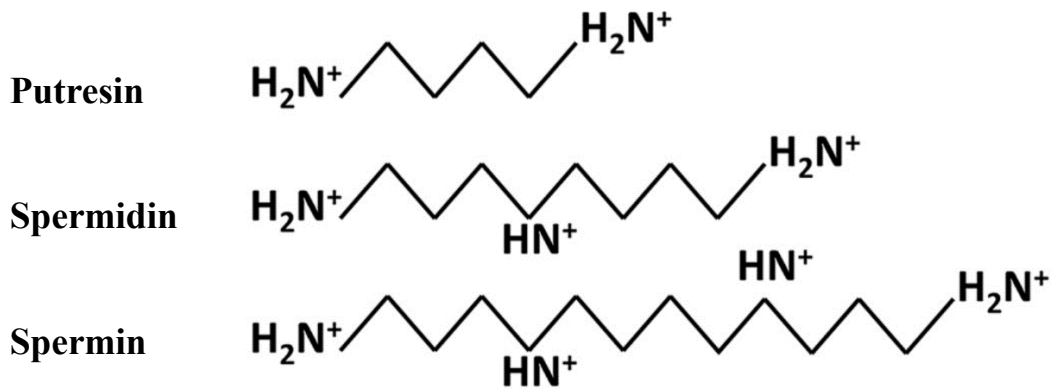
motilitesinin %10-30 seminal plazma içinde bulunanlara göre daha yüksek motiliteye sahip olduğunu vurgularken; bazı araştırmacılar (Akçay ve ark., 2006; Aurich ve ark., 1998; Katila ve ark., 2004) seminal plazma etkisinin bireysel olduğunu ve bireyler arasında farklılık gösterdiğini bildirmişler; Jasko ve ark. (1991) ve Rigby ve ark. (2001) bu hipoteze destek olacak nitelikte bir araştırmayla %20'ye kadar seminal plazmanın sperma motilitesi için faydalı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Brinsko ve ark. (2000) ise aygır sperması dondurulmasında seminal plazmanın ortamda mutlaka bulunması gerektiğini fakat dondurulabilirliği düşük olan aygır spermalarının seminal plazmalarının tamamına yakınının uzaklaştırılması gerektiğini belirtmiştir.

Seminal plazmanın varlığı ya da yokluğunun sperma saklama işlemleri üzerine etkilerinin araştırılmasının yanında hangi fraksiyonun eklenmesi gerektiğinin araştırıldığı çalışmalar da yapılmış ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı araştırmacılar (Varner ve ark., 1987) spermatozoondan zengin fraksiyona ait seminal plazmanın eklendiği örneklerde daha yüksek motiliteye sahip spermatozoonların olduğunu savunurken yapılan bir diğer çalışmada spermatozoondan zengin olmayan fraksiyona ait seminal plazmanın daha faydalı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Katila ve Kareskoski, 2006). Çözüm sonu motilitesi yüksek olan aygırlardan elde edilen seminal plazmanın, çözüm sonu motilitesi düşük olan aygır spermasına eklenerek dondurulmasının, çözüm sonu plazma membran bütünlüğü ve progresif motiliteyi arttırdığı; tam tersi işlemin ise daha düşük sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (Aurich ve ark., 1998). Taze ya da dondurulmuş aygır epididimal spermasıyla yapılan suni tohumlamalarda, spermanın sulandırılmadan önce seminal plazma ile muamele edilmesinin fertilitateye olumlu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Heise ve ark., 2010). Yapılan tüm bu çalışmaların sonuçları tek bir noktada birleşme de seminal plazmanın sperma saklama ortamı içinde bulunmasının faydalı olduğu, membran bütünlüğünü, hareket yeteneğini ve fertilitateyi artırdığını söylemek mümkündür. Bunun nedeni ise seminal plazma içerisinde bulunan ve spermatozoonun yaşamı ve fonksiyonu için faydalı olan bileşenlerdir. Seminal sıvı, temelde erkek gamet hücrelerini dişi genital kanalına aktaran tampon bir sıvı olarak görev yapmakta, spermatozoonun hareketi, fonksiyonları, olgunlaşması ve gamet etkileşimlerinin düzenlenmesine yardımcı olmaktadır (Juyena ve Stelletta, 2012). Dişi genital

kanalının asidik ortamı ve spermatozoonların kendi metabolik aktiviteleri sonucu oluşan atıklardan doğan pH değışiklerinin kontrol edilmesinde görev almaktadır (Çevik ve Tuncer, 2005). Protein, iyon, serbest amino asitler gibi düşük molekül ağırlıklı organik maddeler, monosakkaritler, lipidler, poliaminler, prostaglandin ve steroid hormonlar gibi maddeleri içeren kompleks bir karışımdır. Seminal plazmada bulunan çok sayıda bileşen arasında poliaminler fertilizasyon sürecinin düzenlenmesinde önemli ve özel bir role sahiptir (Katila ve Kareskoski, 2006; Mogielnicka-Brzozowska ve Kordan, 2011).

1.6 Poliaminler

Poliaminler canlı organizmada eşı bulunmayan, çeşitli uzunluktaki karbon zincirlerine bağı iki veya daha fazla sayıda primer amino grubundan oluşan, düşük moleküler ağırlığa sahip alifatik, katyonik bileşiklerdir (Lefevre ve ark., 2011). İlk olarak 1678 yılında Antonie van Leeuwenhoek tarafından insan spermasında, kristal maddeler şeklinde tespit edilmiş; 1791 yılında Vauquelin bu kristalleri seminal plasmada bulunan ve ne olduğı bilinmeyen fosfat bileşikler olarak tanımlamıştır. Schreiner, 1878’de bu bileşiklerin organik yapıya sahip azotlu bileşikler olduğunu belirtmiştir (Bachrach, 2010).



Şekil 1.8. Putrescin, Spermidin ve Spermin adlı poliaminlerin moleküler yapıları (Kusano ve ark., 2008).

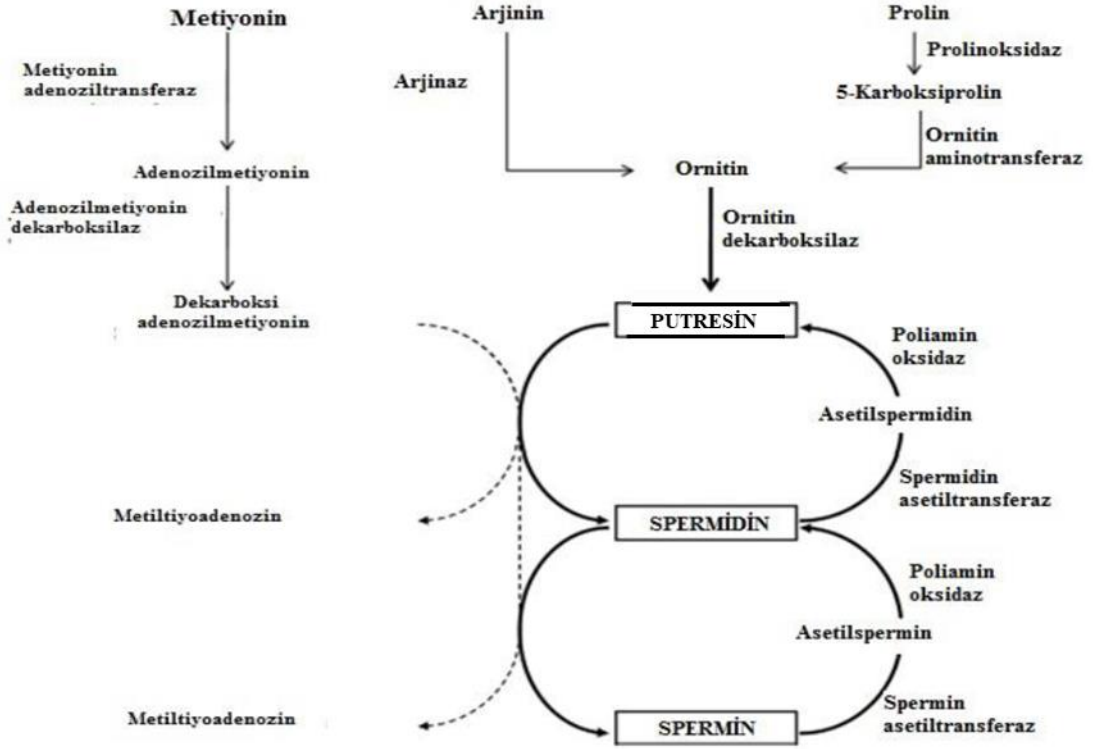
Poliaminler ilk olarak birkaç milimolar miktarda bulunduğı seminal plazmada keşfedilmiş olsa da daha çok miktarlarda bitkilerden ökaryotik hücrelere, bakterilerden

hayvanlara kadar tüm canlı organizmalarda bulunmaktadır (Rubinstein ve ark., 1995). Memelilerde şimdiye kadar spermin, spermidin, putresin ve kadaverin olmak üzere dört poliamin molekülü izole edilmiştir. Spermin ve spermidin, adlarından da anlaşılabilir gibi, ilk olarak insan spermasından izole edilen poliaminlerdir. Memeli hücrelerinde poliaminler arginin, prolin, methionin gibi amino asitlerin birleşiminden üretilirler ve doğrudan diyetle alınabildiği gibi bağırsak mikroflorası tarafından da üretilmektedirler. İster diyetle alınmış olsun, ister bağırsak mikroflorasında üretilsin; poliaminlerin emilimi bağırsaklarda gerçekleşmektedir. Burdan kan dolaşımına geçen poliaminler timus, karaciğer gibi çevre doku ve organlara ulaşarak görevlerini yerine getirmektedirler. Poliamin seviyesi hücre proliferasyonu ve doku büyümesi ile ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla hücre içi poliamin birikimi dinamik bir düzen içerisinde. Ayrıca poliaminlerin deaminasyonu sonucu ortaya çıkan metabolitler de bu dinamizmin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Poliamin dengesi hücre içi ve dışı poliamin transportu ile sentez ve katabolizma olgularının işbirliği sayesinde sağlanmaktadır (Lefevre ve ark., 2011).

Poliaminler endojen olarak, Arginin ve Prolin birleşmesinden oluşan Ornitin; ve Methioninin dekarboksilasyonu sonucu ortaya çıkan Dekarboksiadenosilmethioninin etkileşimleri ile üretilmektedirler. Ornitin dekarboksilaz (ODC1) adı verilen bir enzimin kontrolü altında gerçekleşen poliamin biyosentez mekanizması, yine bu enzimin sınırlayıcı etkisi ile durdurulabilmektedir. Ornitin dekarboksilasyonu ile oluşan ilk ürün Putresin, Dekarboksiadenosilmethionin ile birleşerek sırasıyla önce Spermidin'e, oradan da Spermin'e dönüşmektedir. Poliamin metabolizması geri dönüşümlü bir mekanizmadır ve oluşan son ürünler Asetiltransferaz (SAT1) ve poliamin oksidaz enzimleri yardımıyla kendilerini oluşturan bileşenlere tekrar dönüşebilmektedir (Cui ve Kim, 2005; Kwon ve ark., 2003; Lefevre ve ark., 2011).

Poliaminler birçok fizyolojik olgunun gerçekleşmesinde, hücre bölünmesinde, çeşitli enzimatik reaksiyonlarda, hücrelerarası sinyal iletiminde, iyon kanallarının düzenlenmesinde, membran füzyonunda, DNA ve membran stabilizasyonunda, RNA ve protein sentezinde ve organizmanın serbest oksijen radikallerine karşı

korunmasında görev alan hücresel bileşiklerdir (Cui ve Kim, 2005; Rubinstein ve Breitbart, 1991).



Şekil 1.9. Poliamin biyosentez metabolizması (Lefevre ve ark., 2011).

1.6.1 Poliaminlerin Reprodüksiyon Alanındaki Görev ve Etkileri

Poliaminler, yukarıda bahsi geçen görevleri doğrultusunda, özel olarak reprodüktif sistem ve fonksiyoları için vazgeçilmez bileşiklerdir ve spermatogenezis, oogenezis, embriyogenezis, implantasyon, plasentasyon, gebelik, laktasyon süreci ve doğum sonrası dönem içinde meydana gelen tüm olgularda önemli role sahiptirler.

Poliaminler eklenti bezleri, sertoli hücreleri ve leyding hücrelerinde sentezlenmekte ve yine bu hücre ve dokularda bulunmaktadır. Bu moleküllerin üretimi gonadotropinlerin (FSH, LH) etkisiyle gerçekleşmektedir. FSH ve LH hormonlarının varlığında poliamin üretiminden sorumlu olan ODC1 enzimi

miktarında artış olduğu bilinmektedir. Buna karşın testis dokusunda artan testosteron miktarının, Sertoli hücrelerinde, poliamin sentezinden sorumlu olan ODC1 enzimi aktivitesini düşürdüğü gibi bu enzimin hücre dışına çıkışını hızlandırdığı da bilinmektedir. Ayrıca poliaminler Leyding ve Sertoli hücrelerinin fonksiyonu için vazgeçilmezdir ve ODC1 enziminin inhibisyonunda steroid sentezinde düşüşe neden olmaktadır. Bu durum genital organlarda poliamin sentezinin hormonal düzeyde nasıl düzenlendiğini ve kontrol edildiğini açıklamaktadır (Williams-Ashman ve Lockwood, 1970).

ODC1 enzimi ergin bir erkekte spermatogenezis esnasında yükselmektedir. Hatta en yüksek seviyesine spermiogenezis aşamasında ulaşmaktadır. Bununla beraber memeli testisinde maksimum ODC1 enzimi aktivitesi pubertanın hemen öncesinde görülmektedir (Weiner ve Dias, 1992). Poliamin sentezi bloke edilmiş transgenik farelerin infertil oldukları, spermatogenezisin baskılanarak spermatogonia veya primer spermatosit aşamasında kaldığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca poliaminler spermatogenezis için gerekli moleküller olsalar da gerekenden fazla olması durumunda zararlı etkileri ortaya çıkmaktadır. ODC1 üretimiyle ilgili gen sekansı normalin 80 katına çıkartılan transgenik farelerde hipoplastik germinal epitel ve spermatogenezin tamamen baskılanması durumu ile karşılaşmıştır (Pegg ve Wang, 2009).

Poliaminlerin fertilité üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Poliaminlerin motilitéyi nasıl etkilediği hala bilinmemekle birlikte in vitro deneyler hücre içi sinyal iletimi ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde etkili oldukları ihtimalini göstermektedir. Spermin, spermidin ve hatta putresin ile kültüre edilen epididimal sıçan spermatozoonlarında glikolizisin arttığı, sığır ve insan spermatozoonlarında adenilsiklaz aktivitesinin stimüle edildiği ve insan spermatozoonlarında fosfodiesteraz aktivitesinin ve cAMP inhibe edici sinyallerin azaldığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Koç spermatozoonlarında sperminin çoğunlukla akrozom bölgesinde lokalize olduğu; bu molekülün akrozomdan ayrılmasında ise kapasitasyon ve akrozom reaksiyonuyla birebir ilgilisi olan heparin molekülünün etkili olduğu ortaya koyulmuştur (Lefavre ve ark., 2011). Boğa

spermalarında ise düşük miktarda sperminin kapasite spermatozoonlarda akrozom reaksiyonuna neden olduğu, yüksek miktarlarda ise bu olguyu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar ile sperminin ve diğer poliaminlerin seminal plazmada bulunan ve prematur kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu engelleyen organik bileşikler olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Rubinstein ve ark., 1995). Bir diğer çalışmada da poliaminlerin embriyo gelişiminde oldukça faydalı olduğu ve apoptozisi indükleyen mRNA oluşumunu baskılayarak apoptotik hücre ölümünü azalttığı bulunmuştur (Cui ve Kim, 2005).

Spermin ve spermidin genelde prostatik sekresyonun en eski organik bileşenleri olarak bilinen ve erkek gamet hücrelerinin fonksiyonu için gerekli olan temel maddelerdir. İnsan ve kemirgenlerde seminal plazma, diğer bütün doku ve organlardan daha fazla spermin ve spermidin barındırmaktadır. Poliamin sentezi hormonlar tarafından düzenlenmekte olup, başta testis olmak üzere diğer erkek genital organlardaki spermin ve spermidin sentezi androjenik kontrol altındadır. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda kastrasyon sonucunda ventral prostat, epididimis ve seminal vezikülde ODC1 seviyesinde belirgin bir düşüş olduğu ortaya koyulmuştur. Kastre edilen kemirgenlerin testosteron ile tedavisi sonucunda ise bu üç dokuda ODC1 üzerinde oluşan inhibitör etkinin ortadan kalktığı kanıtlanmıştır (Blackshear ve ark., 1989; Danzin ve ark., 1979). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda infertil erkeklerin seminal plazmalarının, normospermik özellik taşıyan erkeklerin seminal plazmalarına göre belirgin miktarda düşük spermin ve spermidin seviyelerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Adenosilmethionin ile tedavi edilen oligospermik erkeklerin, sperm yoğunluğu ve motilitesinde artış ile birlikte seminal plazmalarında bulunan poliamin seviyesinin arttığı görülmüştür (Lefevre ve ark., 2011). Koçlarda da ejakülatta bulunan spermin ve spermidin miktarının motilite ile doğrusal bir ilişkisi olduğu kanıtlanmıştır (Melendrez ve ark., 1992). Poliaminler etkilerini direkt olarak göstermektedirler. Öyle ki; düşük motiliteye sahip ya da motilitenin olmadığı (asthenozoospermik) insan spermalarına in vitro olarak katılan poliaminlerin ya da argininin motiliteyi direkt olarak artırdığı yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Morales ve ark., 2003). Fare, sıçan, hamster ve tavşanlardan elde edilen, prostatik sıvıyla henüz karşılaşmamış testiküler spermatozoonların, poliaminlerle in vitro etkileşimi sonucunda hareket

özelliği kazandığı ve bu sayede motilitelerinin indüklendiği belirtilmiştir (Tabor ve Tabor, 1964).

Spermin'in daha önce yalnızca iki çalışmada sperma dondurulmasında sulandırıcıya eklendiği bilinmektedir. Bu çalışmalarda, manda sperması dondurulmasında sulandırıcıya eklenen Spermin'in çözüm sonu motilite, plazma membran bütünlüğü, canlılık ve lipit peroksidasyon parametreleri üzerinde olumlu etkisi olduğu (Siddique ve Atreja, 2013); köpek sperması dondurulmasında ise motilite, hareket özellikleri, plazma membran bütünlüğü ve kapasitasyon indeksi parametreleri üzerinde olumlu etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Setyawan ve ark., 2016). Ayrıca Spermin ile dondurulan köpek spermatozoonlarının çözüm sonu fizyolojik kapasitasyon gösterme oranlarının da yüksek olduğu bildirilmiştir (Setyawan ve ark., 2016). Spermin, Spermidin ya da öncü metabolitlerinin taze, kısa süreli saklanan veya dondurulmuş aygır sperması üzerindeki etkileri daha önce çalışılmamış olmakla birlikte Spermin ve Spermidin ile aygır sperması arasındaki bilinen tek ilişki bu maddelerin aygırlarda ampullada sentezlendikleridir (Magistrini ve ark., 1995).

Bu çalışmada aygır spermasının dondurulması ve özdürölmesi sırasında maruz kaldığı çeşitli mekanik ve metabolik zararlara karşı majör poliaminlerden Spermin ve Spermidin'in, aygır sperması sulandırıcısına eklenerek çözüm sonu spermatolojik özellikler üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı dozlarda Spermin ve Spermidin ilave edilmiş standart sulandırıcı ile dondurulan aygır spermaları, spermatozoon üzerinde etkili olduğu bilinen hareket yeteneği, plazma membran ve akrozom bütünlüğü, kapasitasyon ve DNA sağlamlığı parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda standart aygır sperması dondurma sulandırıcısına eklenebilecek uygun bir poliamin ve dozunun ortaya çıkartılması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Hayvan Materyali

Çalışmada TİGEM Karacabey Tarım İşletmesi Müdürlüğü (40°07'44.4"K 28°21'33.1"D) bünyesinde bulunan yaşları 9 ile 20 arasında değişen fertilitesi kanıtlanmış 4 ergin Arap Aygır'ından yararlanıldı. Çalışmada kullanılan aygırlardan Haziran ayı içerisinde iki gün arayla suni vajen yöntemiyle sperma alındı; alınan spermalar temel spermatolojik parametreler (yoğunluk, motilite, anormal spermatozoon, canlı spermatozoon) açısından muayene edildi. Çalışma her aygır için 5 kez tekrar edildi. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından alınan 02.03.2016 tarih ve 2016-6-67 sayılı karar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1. Çalışma sırasında aygırlardan sperma alınması işlemi.

2.2 Spermanın dondurulması

Alınan spermalar 37°C’deki steril falkon tüplere aktarıldı. Eşit hacimde Tyrode’s solüsyonuyla (T2145, Sigma-Aldrich) sulandırılan taze sperma, dakikada 2100 devir ile 10 dakika boyunca santrifüj edilerek seminal plazma uzaklaştırıldı. Dipte kalan pelet 200×10^6 spermatozoa/ml yoğunlukta olacak şekilde Kontrol sulandırıcısı ile sulandırıldı. Daha sonra sulandırılmış sperma 13 eşit hacme bölünerek 37°C’deki su banyosu içerisinde bulunan dereceli steril tüpler içerisine aktarıldı. 13 eşit hacimden bir tanesi Kontrol grubu olarak ayrıldı; geri kalan 12 eşit hacim spermaya farklı dozlarda Spermin ve Spermidin eklenerek deney grupları oluşturuldu. Kontrol sulandırıcısı olarak INRA96 (% 95,5), yumurta sarısı (%2) ve gliserol (% 2,5) kullanıldı. Deney grubu sulandırıcıları ise kontrol sulandırıcısına mililitresine 0,1 mg, 0,2 mg, 0,4 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg Spermin ve 0,1 mg, 0,2 mg, 0,4 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg Spermidin eklenmesiyle oluşturuldu. Kontrol ve deney grubu sulandırıcıları Çizelge 2.2.1’de belirtildiği gibidir.

Çizelge 2.1. Kontrol ve deney grubu sulandırıcılarının bileşenleri.

	Kontrol	Spermin (Sp)						Spermidin (Spd)					
INRA 96 (%)	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5
Yumurta Sarısı (%)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Gliserol (%)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Spermin (birim/ml)	-	0,1 mg	0,2 mg	0,4 mg	1 mg	2 mg	4 mg	-	-	-	-	-	-
Spermidin (birim/ml)	-	-	-	-	-	-	-	0,1 mg	0,2 mg	0,4 mg	1 mg	2 mg	4 mg

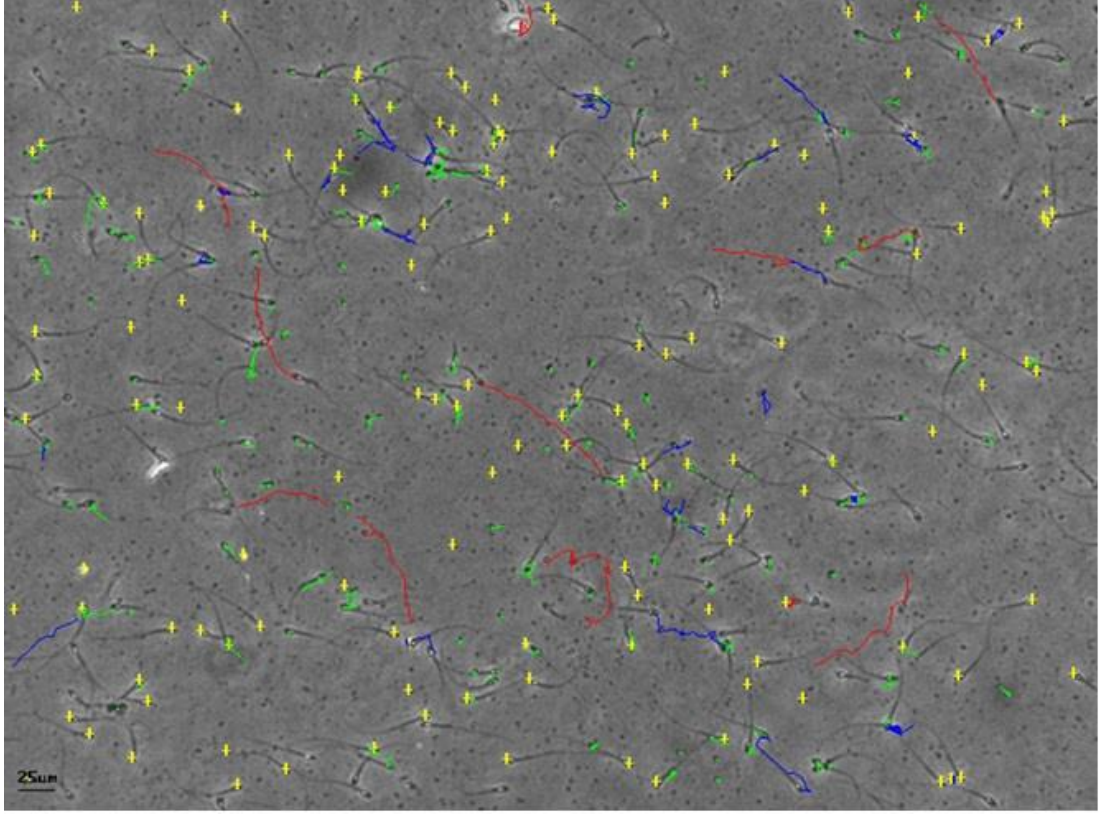
Kontrol ve deney gruplarının oluşturulması işlemleri tamamlandıktan sonra spermalar 0,5 ml hacmindeki payetlere çekildi ve spermalar payetler içerisinde +4°C’de 2 saat alışma bırakıldı. Alışım aşamasının ardından payetler sıvı azot seviyesinin 4 cm üstünde sıvı azot buharında 10 dakika, sıvı azot içinde 5 dakika bekletilerek donduruldu.

2.3. Çözüm sonu spermatolojik analizler

Dondurulan spermalar muayene edileceği zaman 37°C’de 30 sn’de çözündürüldü ve çözüm sonu motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket özellikleri, anormal spermatozoon oranı, plazma membran ve akrozom bütünlüğü, DNA fragmentasyon indeksi ve kapasitasyon indeksi açısından muayene edildi.

2.3.1 Motilite, Progresif Motilite ve Spermatozoon Hareket Özellikleri

Dondurulmuş spermaların çözüm sonu motilitelerinin ve hareket özelliklerinin değerlendirilmesi için CASA, Sperm Class Analyzer (SCA® v.4.2, Barcelona, Spain) kullanıldı (Ortiz ve ark., 2014). Her bir örnekten 5 µl alınarak lam üzerine damlatıldı ve üzeri 22x22 lamel ile kapatılarak; sisteme bağlı faz-kontrast mikroskopta (Nikon ECLIPSE 50i) 10x10’luk büyütmede kamera (Basler®) eşliğinde her bir örnek için 7 farklı alandan alınan görüntüler analiz edildi. Yapılan analizde spermatozoa total motilitesi (TMOT; %), progressif motilite (PMOT; %), VCL (µm/s), VSL (µm/s), VAP (µm/s), LIN (%), STR (%), WOB (%), ALH (µm), BCF (Hz) ve hiperaktivite (%) parametreleri değerlendirildi.

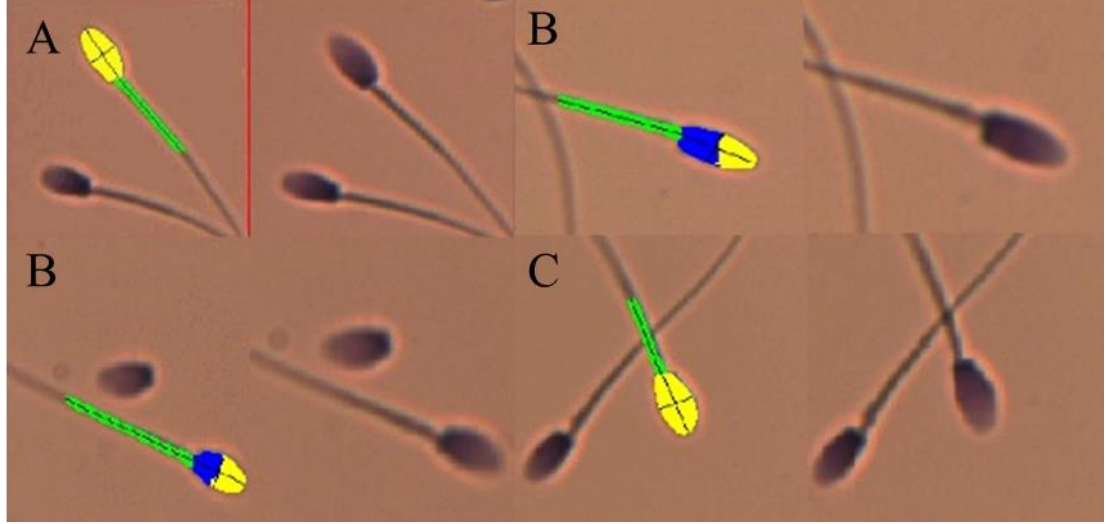


Şekil 2.2. Çözüm sonu aygır spermasının CASA ile motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket özelliklerinin analizi.

2.3.2 Anormal Spermatozoon Oranı

Dondurulan spermaların çözüm sonu anormal spermatozoon oranlarının belirlenmesi için sperma morfoloji kiti (Sperm Blue[®], Microptics[®], Spain) kullanıldı (van der Horst ve Maree., 2010). İnceleme CASA, Sperm Class Analyzer (SCA[®] v.4.2) ile sisteme bağlı faz-kontrast mikroskop (Nikon ECLIPSE 50i) ve kamera (Basler[®]) yardımıyla 10x60'lık büyütmede yapıldı. Çözdürülen payetlerden froti yöntemiyle hazırlanan sürme preparatlar boyama tepsisine yerleştirilerek fiksasyon solüsyonu ile 10 dakikada fikse edildikten sonra fiksasyon sıvısı dikkatlice uzaklaştırıldı. Ardından sperm blue ile 15 dakika boyama işlemine tabi tutuldu. Süre sonunda sperm blue boyası uzaklaştırılarak preparatın üzeri 22x22 lamel ile kapatıldı ve preparatlar CASA sisteminde değerlendirildi. En az 200 spermatozoa incelenerek yapısal olarak baş,

boyun, kuyruk, stoplazmik damlacık anomalileri değerlendirilerek toplam anormal spermatozoa oranı (%) belirlendi.

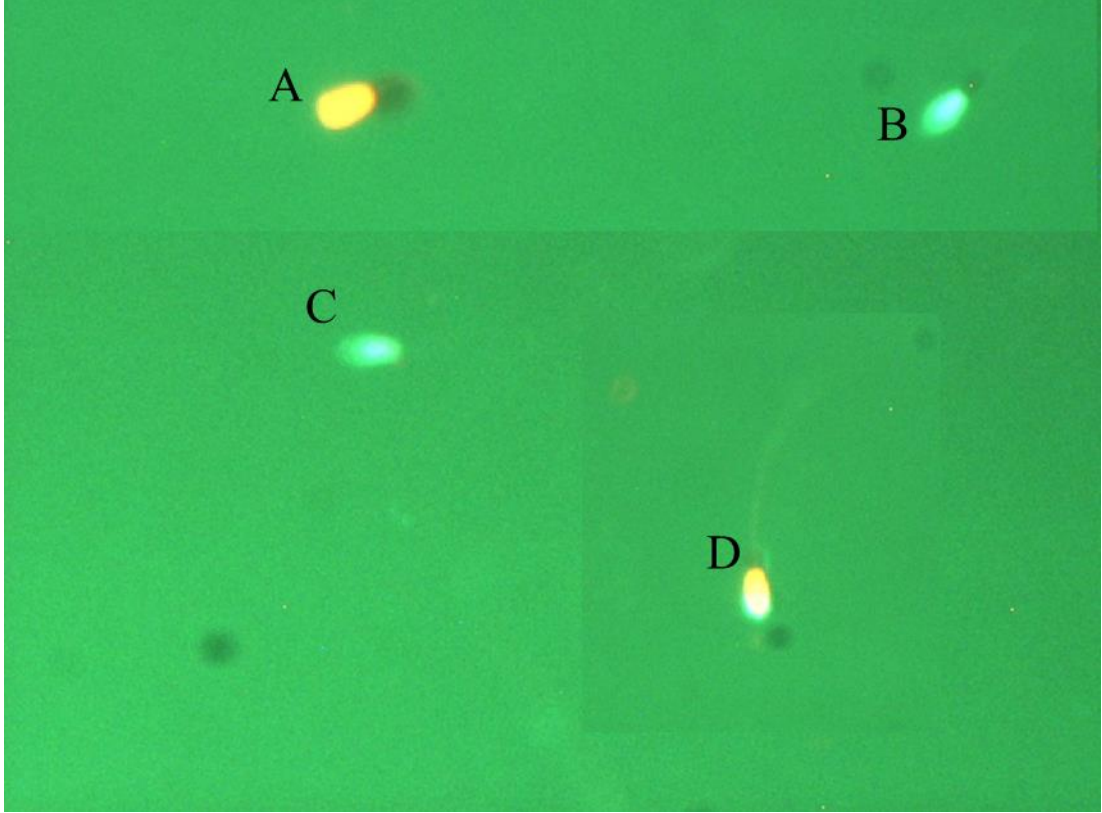


Şekil 2.3. Çözüm sonu aygır spermasının CASA ile Anormal Spermatozoon Oranı analizi (A: Orta kısım anomalisi; B: Normal spermatozoon; C: Akrozom anomalisi).

2.3.4 Plazma Membran Bütünlüğü ve Akrozom Sağlamlığı

Bu parametre SYBR-14/PI/FITC-PNA (L-7011, Thermo Fisher Scientific; L7381, Sigma-Aldrich) üçlü boyama yöntemi ile yapıldı (Glazar, 2014; Cocchia ve ark., 2011). Çözdürülen payetler dereceli tüpler içerisinde alınarak yoğunlukları 20×10^6 spermatozoon/ml olana kadar fosfatlı tampon solüsyon (PBS) ile sulandırıldı. Bir endorf tüp içerisinde 100 µl sperma, 30 µl Hancock solüsyonu ve 30 µl SYBR-14 karıştırılarak 37°C’de 10 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekten 5 µl alınarak bir lam üzerine damlatıldı ve üzeri 22x22 lamelle kapatılarak floresan ataçmalı mikroskop (Nikon ECLIPSE 50i) ve kamera (Basler®) ile incelendi. İncelemede post-akrozomal bölgesi yeşil parlama gösteren spermatozoonlar “plazma membranı sağlam”, kırmızı parlama gösteren spermatozoonlar “plazma membranı hasarlı” olarak; akrozomal bölgesi yeşil parlama gösteren spermatozoonlar “akrozomu sağlam”, kırmızı parlama gösteren spermatozoonlar “akrozomal bütünlüğü kaybolmuş” olarak sınıflandırıldı. Plazma membranı sağlam olarak değerlendirilen

spermatozoonların sayılan spermatozoon sayısına oranı Plazma Membran Bütünlüğü (%); akrozomu sağlam olarak değerlendirilen spermatozoonların sayılan spermatozoon sayısına oranı Akrozom Sağlamlığı (%) olarak belirlendi.



Şekil 2.5. Çözüm sonu aygır spermasının FITC/PNA/PI floresan boyama yöntemiyle Plazma Membranı - Akrozom Bütünlüğü ve Canlılık analizi (A: Plazma membranı hasarlı ve akrozom bütünlüğü bozulmuş spermatozoon; B: Plazma membranı sağlam ve akrozom bütünlüğü bozulmuş spermatozoon; C: Plazma membranı ve akrozomu sağlam spermatozoon; D: Plazma membranı hasarlı ve akrozomu sağlam spermatozoon).

2.3.5 Kapasitasyon indeksi

Kapasitasyon indeksi CTC (C4881, Sigma Aldrich) boyama yöntemiyle belirlendi (Cocchia ve ark., 2011). Bu yöntem için 2,5 mg CTC, 5 ml CTC tampon solüsyonu (3,634g TRIS, 0,50g Fruktöz, 1,998g Sitrik asit, 100ml bidistile su) içinde çözdürülerek CTC kapasitasyon boyası hazırlandı. Her bir payet çözdürüldükten sonra dereceli tüpler içerisinde alınarak yoğunlukları 20×10^6 spermatozoon/ml olana kadar fosfatlı tampon solüsyon (PBS) ile sulandırıldı. Suandırılan spermadan 45 μ l alınarak

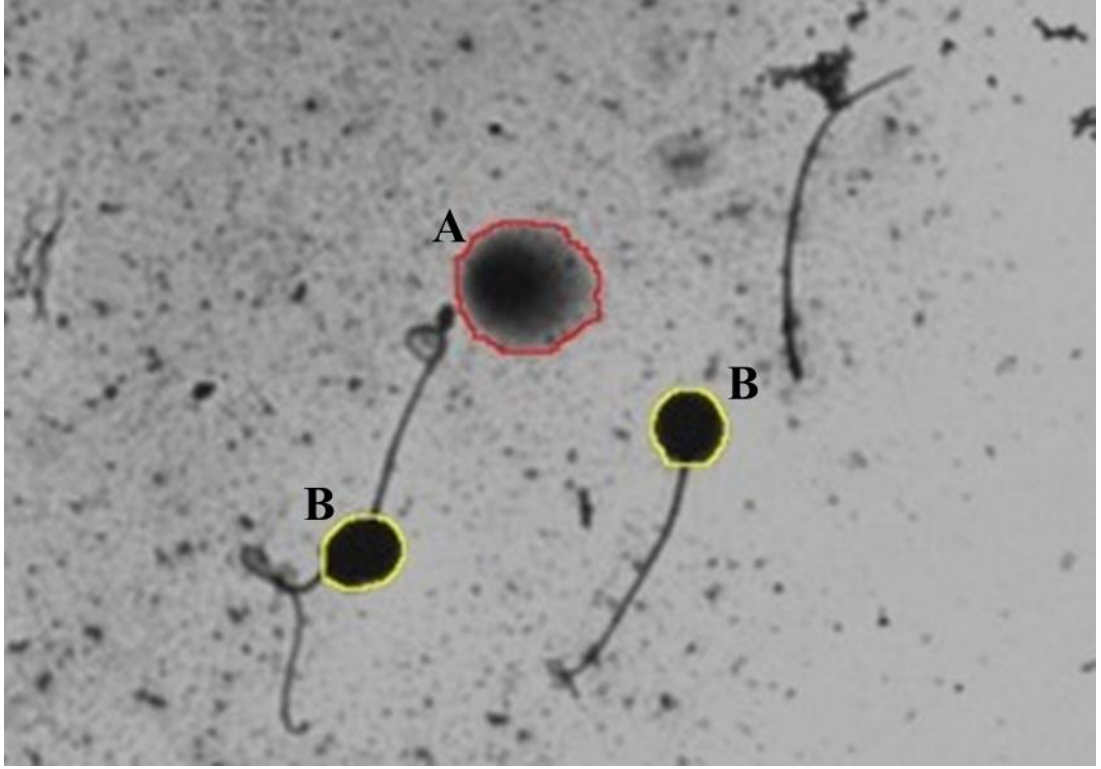
bir ependorf tüpe aktarıldı. Ardından spermatozoonların fikzasyonu amacıyla 10 µl Hancock solüsyonu eklendi. Son olarak da 45 µl CTC kapasitasyon boyama solüsyonu eklenen örnekten vakit kaybetmeden bir lam üzerine 5 µl damlatıldı ve üzeri 22x22 lamelle kapatıldı. Hazırlanan preparatlar florasan ataçmanlı mikroskop (Leica DM2500) ve kamera (Leica DFC 290) ile 10x100 büyütmede incelendi. Flouresan ışık altında baş kısmının bütünü yeşil olarak parlayan spermatozoonlar “kapasite olmayan”; post-akrozomal bölgesi veya baş bölgesi bütünüyle parlamayan spermatozoonlar “kapasite” olarak sınıflandırıldı. Kapasite olarak sınıflandırılan spermatozoonların sayılan spermatozoon sayısına oranı Kapasitasyon indeksi (%) olarak belirlendi.



Şekil 2.6. Çözüm sonu aygır spermasının CTC floresan boyama yöntemiyle Kapasitasyon indeksi analizi (A: Kapasite spermatozoon; B: Kapasite olmamış spermatozoon).

2.3.3 DNA Fragmentasyon İndeksi

DNA fragmentasyonları Halomax® kit (HT-EC40, Halotech DNA SL, Madrid, Spain) kullanılarak, üretici tarafından önerilen kullanım talimatlarına uygun şekilde belirlendi. Uygulamaya başlamadan önce kit içerisinde bulunan Reducing Agent (RA), Base Lysis Solution (BSL) ile 1/1000 oranında karıştırıldı. Agarose Cell Support'lar (ACS) sırasıyla 95-100°C'de 5 dk, 37°C'de 5 dk bekletilerek kullanıma hazır hale getirildi. Çözdürülen payetler dereceli tüpler içerisinde alınarak yoğunlukları 20×10^6 spermatozoon/ml olana kadar fosfatlı tampon solüsyon (PBS) ile sulandırıldı. Ardından bu örneklerden 25 µl alınarak 50 µl ACS içerisine aktarıldı. Daha sonra bu agaroz-sperma karışımından 2 µl alınarak lam üzerine damlatıldı ve üzeri 24x24 lamel ile kapatılarak +4°C'de 5 dakika metal yüzey üzerinde bekletildi. Bu işlemin ardından lamel dikkatlice kaldırıldıktan sonra preparat sırasıyla RA-BSL karışımı içerisinde 5 dakika, distile su içerisinde 5 dk, %70 ve %100'lük etanol içerisinde 2'ser dk bekletildi. Son olarak preparatlar Diff-Quik® boyama kiti (Microptic SL, Barcelona, Spain) içindeki solüsyon I'de 6 dk, ardından solüsyon II'de 6 dk bekletilerek işlem tamamlandı. Değerlendirmeler CASA, Sperm Class Analyzer (SCA® v.4.2) ile sisteme bağlı mikroskop (Nikon ECLIPSE 50i) ve kamera (Basler®) yardımıyla yapıldı. İncelemede kromatinleri merkezden çevreye doğru belirgin bir hale biçiminde dağılan spermatozoonlar "DNA'sı hasarlı", az miktarda ya da hiç kromatin dağılımına sahip olmayan spermatozoonlar "DNA'sı sağlam" olarak sınıflandırıldı. Hasarlı DNA'ya sahip spermatozoonların, sayılan toplam spermatozoon sayısına oranı DNA Fragmentasyon indeksi (%) olarak belirlendi.



Şekil 2.7. Çözüm sonu aygır spermasının CASA ile DNA fragmentasyon indekisi analizi. (A: Hasarlı DNA; B: Sağlam DNA).

2.4 İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilk testi, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler “Aritmetik Ortalama $\pm$ Std.hata” şeklinde gösterildi.

Toplam Motilite, Progresif Motilite, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF, Hiperaktivite, Toplam Anormal, Plazma Membran Bütünlüğü, Kapasitasyon, Akrozom Sağlamlığı ve DNA fragmentasyon oranları üzerine madde, doz ve bunların etkileşimlerinin etkisi aşağıdaki model kullanılarak MIXED prosedürü ile analiz edildi.

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

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

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

3. BULGULAR

Taze aygır spermasının muayenesi sonucunda, çalışmada kullanılan spermaların damızlık aygır spermatolojik özelliklerine uygun olduğu belirlendi. Alınan spermaların taze spermatolojik muayene sonuçları Çizelge 3.1’de belirtilmektedir.

Çizelge 3.1. Taze aygır sperması temel spermatolojik özellikleri (Arit.Ort.±SE).

Hacim (ml)	Yoğunluk (10 ⁶ /ml)	Total Motilite (%)	Anormal (%)	Ölü (%)	pH
36,10±15,73	253,75±38,74	68,50±9,50	28,90±10,81	7,00±2,00	7,69±0,30

Spermin ve Spermidin’in motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket özellikleri üzerine etkisinin incelendiği analizlerde Spermin ve Spermidin’in tüm parametreler için madde ve doz etkileşimi istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlendi ($p>0,05$). Motilite, Progresif Motilite, STR, WOB, ALH, BCF ve Hiperaktivite parametrelerinde doz etkisi bakımından var olan farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Kontrol grubuna göre Spermin’in etkisi incelendiğinde en yüksek motilite oranı 2 mg/ml, progresif motilite oranı 0,2 mg/ml dozunda, STR değeri 1 mg/ml ve WOB değeri 2 mg/ml doz gruplarında elde edildi. Aynı parametreler için Spermidin’in en etkili dozu ise 0,4 mg/ml grubunda gözlemlendi. Çalışma sonuçlarına göre en düşük ALH, BCF ve hiperaktivite değerleri 4 mg/ml Spermin ve Spermidin içeren sulandırıcı gruplarından elde edildi. Bu iki maddenin aynı dozlarının motilite, progresif motilite ve hareket özellikleri üzerine etkisi anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0,05$). Aygır sperması dondurulmasında, sulandırıcıya eklenen 6 farklı dozda Spermin ve Spermidin’in çözüm sonu motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket özellikleri üzerindeki etkileri Çizelge 3.2, 3.3 ve 3.4’te sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Kontrol ve deney gruplarına ait çözüm sonu motilite ve progresif motilite bulguları (Arit.Ort.±SE).

										P		
										Madde	Doz	M*D
TMOT (%)	Sp	55,9 ± 3,47 ^{ab}	57,26 ± 3,37 ^a	58,67 ± 3,29 ^a	54,39 ± 3,62 ^{ab}	48,88 ± 3,97 ^b	59,07 ± 2,24 ^a	34,12 ± 3,54 ^c				
	Spd		57,01 ± 3,48 ^a	57,33 ± 3,49 ^a	58,67 ± 4,01 ^a	46,66 ± 3,52 ^b	55,77 ± 3,69 ^{ab}	29,54 ± 4,11 ^c	0,499	<0,001	0,823	
PMOT (%)	Sp	19,5 ± 1,85 ^{ab}	21,44 ± 2,17 ^a	22,7 ± 1,88 ^a	20,51 ± 2,08 ^{ab}	16,48 ± 1,65 ^b	20,02 ± 1,42 ^{ab}	11,06 ± 1,67 ^c				
	Spd		21,38 ± 1,97 ^a	21,94 ± 1,9 ^a	22,83 ± 2,20 ^a	16,44 ± 1,57 ^b	20,47 ± 1,88 ^{ab}	9,12 ± 1,44 ^c	0,996	<0,001	0,918	

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

Çizelge 3.3 Kontrol ve deney gruplarına ait çözüm sonu çizgisel hareket parametreleri bulguları (Arit.Ort.±SE).

		P									
		0	0,1 mg	0,2 mg	0,4 mg	1 mg	2 mg	4 mg	Madde	Doz	M*D
VCL (µm/s)	Sp	33,12 ± 1,60	31,42 ± 1,75	32,00 ± 0,98	32,05 ± 1,35	32,73 ± 1,45	31,45 ± 1,29	31,91 ± 2,11	0,910	0,719	0,683
	Spd		31,41 ± 1,01	31,14 ± 0,92	32,49 ± 1,22	29,71 ± 1,12	32,03 ± 1,14	34,20 ± 2,33			
VSL (µm/s)	Sp	11,13 ± 0,65	11,71 ± 0,97	11,45 ± 0,56	11,51 ± 0,77	10,40 ± 0,61	11,39 ± 0,58	9,58 ± 0,46	0,910	0,719	0,683
	Spd		11,20 ± 0,45	11,05 ± 0,42	11,97 ± 0,69	9,92 ± 0,40	11,53 ± 0,73	8,70 ± 0,44			
VAP (µm/s)	Sp	19,16 ± 0,94	18,77 ± 1,26	19,13 ± 0,76	19,02 ± 1,00	18,26 ± 0,84	18,78 ± 0,84	17,43 ± 0,97	0,627	0,080	0,963
	Spd		18,65 ± 0,68	18,30 ± 0,67	19,54 ± 0,88	17,46 ± 0,73	19,17 ± 0,94	16,81 ± 0,70			

Çizelge 3.4 Kontrol ve deney gruplarına ait çözüm sonu doprusal ve hiperaktif hareket özellikleri bulguları (Arit.Ort.±SE).

		P									
		0	0,1 mg	0,2 mg	0,4 mg	1 mg	2 mg	4 mg	Madde	Doz	M*D
LIN (%)	Sp	33,70 ± 1,03	36,55 ± 1,10	35,56 ± 1,04	35,40 ± 0,96	32,06 ± 1,40	36,22 ± 1,08	31,63 ± 1,82			
	Spd		35,55 ± 0,65	35,38 ± 0,68	36,52 ± 1,12	33,51 ± 0,83	35,62 ± 1,43	28,00 ± 2,32	0,627	0,080	0,963
STR (%)	Sp	57,99 ± 1,02 ^{ab}	61,46 ± 0,89 ^a	59,55 ± 0,94 ^{ab}	59,87 ± 0,88 ^{ab}	56,66 ± 1,38 ^{bc}	60,50 ± 0,90 ^a	55,77 ± 1,69 ^{bc}			
	Spd		59,92 ± 0,71 ^{ab}	60,31 ± 0,55 ^a	60,72 ± 0,96 ^a	56,99 ± 0,79 ^{bc}	59,52 ± 1,03 ^{ab}	52,80 ± 2,55 ^c	0,390	<0,001	0,562
WOB (%)	Sp	57,91 ± 0,77 ^a	59,27 ± 1,14 ^a	59,55 ± 0,98 ^a	58,97 ± 0,93 ^a	56,13 ± 1,46 ^a	59,67 ± 0,96 ^a	55,79 ± 1,90 ^b			
	Spd		59,27 ± 0,55 ^a	58,65 ± 0,93 ^a	59,91 ± 0,92 ^a	58,72 ± 0,98 ^a	59,46 ± 1,34 ^a	51,4 ± 2,39 ^b	0,660	<0,001	0,150
ALH (µm)	Sp	3,46 ± 0,07 ^a	3,28 ± 0,09 ^{ab}	3,24 ± 0,09 ^{ab}	3,20 ± 0,09 ^{ab}	2,97 ± 0,17 ^b	3,31 ± 0,06 ^a	2,82 ± 0,26 ^b			
	Spd		3,21 ± 0,09 ^{ab}	3,21 ± 0,13 ^{ab}	3,29 ± 0,08 ^{ab}	3,07 ± 0,11 ^b	3,29 ± 0,06 ^{ab}	2,94 ± 0,26 ^b	0,663	<0,001	0,987
BCF (Hz)	Sp	4,71 ± 0,35 ^{ab}	5,23 ± 0,28 ^a	5,09 ± 0,34 ^a	5,37 ± 0,32 ^a	3,86 ± 0,42 ^b	5,59 ± 0,29 ^a	2,65 ± 0,44 ^c			
	Spd		4,96 ± 0,32 ^a	5,20 ± 0,33 ^a	4,95 ± 0,34 ^a	4,44 ± 0,34 ^{ab}	5,19 ± 0,38 ^a	2,58 ± 0,45 ^c	0,685	<0,001	0,694
Hiperaktif (%)	Sp	5,29 ± 0,71 ^a	5,94 ± 1,18 ^a	5,58 ± 0,48 ^a	4,97 ± 0,71 ^{ab}	5,73 ± 0,67 ^a	6,16 ± 0,59 ^a	3,35 ± 0,53 ^b			
	Spd		6,45 ± 0,60 ^a	5,40 ± 0,51 ^a	6,78 ± 0,70 ^a	4,15 ± 0,50 ^{ab}	5,41 ± 0,82 ^a	2,93 ± 0,48 ^b	0,786	<0,001	0,140

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

Çözüm sonu anormal yapısal özellikler açısından yapılan muayenede Kontrol grubu ile Spermin içeren deney grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Spermidin grupları ve Kontrol grubu arasındaki farklılıklar istatistiksel anlam ifade ederken en düşük toplam anormal spermatozoon oranı 0,2 mg/ml dozda sulandırıcıya katılan Spermidin ile elde edildi. Spermin ve Spermidin'in 0,2 mg/ml uygulamalarının istatistiksel olarak farklı doz etkisine sahip olduğu belirlendi ($p<0,05$). Dondurulan aygır spermalarının çözüm sonu yapısal özellikleri incelendiğinde 0,1 mg/ml Spermin ve 4 mg/ml Spermidin'in istatistiksel olarak Kontrol grubuna göre daha yüksek akrozom sağlamlığı oranına sahip olduğu belirlendi ($p<0,05$). Ayrıca 0,1 mg/ml, 2 mg/ml ve 4 mg/ml dozlarında Spermin ve Spermidin'in madde ve doz etkileşiminin istatistiksel olarak farklı olduğu sonucu elde edildi ($p<0,001$). Plazma membran bütünlüğünün, 1 mg/ml Spermin uygulamasıyla en yüksek değere sahip olduğu belirlendi ($p<0,05$). Spermidin uygulamaları ile kontrol grubu arasında ise anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Plazma membran bütünlüğü açısından deney grupları ile Kontrol grubu arasında madde ve doz etkileşimi değerlendirmesinde farklı maddelerin aynı dozları arasında istatistiksel bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$). Kapasitasyon indeksinin, tüm deney gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ve düşük olduğu belirlenirken 2 mg/ml Spermin ve 4 mg/ml Spermidin eklenen sulandırıcıların Spermin ve Spermidin grupları içinde en düşük kapasite spermatozoon oranlarına sahip olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). Kapasitasyon indeksi için madde ve doz etkileşimi analizinde Spermidin'in 0,2 mg/ml dozunun Spermin'in aynı miktardaki dozuna göre istatistiksel olarak daha düşük değere sahip olduğu belirlendi ($p<0,05$). Çözüm sonu en düşük DNA fragmentasyon indeksi 1 mg/ml Spermin ile 4 mg/ml Spermidin içeren sulandırıcı gruplarında elde edildi. Doz etkisi açısından elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Spermin ve Spermidin'in farklı dozları arasında DNA fragmentasyon indeksi için madde ve doz etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği belirlendi ($p>0,05$).

Çizelge 3.5 Kontrol ve deney gruplarına ait çözüm sonu anormal, ölü, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve DNA fragmentasyonu oranları.

										P		
		0	0,1 mg	0,2 mg	0,4 mg	1 mg	2 mg	4 mg	Madde	Doz	M ^w D	
Toplam Anormal (%)	Sp	26,3 ± 1,13 ^{ab}	25,75 ± 1,31	27,35 ± 0,8 ^A	25,9 ± 1,01	27,85 ± 1,04	26,9 ± 0,85	29,9 ± 1,4	0,957	0,002	0,048	
	Spd		27,8 ± 1,15 ^{ab}	23,75 ± 1,13 ^{b, B}	27,9 ± 0,99 ^{ab}	26,3 ± 1,77 ^{ab}	28,4 ± 1,33 ^a	29,7 ± 1,06 ^a				
Plazma Membran Bütünlüğü (%)	Sp	70,14 ± 0,55 ^{ab}	66,71 ± 1,02 ^{b, B}	70,44 ± 0,51 ^{ab}	67,51 ± 0,87 ^{ab}	71,67 ± 1,32 ^a	68,34 ± 1,11 ^{ab}	71,43 ± 0,86 ^a	0,678	0,076	0,047	
	Spd		69,77 ± 1,32 ^A	69,86 ± 1,07	68,63 ± 1,66	69,66 ± 1,39	70,93 ± 0,88	68,87 ± 0,9				
Kapasitasyon (%)	Sp	44,4 ± 0,4 ^a	39,4 ± 0,98 ^b	38,9 ± 0,91 ^{b, A}	38,79 ± 1,03 ^b	33,8 ± 0,76 ^c	32,45 ± 0,64 ^c	32,66 ± 0,73 ^c	0,219	<0,001	0,026	
	Spd		39,04 ± 1,06 ^b	35,24 ± 0,65 ^{b, B}	39,31 ± 1,02 ^b	31,81 ± 1,14 ^c	34,85 ± 0,8 ^c	31,76 ± 1,17 ^c				
Akrozom Sağlamlığı (%)	Sp	60,40 ± 1,97 ^{abc}	66,00 ± 2,26 ^{a, A}	59,64 ± 1,3 ^{bc}	56,25 ± 0,95 ^c	59,64 ± 1,96 ^{bc}	64,78 ± 1,01 ^{ab, A}	59,29 ± 1,14 ^{bc, B}	0,015	0,006	<0,001	
	Spd		56,07 ± 0,90 ^{b, B}	59,87 ± 1,71 ^{ab}	56,64 ± 1,22 ^b	60,94 ± 0,87 ^{ab}	56,42 ± 1,01 ^{b, B}	63,5 ± 1,33 ^{a, A}				
DNA Fragmentasyonu (%)	Sp	14,45 ± 1,06 ^a	11,41 ± 0,64 ^b	11,39 ± 0,94 ^b	11,24 ± 1,00 ^b	9,36 ± 0,85 ^{bc}	9,38 ± 0,87 ^{bc}	9,77 ± 0,69 ^{bc}	0,683	<0,001	0,076	
	Spd		9,44 ± 0,95 ^{bc}	9,36 ± 0,66 ^{bc}	12,44 ± 1,44 ^b	10,60 ± 0,76 ^b	10,77 ± 1,12 ^b	8,76 ± 0,65 ^c				

a, b, c: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,05).

A, B: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,05).

4. TARTIŞMA

Aygır spermasının dondurulmasında elde edilen başarı birçok faktör nedeniyle çeşitlilik göstermektedir. Bu konuda kullanılan protokol, sulandırıcı, yöntem ve teknikler üzerinde birçok çalışma yapılmış ve her birinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bahsedilen bu çeşitlilik ve farklılıklar nedeniyle yapılan çalışmaları birbiriyle karşılaştırmak araştırmacıları zorlamaktadır. Tüm bu araştırmalar sayesinde elde edilen tek sonuç ise aygır sperması dondurma başarısının bireysel özelliklere bağlı olması olmuştur. Hatta sperma dondurulabilirliğinde belirleyici olanın taze spermanın spermatolojik özellikleri ve fertilité başarısı olmadığı; taze sperma kalitesi ve tohumlama başına gebelik oranı yüksek olan bir aygırın dondurulmuş çözdürülmüş spermasının spermatolojik değerleri ve fertilité başarısının düşük olabileceği bildirilmektedir. Farklı aygırlar arasındaki sperma dondurma başarısının bu kadar çeşitlilik göstermesinin altında yatan mekanizma ise hala tam olarak ortaya koyulabilmiş değildir. Aygır sperması dondurulması üzerine bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda, bir popülasyonda bulunan aygırların ancak %20'sinin spermasının “iyi dondurulabilir” özelliğe sahip olduğu, %60'ının “kabul edilebilir”, %20'sinin ise “kötü dondurulabilir” olduğu ortaya koyulmuştur (Guimaraes ve ark., 2015).

Erkek hayvanlarda eklenti bezlerinde ve testiküler dokularda üretilen, dolayısıyla seminal plazmada bulunan Spermin ve Spermidin adlı poliaminlerin, spermatozoa yaşamı ve fonksiyonları üzerinde olumlu etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışma, Spermin ve Spermidin'in aygır sperması dondurulmasında kullanılan standart sulandırıcıya eklenmesiyle dondurma başarısını artırabileceği düşünülerek planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda kontrol ve deney grubu sulandırıcıları ile dondurulan aygır spermalarının çözüm sonu motilite, progresif motilite, spermatozoon hareket parametreleri, anormal spermatozoon oranı, plazma membran bütünlüğü, kapasitasyon, akrozom sağlamlığı ve DNA fragmentasyonu oranları belirlenerek karşılaştırılmış; Spermin ve Spermidin'in aygır sperması dondurulmasında başarıyı artırabilecek bir dozu olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Motilite kelime anlamı olarak hareketlilik anlamına gelmektedir. Spermatolojik parametrelerden biri olan spermatozoon motilitesi ise herhangi bir hareket özelliği gösteren spermatozoonların oranı olarak tanımlanmaktadır. Motilite genel olarak sperm popülasyonunun canlılığını ve metabolik aktivitesini yansıtan bir parametre olması dolayısıyla spermatolojik muayene protokolü içinde önemli bir parametredir. Çözüm sonu >%40 motiliteye sahip aygır spermaları “iyi dondurulabilen” olarak sınıflandırılmaktadır. Kesin olmamakla birlikte motilite ve fertilizasyon kapasitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu birçok çalışmada belirtilmiş olmasına rağmen spermanın fertilite kapasitesi hakkında doğru bir yargıya varılabilmesi için diğer parametrelerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (Colenbrander ve ark., 2003; Jasko ve ark., 1992; Katila, 2001; Loomis ve Graham, 2008; Samper ve ark., 1991; Tırpan ve ark., 2015). Yapılan çalışmada çözüm sonu motilite verileri incelendiğinde Spermin ve Spermidin’in çözüm sonu aygır sperması motilite oranında madde ve doz etkileşimi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Spermin ve Spermidin gruplarından 2 mg/ml Spermin (%59,07) ve 0,4 mg/ml Spermidin (%58,67) içeren sulandırıcılar ile dondurulan aygır spermaları en yüksek çözüm sonu motilite oranına sahip olduğu belirlenmiş olsa da bu değerler istatistiksel olarak Kontrol grubuyla benzerlik göstermektedir. En düşük motilite oranları ise 4 mg/ml dozda Spermin ve Spermidin içeren sulandırıcı gruplarına aittir ($p<0,001$).

Farklı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda çözüm sonu aygır spermasının motilite değerleri %43-63 arasında, geniş bir aralıkta değiştiği görülmektedir (Clulow ve ark., 2008; Hoffmann ve ark., 2011; Kavak ve ark., 2003; Ramires Neto ve ark., 2013; Squires ve ark., 2004). Yapılan çalışmada da diğer araştırmacıların bulduğu sonuçlara benzer veriler elde edilmiş; Kontrol grubunun belirtilen aralıkta bir çözüm sonu motiliteye (%55,9) sahip olduğu belirlenmiştir. Doz etkisi açısından 2 mg/ml Spermin (%59,07), 0,4 mg/ml Spermidin (%58,67) dozda sulandırıcıya eklendiği deney gruplarının Kontrol ve diğer deney gruplarından yüksek çözüm sonu motiliteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında 4 mg/ml dozda sulandırıcıya katılan Spermin ve Spermidin gruplarına ait çözüm sonu motilite oranları (%34,12; %29,54) değerlendirildiğinde çözüm sonu aygır sperması motilite özelliğini

istatistiksel olarak anlamlı ve olumsuz yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Kontrol ve deney grupları arasında madde ve doz etkileşimi yönünden anlamlı bir farklılık bulunmaması, standart aygır sperması sulandırıcısına katılan Spermin ve Spermidin'in aygır sperması dondurulmasında motiliteye olan etkisinin iki madde için de aynı doğrultuda olduğunu göstermektedir.

Progresif motilite, spermatozoonun bir yönde, ileri ve güçlü hareket özelliğini tanımlamaktadır ve toplam motilitenin aksine, genel hareketlilik ya da canlılıktan farklı olarak, spermatozoonun hareket kalitesini ifade eden bir parametredir. Progresif motilite ve fertilite arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir (Colenbrander ve ark., 2003; Loomis ve Graham, 2008). Çözüm sonu %35'ten yüksek progresif motilite oranına sahip aygır spermaları "iyi dondurulabilir" olarak sınıflandırılmaktadır (Amann ve Pickett, 1987; Vidament ve ark., 1997). Fakat aygır spermatozoonunun türe özgü özellikleri olarak kabul edilen asimetrik baş yapısı, kuyruğun apikal yerleşimi, küçük hacimli akrozom ve boyun kısmında bulunan mikrotubuler yapılar, spermatozoonların hareket biçimlerini etkileyerek aygır spermasında bilinen anlamda progresif hareketi etkilemekte ve bu oranın düşük olmasına neden olabilmektedir (Katila, 2001). Kenney ve ark., (1983) bir aygırın spermatolojik muayenesinde tek başına progresif motilitenin değerlendirilmesinin ya da yüksek progresif motilite beklentisinin yanıltıcı olabileceğini bildirmişlerdir. Amann ve Pickett (1987) tarafından yapılan bir çalışmada çözüm sonu >%35 progresif motiliteye sahip aygır spermaları ile farklı zamanlarda gerçekleştirilen suni tohumlamalarda %8 ile %61 arasında değişen gebelikler elde edilmiştir. Yapılan çalışmada toplam motiliteyle benzer olarak 4 mg/ml Spermin (%11,06) ve Spermidin (%9,12) en düşük değerlere sahiptir ($p<0,001$). Tüm deney grupları ve kontrol grubu arasında madde ve doz etkileşimi yönünden anlamlı bir farklılık gözlenmemiş olsa da doz etkisi açısından gruplar arasındaki farklılıklar anlamlı olup 0,2 mg Spermin (%22,70) ve 0,4 mg Spermidin'in (%22,83) yüksek fakat Kontrol grubuyla benzer progresif motilite değerine sahip olduğu belirlenmiştir.

Aygır sperması dondurulması üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde çözüm sonu progresif motilite değerlerinin genel olarak %30'dan yüksek değerler elde

edildiği görülmüştür (Aurich ve ark., 1996; Clulow ve ark., 2008; Hoffmann ve ark., 2011; Kuisma ve ark., 2006; Saragusty ve ark., 2007). Yapılan çalışmada progresif motilite açısından en yüksek değerler 0,2 mg/ml Spermin ve 0,4 mg/ml Spermidin içeren sulandırıcılardan elde edilmiş olmasına rağmen (%22,70; %22,83) diğer çalışmalarda elde edilen progresif motilite değerlerinin (>%30) ve “iyi dondurulabilir” olarak sınıflandırılan progresif motilite oranının (>%35) altında kalmıştır. Bu konuda gerçekleştirilen birkaç çalışmada ise %20-25 arasında elde edilen çözüm sonu progresif motilite değerlerinin yapılan çalışmadan elde edilen değerlere yakın olduğu gözlemlenmiştir (Alvarenga ve ark., 2012; Ramires Neto ve ark., 2013). Yapılan çalışmanın deney grupları ile kontrol gurubu arasında doz etkisi yönünden ortaya çıkan farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı olsa da çalışmada kullanılan aygırların spermatolojik özellikleri açısından düşük progresif motilite özelliğine sahip olduğu; bu nedenle çözüm sonu progresif motilite oranlarının normalin altında kaldığı sonucuna ulaşılabilir. Ayrıca bu durum standart aygır sperması sulandırıcısına katılan 0,2 mg/ml Spermin ve 0,4 mg/ml Spermidin’in progresif motilite üzerinde, toplam motiliteye benzer olarak olumlu etki oluşturduğunu göstermektedir. Öte yandan en düşük progresif motilite oranı sonucunun elde edildiği 4 mg/ml Spermidin’in aygır sperması üzerinde zararlı etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kontrol ve deney grupları arasında madde ve doz etkileşimi yönünden anlamlı bir farklılık bulunmaması, standart aygır sperması sulandırıcısına katılan Spermin ve Spermidin’in aygır sperması dondurulmasında progresif motiliteye olan etkisinin iki madde için de aynı doğrultuda olduğunu göstermektedir.

Bilgisayar destekli sperma analizi (CASA), subjektif muayeneye göre daha güvenilir, tarafsız ve tekrar edilebilir bir objektif muayene yöntemidir. Bunun yanında aktivasyon durumunu veya oosite ulaşma yeteneğini yansıtmaları sayesinde spermatozoonun yaptığı hareketi motilite ve progresif motilite dışında farklı açılardan değerlendirmeye olanak sağlayabilmektedir (Colenbrander ve ark., 2003). Fakat bu analizler kullanılan ekipman, cihaz ve analiz yazılımına göre sonuçlar arasında farklılık gösterebilmektedir. Her cihaz ve yazılımın kendine özgü alt ve üst limitleri, analiz formülasyonları ile farklı algoritmalar üzerinden değerlendirme yapması nedeniyle normal veya anormal spermatozoon hareketi hakkında standart bir değer

ortaya koyulamamıştır (Katila, 2001). Bir spermatozoonun birim zamanda bir noktadan diğerine gidişi sırasında kat ettiği gerçek yolda ilerlerken sahip olduğu hızı ifade eden eğri-çizgisel hız (VCL), kat ettiği ortalama yolda sahip olduğu hızı ifade eden ortalama yol hızı (VAP) ve kat ettiği yolun başlangıç ve bitiş noktası arasındaki en kısa mesafeyi geçebilmesi için sahip olması gereken hızı ifade eden doğru-çizgisel hız (VSL) parametreleri spermatozoonun ne kadar hızlı hareket ettiğinin anlaşılabilmesi için ölçülen parametrelerdir. Çizgisellik (LIN: VSL/VCL), doğrusallık (STR: VSL/VAP) ve yalpalama (WOB: VAP/VCL) parametreleri, spermatozoonun birim zamanda iki nokta arasında ilerlemesi sırasında yaptığı hareketin ne kadar doğrusal olduğunu ifade eden hareket özelliği parametreleridir. Spermatozoonun gerçek yol ilerleyişini yaparken ortalama yol çizgisinden lateral olarak ne kadar uzaklaştığını ifade eden yalpalama büyüklüğü (ALH) ile bu iki yol çizgisinin birim zamanda kaç defa kesiştiğini ifade eden kesişim frekansı (BCF) parametreleri hiperaktif hareket özelliği ile yakından ilişkili parametrelerdir. Dişi genital kanalda kapasitasyonun başlamasıyla ortaya çıktığı bilinen hiperaktif hareket özelliği, in vitro ortamda da indüklenen kapasitasyon ya da kapasitasyon benzeri değişiklikler nedeniyle oluşmaktadır. Kapasitasyon veya kapasitasyon benzeri değişikliklerle doğru orantılı olması nedeniyle, spermatolojik muayenelerde elde edilen ALH, BCF ve hiperaktivite değerlerinin düşük olması istenmektedir. Bataille ve ark. (1990), spermatozoon hareket özelliklerinden VAP ile fertilite arasında bir korelasyon olduğunu belirtirken; Palmer ve Magistrini (1992) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada hiçbir hareket karakterinin fertilite üzerinde belirleyici olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Spermatozoa hareket özellikleri, incelenen spermanın kalitesi hakkında detaylı fikir vermesi açısından kullanışlı parametreler olsa da normal ya da anormal spermatozoa hareket özelliklerinin tam olarak neyi ifade ettiği hala bilinmezliğini korumaktadır. Bu durumun en önemli nedeni spermatozoa hareket parametreleri için standart bir ölçüm kriterinin belirlenmemiş olmasıdır. Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlarda VCL, VSL, VAP ve LIN parametrelerinde istatistiksel olarak bir fark bulunmamaktadır. Kontrol grubu ile arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak benzer olmakla birlikte; STR parametresinde 0,1 mg/ml Spermin ve 0,4 mg/ml Spermidin

içeren sulandırıcı gruplarında daha yüksek sonuç elde edilmiştir. En yüksek WOB değeri 2 mg/ml Spermin ve 0,4 mg/ml Spermidin gruplarına aittir. Kontrol grubu ile 4 mg/ml Spermin ve Spermidin içeren sulandırıcı grupları arasında ALH, BCF ve Hiperaktivite değerleri açısından belirlenen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı ve daha düşüktür. Artan Spermin ve Spermidin miktarının kapasitasyonu baskılayıcı etkisinin gözlemlendiği; bu sayede hiperaktif spermatozoa oranını azalttığı düşünülmektedir. Diğer yandan bu sonucun, toplam ve progresif motilite değerlerinin de en düşük olduğu gruplardan elde edildiği göz önüne alındığında, hareket eden toplam spermatozoa sayısı az olduğu için yanıltıcı olabileceği düşünülmektedir.

Dondurulmuş çözündürülmüş aygır spermasının CASA yardımıyla değerlendirildiği çalışmalarda spermatozoon hareket özelliklerinden VCL 127,8-149,3 $\mu\text{m/s}$ arasında ölçülmüştür (Alvarenga ve ark., 2012; Hoogewijs ve ark., 2012; Kavak ve ark., 2003). Doğru-çizgisel hız (VSL) ve VAP parametrelerinin farklı çalışmalarda sırasıyla 18,75-75,8 $\mu\text{m/s}$ ve 28,34-88,9 $\mu\text{m/s}$ arasında geniş bir değer aralığında ölçüldüğü gözlenmiştir (Alvarenga ve ark., 2012; Consuegra ve ark., 2018; Guimaraes ve ark., 2015; Hoogewijs ve ark., 2012; Kavak ve ark., 2003; Mantovani ve ark., 2002). Yapılan çalışmada aynı parametreler için ölçülen değerler dikkate alındığında VCL ($\sim 32 \mu\text{m/s}$), VSL ($\sim 11 \mu\text{m/s}$) ve VAP ($\sim 19 \mu\text{m/s}$) parametrelerinin diğer kaynaklardan tamamen farklı ve daha düşük değerlere sahip olduğu göze çarpmaktadır. Yapılan çalışmada elde edilen STR (0,1 mg/ml Spermin; %61,46) ve LIN (0,1 mg/ml Spermin; %36,55) değerleri, çeşitli çalışmalarda ölçülen çözüm sonu aygır sperması STR (%65,52-82,80) ve LIN (%40,7-52,4) değerlerinden daha düşük olmasına rağmen bu farklılıkların daha kabul edilebilir seviyede olduğu görülebilmektedir (Consuegra ve ark., 2018; Guimaraes ve ark., 2015; Hoogewijs ve ark., 2012; Mantovani ve ark., 2002). Hoogewijs ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada çözüm sonu aygır sperması ALH ve BCF parametreleri değerlendirilmiş ve sırasıyla 5,2 μm ve 4,1 Hz olarak belirlenmiştir. Consuegra ve ark. (2018) ise aynı parametreler için sırasıyla 1,7 μm ve 6,3 Hz değerlerini elde etmişlerdir. Bu sonuçlar yapılan çalışmadan elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında ALH (4 mg/ml Spermidin; 2,82 μm) ve BCF (4 mg/ml Spermidin; 2,58 Hz) değerlerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Çalışmadan elde edilen en düşük hiperaktif motil spermatozoon oranı %2,83 ile 4

mg/ml Spermidin içeren sulandırıcı grubunda bulunmaktadır. Bu sonuç diğer çalışmalardan elde edilen hiperaktivite oranının oldukça altındadır (Kavak ve ark., 2003). Farklı CASA sistemleri ile yapılan farklı çalışmalar incelendiğinde WOB parametresinin yalnızca Sperm Class Analyzer (SCA) model CASA sistemiyle ölçüldüğü görülmüştür. Dondurulmuş aygır spermasının çözüm sonu hareket özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla SCA kullanılan bir çalışmada elde edilen WOB değerinin (%76.0), yapılan çalışmada elde edilen WOB değerinin (%59,91) üstünde olduğu görülmüştür (Consuegra ve ark., 2018). Spermatozoon hareket özellikleri açısından referans alınan kaynaklarda kullanılan CASA sistemlerinin, hem birbirlerinden hem de yapılan çalışmada kullanılan sistemden farklı olmasının, tüm çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesinin birincil nedeni olduğu düşünülmektedir. Yine incelenen çalışmalara ait sonuçlar değerlendirildiğinde farklı CASA sistemlerinden elde edilen sonuçların birbiriyle karşılaştırılması yanlış değerlendirmeler yapılmasına neden olabilir. Öte yandan STR, LIN gibi oran olarak ifade edilen parametrelerde çalışmalar arasındaki farklılıkların birbirine daha yakın olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum farklı CASA sistemlerinin VCL, VAP, BCF gibi ölçüm parametrelerini her ne kadar farklı algoritma ve formülasyonlarla hesaplasalar da aslında aynı sonuca ulaştırdıklarını göstermektedir. Consuegra ve ark. (2018) tarafından gerçekleştirilen ve benzer CASA sisteminin kullanıldığı araştırma dikkate alındığında yapılan çalışmadan elde edilen dondurulmuş çözdürülmüş aygır spermalarının daha kötü hareket özelliklerine sahip olduğu sonucuna ulaşılabilir. Fakat deney gruplarının kontrol grubuna göre daha iyi değerlere sahip olması, çalışmada kullanılan aygır spermalarının hareket özelliklerinin bu değerlere sahip olmasına rağmen sulandırıcıya eklenen Spermin ve Spermidin'in çözüm sonu spermatozoon hareket özellikleri üzerinde olumlu etkisinin olduğunu işaret etmektedir.

Spermin ve Spermidin'in farklı hayvan spermalarında invitro koşullarda motiliteyi direkt olarak arttırdığı, seminal plazmada bulunan poliamin konsantrasyonlarının motilite ve hareket özellikleri açısından belirleyici olduğu daha önceki çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Lefevre ve ark., 2011; Melendrez ve ark., 1992; Morales ve ark., 2003; Tabor ve Tabor, 1964). Köpek ve manda sperması dondurulmasında ise sulandırıcıya katılan Spermin'in benzer olarak çözüm sonu

motilite ve hareket özelliklerini artırdığı bildirilmiştir (Setyawan ve ark., 2016; Siddique ve Atreja, 2013). Fakat yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde aygır sperması dondurulmasında Spermin ve Spermidin'in spermatozoon hareket özellikleri üzerindeki etkisi beklendiği şekilde etkili olmamakla birlikte bazı deney gruplarının bu özellikleri olumsuz yönde etkilediği sonucu elde edilmiştir. Diğer yandan poliaminlerle muamele edilmeden dondurulan Kontrol grubuna ait çözüm sonu motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket özellikleri değerlerinin de deney gruplarıyla benzer seviyelerde elde edilmiş olması Spermin ve Spermidin'in bu parametreler üzerindeki olumlu etkisini belirgin olarak ortaya çıkarabilecek bir ortam olmadığını işaret edebilir. Bu durum çalışmada kullanılan spermaların seminal plazmalarında motilite progresif motilite ve hareket özelliklerini desteleyecek Spermin ve Spermidin miktarının yeterli seviyede var olduğunu düşündürmektedir. Spermin'in çözüm sonu aygır sperması hareket özellikleri üzerinde düzensiz bir etkisi olduğu görülürken Spermidin'in 0,4 mg/ml dozda daha kararlı bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Poliaminler daha önce aygır sperma dondurma sulandırıcısına katılmamış olduğundan, çözüm sonu aygır sperması motilite ve diğer hareket özellikleri değerleri, poliaminlerin aygır spermasının kriyoprezervasyonunda kullanımı konusunda önemli bir bilgi niteliği taşımaktadır.

Sperma kalitesinin belirlenmesinde kullanılan muayene yöntemlerinden bir tanesi de spermatozoanın morfolojik yapısı açısından değerlendirilmesidir. Morfolojik olarak normal spermatozoa oranının fertilitiyle pozitif korelasyona sahip olduğu bildirilmektedir. Spermatozoa baş yapısındaki farklılıklar anormal kromatin yapısının bir işareti olarak değerlendirilmektedir. Orta kısım ve kuyruk yapısındaki anomalilerin ise hareket yeteneğini kısıtlaması nedeniyle fertiliti üzerinde olumsuz etkileri olduğu düşünülmektedir. Aygır spermatozoonunun yapısal özelliklerinden olan apikal kuyruk yerleşimi ve asimetric baş yapısı diğer türlerden farklı olarak anomali değerlendirmesine katılmamaktadır. Yine de bir spermada bulunan yüksek oranda morfolojik anomali tek başına fertiliti potansiyelinin tahmininde anlam ifade etmemesine rağmen var olan bir fertiliti düşüklüğünde dikkate alınması gereken bir parametre olarak nitelendirilmektedir. Ortalama bir damızlık aygır spermasında anormal spermatozoon oranının %50'nin altında olması beklenir (Brito, 2007; Brito

ve ark., 2011; Graham, 1996; Phetudomsinsuk ve ark., 2008; Varner, 2008). Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre Spermin eklenen sulandırıcı grupları ile Kontrol grubu arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamsızdır. En düşük toplam yapısal anomali (%23,75) 0,2 mg/ml Spermidin içeren sulandırıcı grubunda bulunmasına rağmen Kontrol grubu (%26,30) ile arasında istatistiksel bir fark bulunmamaktadır. Spermin'in 4 mg/ml dozlarına ait anormal spermatozoon oranları Kontrol grubu ile benzerlik gösterirken 0,2 mg/ml Spermidin grubundan farklı ve daha yüksektir. Spermin ve Spermidin'in 0,2 mg/ml dozları arasında madde ve doz etkileşimi anlamlı farklılık göstermektedir. Bu veriler değerlendirildiğinde Spermin ve Spermidin'in aygır spermasında dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında yapısal anomali oluşumuna engel olamadığı, herhangi bir dozunun belirgin bir biçimde spermatozoon anomalilerine karşı etkili bir koruma sağlayamadığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

Çözüm sonu aygır sperması morfolojisinin incelendiği çeşitli çalışmalarda ortalama %50 civarında normal spermatozoon oranı elde edilmiştir (Brito ve ark., 2011; Graham, 1996; Phetudomsinsuk ve ark., 2008). Arap aygırlarıyla yapılan farklı çalışmalarda ise Doğan ve ark. (2009) %27,57; Ghallab ve ark. (2017) %26,4 ve Shojaeian ve ark. (2018) %25,6 oranının anormal spermatozoon tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar yapılan çalışmada elde edilen anormal spermatozoon oranlarına benzerlik göstermektedir ve spermatozoa morfolojisinde ırkın belirleyici bir özellik olabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca Kontrol ve 0,2 mg/ml Spermidin grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak benzer olması, Spermin ve Spermidin'in aygır sperması dondurulmasında spermatozoon morfolojisi üzerinde koruyucu bir etkisinin olmadığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Spermatozoa plazma membranında meydana gelen hasarlar çoğunlukla hücre içi metabolik atık birikimi ve hücre dışı oksidasyondan kaynaklanmaktadır. Bu olgular hücre metabolizması üzerindeki toksik etkilerinin yanı sıra hücre zarının bütünlüğünü bozarak hücre ölümlerine neden olmaktadır. Aygır spermatozoonunun plazma membranında diğer türlere göre daha yüksek miktarda bulunan kolesterolün aygır spermasını bu tür metabolik oluşumlara daha duyarlı hale getirmektedir (Aurich, 2005; Watson, 1995). Bunun yanında spermanın işlenmesi, sıcaklık değişimlerine maruz

kalması da spermatozoon membranına mekanik olarak zarar vermektedir. Özellikle santrifüj ve soğuk şoku plazma membranı hasarının diğer nedenleri arasında sayılmaktadır. Hasarlı plazma membranı normalden daha akışkan hale gelmekte, değişen ozmotik basınçlara dayanıksızlaşmakta, seçici geçirgenlik özelliğini kaybetmekte ve sonuç olarak spermatozoonun fonksiyonunu ve canlılığını kaybetmesine neden olmaktadır (Neild ve ark., 2005). Bir spermatozoonun oositi fertilize edebilmesi için fertilizasyon bölgesine varana kadar membran bütünlüğünü ve canlılığını koruyabilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmada çözüm sonu plazma membran bütünlüğünü koruyan spermatozoa oranları açısından sulandırıcıya eklenen 1 mg/ml ve 4 mg/ml Spermin'in etkili olduğu görülse de kontrol sulandırıcısı ile arasındaki farklılıklar benzerdir ($p < 0,001$). Spermidin grupları ile kontrol sulandırıcısı arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0,05$). Ayrıca 0,2 mg/ml dozda Spermin ve Spermidin'in plazma membran bütünlüğünü korumada istatistiksel olarak anlamlı farklılığa sahip olduğu görülmüştür. Sayısal olarak en yüksek plazma membran bütünlüğü oranı 1 mg/ml Spermin eklenen sulandırıcı grubundan elde edilmiştir. Fakat bu oranın kontrol grubu ile arasındaki farklılığın istatistiksel olarak benzer olması Spermin ve Spermidin'in dondurma ve çözündürme işlemlerinin aygır spermatozoonlarında plazma membran bütünlüğünü koruyucu etkisinin olmadığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Plazma membran bütünlüğü de diğer parametrelerde olduğu gibi çalışmalar arasında oldukça geniş bir aralıkta (%50-80) değişmektedir (Baumber-Skaife ve ark., 2016; Consuegra ve ark., 2018; El-Sheshtawy ve ark., 2016; Ghallab ve ark., 2017; Hoogewijs ve ark., 2012; Moore ve ark., 2005a; Shojaeian ve ark., 2018). Bu çalışmalarda aygır spermasının plazma membran özelliklerini değerlendirmek amacıyla farklı yöntemler kullanılmış olsa da yöntemler arasında bu değerlendirmeyi etkileyecek bir farklılık olmadığı görülmüştür. Bu durum aygırlarda plazma membran bütünlüğünün de diğer spermatolojik parametrelerde olduğu gibi bireysel özelliklerden dolayı farklılaştığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Moore ve ark. (2005b) tarafından yapılan bir çalışmada ise "iyi dondurulabilir" ve "kötü dondurulabilir" aygır spermalarına ait plazma membran bütünlüğü parametresi incelenmiş, iki grup arasında plazma membran bütünlüğü açısından bir fark olmadığı

belirlenmiştir. Yapılan çalışmada Kontrol (%70,14) ve deney grupları arasındaki farkların benzer olduğu ve plazma membran bütünlüğü oranlarının dar bir aralıkta değiştiği (%71,67-66,70) gözlemlenmiştir. Farklı hayvan türlerinde in vitro kültür ortamlarında; köpek ve manda sperması dondurulmasında sulandırıcıya katılan Spermin ve Spermidin'in plazma membran bütünlüğünü koruduğu bildirilmiş olsa da yapılan çalışmada aygır sperması dondurulmasında bu özelliğini gösteremediği anlaşılmıştır (Rubinstein ve ark., 1995; Setyawan ve ark., 2016; Siddique ve Atreja, 2013).

Kapasitasyon, fizyolojik olarak spermatozoonun dişi genital kanalla teması ile başlayan; membran proteinlerinin ve fosfolipidlerinin organizasyonu, membran kolesterol seviyesinin değişimi, hiperaktivite gibi fiziksel ve kimyasal değişikliklerin tümünü içeren kısaca spermatozoonun fertilizasyon kapasitesi kazanmasını ifade eden kolektif bir terimdir. Spermanın dondurulması için geçirmek zorunda olduğu işlemler ve düşük sıcaklığa maruz kalması, membran yapısına zarar vererek kapasitasyon benzeri değişikliklere neden olabilmektedir. Dişi genital kanalda başlaması gereken kapasitasyonun çeşitli dış faktörler nedeniyle gerekenden önce başlaması spermanın fertilizasyon başarısını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu faktörlerden bir tanesi de spermanın işlenmesi ve dondurulması olarak bilinmektedir (Bergqvist ve ark., 2011; Pommer ve ark., 2002; Schembri ve ark., 2002). Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre 0,2 mg/ml Spermidin (%35,24) ile 1, 2, 4 mg/ml Spermin (%33,80; %32,45; %32,66) ve Spermidin (%31,81; %34,85; %31,76) dozlarının membran stabilizasyonunu sağlayarak kapasitasyon ve kapasitasyon benzeri değişiklikleri etkin bir biçimde engellediği görülmektedir. Ayrıca tüm deney grupları Kontrol grubundan düşük kapasitasyon spermatozoon oranına sahiptir. En düşük kapasite spermatozoa oranı ise 4 mg/ml Spermidin grubunda elde edilmiştir.

Aygır spermasının çözüm sonu kapasitasyon oranlarının incelendiği çalışmalarda %20,0-41,9 arasında değişen değerler elde edildiği bildirilmiştir (Kavak ve ark., 2003; Neild ve ark., 2003; Sieme ve ark., 2003; Schembri ve ark., 2002). Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre tüm deney guruplarının kapasite spermatozoon oranları bu araştırmalarla benzer değerler göstermektedir. En düşük

kapasite spermatozoon oranı ise 4 mg/ml Spermidin içeren gruptan (%31,76) elde edilmiştir. Kontrol grubuna ait çözüm sonu ortalama kapasite spermatozoon oranı (%44,40) ise belirtilen değerlerin üstünde kalmıştır. Rubinstein ve ark. (1995), farklı hayvan türlerine ait spermatozoonlarda membran stabilizasyonunu sağlayarak Spermin ve Spermidin'in prematür kapasitasyonu baskıladığını bildirmiştir. Köpek sperması dondurulmasında ise sulandırıcıya katılan Spermin'in benzer olarak çözüm sonu kapasitasyon indeksini belirgin ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Setyawan ve ark., 2016). Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar çözüm sonu kapasitasyon oranlarının her ne kadar diğer araştırmacıların elde ettiği oranlarla benzerlik gösterse de Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0,2 mg/ml Spermidin ile 1, 2, 4 mg/ml Spermin ve Spermidin'in dondurma ve çözündürme etkisiyle oluşan kapasitasyon benzeri değişiklikleri engellediği açıkça görülmektedir.

Spermatozoonun fertilizasyon kapasitesine ulaşması için gerekli olan ve kısaca membran stabilizasyonunun bozulması olarak açıklanan kapasitasyonun devamında akrozom reaksiyonu gelişmektedir. Akrozom reaksiyonu spermatozoonun fertil yaşamının son basamağı olarak tanımlanabilir. Dış plazma mebranı ile dış akrozomal membran arasında çoklu birleşme bölgelerinin oluşması ile başlayan reaksiyon, akrozomal kesenin birleşme bölgelerinden açılarak spermatozoonun oosite ulaşması amacıyla korona hücrelerini geçip zona pellusidaya bağlanması için gerekli enzimlerin dış ortama çıkması şeklinde gerçekleşmektedir. Yani akrozom reaksiyonunun, spermatozoon oosite mümkün olan en yakın noktadayken başlaması gerekmektedir (Pommer ve ark., 2002). Akrozom reaksiyonunun başlamış olması spermatozoonun fertil yaşamının sonlandığını, fertilite kapasitesini kaybettiğini işaret etmektedir. Yapılan çalışmada Kontrol grubu ile istatistiksel olarak benzer olmakla birlikte sayısal olarak en yüksek akrozomu sağlam spermatozoon oranı 0,1 mg/ml Spermin (%66,00) grubundan elde edilmiştir. Ayrıca 0,1 mg/ml, 2 mg/ml ve 4 mg/ml Spermin ve Spermidin dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu; Spermin ve Spermidin'in akrozom sağlamlığı üzerine olan etkisinin aynı doğrultuda olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar aygır sperması dondurulmasında membran stabilizasyonu sağlayarak prematür kapasitasyonu etkin bir şekilde önleyen Spermin ve Spermidin'in

akrozom reaksiyonuna kadar ilerleyen membran değişimini onaramadığını göstermektedir.

Çözüm sonu aygır sperması akrozom reaksiyonu oranı mevcut araştırmalar arasında çeşitlilik göstermektedir. Bu araştırmalardan bazılarında akrozom reaktif spermatozoon oranının %30'un altında kaldığı bildirilirken; bazılarında akrozomu sağlan spermatozoon oranının %50'yi geçemediği görölmektedir (Consuegra ve ark., 2018; El-Badry ve ark., 2017; El-Sheshtawy ve ark., 2016; Ghallab ve ark., 2017; Moore ve ark., 2005a; Moore ve ark., 2005b; Shembri ve ark., 2002; Shojaeian ve ark., 2018). Aygır spermasının akrozom yapısı birçok farklı yöntem ve teknikle değerlendirilebildiği için bu kadar farklı sonuçlar elde edilmiş olduğu düşünölmektedir. Yapılan çalışmada en düşük akrozom reaktif spermatozoon oranı 0,1 mg/ml Spermin (%34,00) grubundan elde edilirken bu oran gruplar arasında %34,00 ile %43,75 arasında değişmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (%39,60) 0,1 mg/ml Spermin içeren sulandırıcının akrozom reaksiyonunu baskılamakta istatistiksel olarak olmasa da sayısal olarak etkili olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu durum aygırların bireysel olarak farklı akrozom yapılarına sahip olduğunu ya da dondurma ve özdürme işlemlerine bireysel seviyede farklı yanıtlar verdiğini düşünörmektedir.

Bütönlüğünü kaybetmiş spermatozoal DNA'nın tanımlanamayan erkek infertilitesinin bir nedeni olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Erken embriyonik ölümlerin fertilizasyon sağlayabilen fragmente DNA'ya sahip spermatozoondan kaynaklandığı görüşü gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Bu görüş embriyonik kayıpların yalnızca dişi infertilitesi olarak değerlendirilemeyeceğini; hasarlı spermatozoal DNA'dan da kaynaklanmış olabileceği düşünöncesini ortaya çıkarmaktadır. Spermatozoonun membran yapısı ve canlılığı sperma kalitesinin ölçölmesinde önemli parametreler olsalar da DNA bütönlüğü ile korelasyona sahip olmadığı dolayısıyla spermatozoonun kromatin yapısı hakkında bilgi vermedikleri yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Farklı hayvan türlerinde fragmente kromatin yapısı ile infertilite arasında güçlü bir ilişki olduğu bilinse de aygırlar için henüz böyle bir bilgi bulunmamaktadır (Lopez-Fernandez ve ark., 2007). Spermin ve Spermidin'in farklı dozlarının aygır sperması dondurulmasında faydalarının araştırıldığı bu

çalışmada 1, 2 ve 4 mg/ml Spermin (%9,36; %9,38; %9,77) ile 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml ve 4 mg/ml Spermidin (%9,44; %9,36; %8,76) gruplarının DNA bütünlüğünün korunmasında Kontrol ve diğer gruplardan daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Spermin ve Spermidin'in madde ve doz etkileşimi yönünden DNA fragmentasyonu üzerinde istatistiksel bir farklılık oluşturmaması bu maddelerin benzer dozlarda benzer etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

Ayır spermaları dondurulması üzerine yapılan benzer teknikler kullanılarak değerlendirilen çalışmalarda çözüm sonu DNA fragmentasyon indexi %14,2 ve %12,1 olarak belirlenmiştir (Hidalgo ve ark., 2017; Lopez-Fernandez ve ark., 2007). Ayrıca Kenney ve ark. (1995), DNA fragmentasyon indexinin fertilitéyle olan ilişkisini araştırdığı çalışmalarında ortalama %16 oranında fragmente DNA'ya sahip ayır spermalarının %86 gebelik başarısına sahip olduğu; DNA fragmentasyon indexi arttıkça gebelik başarısının düştüğü sonucuna ulaşmışlardır. Yapılan çalışmada standart sulandırıcı ile dondurulan Kontrol grubunun çözüm sonu DNA fragmentasyon indexinin (%14,45) diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzer düzeyde olduğu görülmüştür. Standart sulandırıcıya farklı dozlarda Spermin ve Spermidin eklenerek dondurulan deney gruplarından 1, 2 ve 4 mg/ml Spermin (%9,36; %9,38; %9,77) ile 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml ve 4 mg/ml Spermidin (%9,44; %9,36; %8,76) gruplarına ait çözüm sonu DNA fragmentasyon indexinin Kontrol grubu ve diğer çalışmalardan belirgin düzeyde düşük olduğu gözlenmiştir (Hidalgo ve ark., 2017; Kenney ve ark., 1995; Lopez-Fernandez ve ark., 2007). Farklı hayvan türlerinde Spermin ve Spermidin adlı poliaminlerin kromatin yapısını koruyucu özelliği yapılan çalışmalarda ortaya koyulmuştur (Cui ve Kim, 2005; Rubinstein ve Breitbart, 1991). İlk defa ayır spermaları dondurulmasında Spermin ve Spermidin'in kullanıldığı bu çalışmada, diğer çalışma sonuçlarını destekler nitelikte poliaminlerin spermatozoal DNA'yı etkin bir biçimde koruduğu sonucuna ulaşılabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışma sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde, aygır sperması dondurulmasında kullanılan standart sulandırıcıya eklenen Spermin ve Spermidin'in farklı dozlarda farklı spermatolojik parametreler üzerinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle söz konusu maddelerin sperması dondurulacak aygırda belirlenmiş bir spermatolojik probleme yönelik kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Toplam motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket parametreleri için 4 mg/ml Spermin ve Spermidin doz gruplarının olumsuz etkiye sahip olduğu kesin olarak belirlenmiştir. Diğer deney gruplarında ise Kontrol grubuna göre olumlu yönde etki gösteren ve istatistiksel olarak farklı olan Spermin ya da Spermidin dozu bulunmamaktadır. Ayrıca Spermin ve Spermidin'in aynı dozları arasında madde ve doz etkileşimi yönünden istatistiksel olarak farklılık bulunmadığından bu iki maddenin bahsi geçen parametreler üzerinde benzer etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Fakat motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket parametreleri üzerinde sayısal olarak daha iyi ve daha kararlı sonuçlar elde edildiği gözlemlenen 0,4 mg/ml dozda Spermidin'in standart aygır sperması dondurma sulandırıcısına eklenmesinin bu parametreler açısından fayda sağlayabileceği söylenebilir.

Çalışma verilerine göre çözüm sonu yapısal özellikler açısından Spermin ya da Spermidin adlı poliaminlerin sulandırıcıya katılabilecek uygun bir dozunu belirlemek zordur. Toplam anormal spermatozoon oranı, plazma membran bütünlüğü ve akrozom sağlamlığı parametrelerinde deney grupları ve kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark bulunmamakla birlikte poliaminlerin en belirgin etkileri kapasitasyon ve DNA fragmentasyon indeksi parametrelerinde öne çıkmaktadır. Öyle ki Spermin ve Spermidin'in standart aygır sperması sulandırıcısına eklenen tüm dozları, kapasitasyon ve DNA fragmentasyonu oluşumunu Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ve etkin biçimde baskılamıştır. Çözüm sonu kapasitasyon oranlarında 1 mg/ml ve üzeri dozda sulandırıcıya katılan Spermin ve Spermidin'in Kontrol ve diğer deney

gruplarından daha iyi sonuçlara sahip olduğu belirlenmiştir. Spermin ve Spermidin'in 4 mg/ml dozunun spermatozoon hareket özellikleri üzerinde olumsuz etkiye sahip olması dolayısıyla aygır sperması dondurulmasında sulandırıcıya eklenecek 1 veya 2 mg/ml Spermin ve Spermidin'in kapasitasyon ve kapasitasyon benzeri değişiklikleri baskılayacağı sonucuna ulaşılmıştır. Çözüm sonu fragmente DNA oranları açısından tüm deney gruplarının, kendi aralarında benzer, Kontrol grubundan farklı ve daha iyi sonuçlara sahip olduğu belirlenmiştir. En düşük DNA fragmentasyon oranı 4 mg/ml Spermidin içeren sulandırıcı grubunda bulunmuştur. Fakat spermatozoon hareket özellikleri üzerinde olumsuz etkiye sahip olması nedeniyle 4 mg/ml Spermin ve Spermidin dışındaki tüm dozların DNA fragmentasyonunu önlemek amacıyla aygır sperması sulandırıcısına katılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak, aygır sperması dondurulmasında standart sulandırıcıya eklenebilecek en uygun poliaminin ve miktarının; DNA fragmentasyonu ve kapasitasyon oranlarını belirgin şekilde düşürmesinin yanında diğer spermatolojik parametreler açısından da istatistiksel olarak olumsuz bir etkisi bulunmadığı belirlenen, 1 veya 2 mg/ml Spermin ve Spermidin olduğu belirlenmiştir.

Metabolik ve yapısal muayeneler sonucunda öne çıkan iki dozun (1-2 mg/ml), yapılan çalışmanın iki ardışık dozu olması, bu dozlar arasında kalan miktarlardan daha faydalı ve tek bir doz elde edilebileceği ihtimalini ortaya çıkarmakta ve bu konuda yapılacak çalışmalar için yeni bir araştırma sahası yaratmaktadır. Ayrıca bu konuda yapılacak diğer çalışmalarda kullanılacak hayvan materyalinin spermasında bulunan Spermin ve Spermidin miktarlarının belirlenmesi ve çalışma planının bu miktarlara göre yapılması, konuya farklı bir bakış açısı kazandıracaktır. Spermin ve Spermidin ile işlem görmüş aygır spermasından elde edilecek *in vivo* ya da *in vitro* fertilite verileri, spermaya eklenecek en uygun dozun belirlenmesinde büyük öneme sahiptir.

ÖZET

Ayır Sperması Dondurulmasında Sulandırıcıya Eklenen Spermin ve Spermidin'in Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi

Ayır, dondurulmuş sperma başarısı düşük olan türlerdendir. Bu nedenle ayır sperması dondurulmasında çözüm sonu başarıyı artırabilecek yöntem, teknik ve sulandırıcıların optimizasyonu, üzerinde çalışılması gereken bir konudur. Bu çalışmada ayır sperma dondurma sulandırıcısına ilave edilen Spermin ve Spermidin adlı poliaminlerin ayır spermasının uzun süreli saklanması ve çözüm sonu spermatolojik parametreler üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve standart sulandırıcıya (INRA 96, yumurta sarısı, gliserol) katılabilecek en uygun poliamin ve miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 4 baş ergin Arap ayır kullanıldı. Ayırlardan iki günde bir suni vajina yöntemiyle sperma alındı. Alınan spermalar 13 eşit hacme bölündü. Kontrol ve deney grubu sulandırıcılarıyla sulandırılarak donduruldu. Kontrol sulandırıcısı olarak INRA96 (%95,5), yumurta sarısı (%2) ve gliserol (%2,5) kullanıldı. Deney grubu sulandırıcıları ise kontrol sulandırıcısına farklı dozlarda Spermin ve Spermidin (0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml; 4 mg/ml) eklenerek hazırlandı. Kontrol ve deney grubu sulandırıcılarıyla dondurulan ayır spermaları çözündürülerek motilite, progresif motilite, spermatozoon hareket özellikleri, anormal spermatozoon oranı, plazma membran bütünlüğü, kapasitasyon indeksi, akrozom sağlamlığı ve DNA fragmentasyon indeksi parametreleri açısından muayene edildi. Çalışma her bir ayır için 5 defa tekrar edildi. Muayeneler sonucunda motilite, progresif motilite ve spermatozoon hareket özellikleri bakımından Spermin'in farklı dozlarının, Spermidin'in ise 0,4 mg/ml dozunun sayısal olarak daha olumlu sonuçlar gösterdiği; fakat bu sonuçların istatistiksel olarak Kontrol grubuyla benzer olduğu belirlendi. Aynı parametreler için 4 mg/ml Spermin ve Spermidin eklenen sulandırıcı gruplarının diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ve düşük değerlere sahip olduğu belirlendi ($p<0,001$). Anormal spermatozoon oranı, plazma membran bütünlüğü ve akrozom sağlamlığı parametrelerinde deney gruplarıyla Kontrol grubu arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak benzer olduğu belirlenirken, kapasitasyon ve DNA fragmentasyon indeksleri açısından tüm deney gruplarının Kontrol grubuna göre daha düşük ve istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklara sahip olduğu belirlendi ($p<0,001$). Sonuç olarak çözüm sonu ayır sperması hareket yeteneğini sayısal olarak artıran 0,4 mg/ml Spermidin'in; diğer spermatolojik özelliklere zarar vermeden kapasitasyon ve DNA fragmentasyonu üzerinde etkin bir koruma sağladığı belirlenen 1-2 mg/ml Spermin veya Spermidin'in ayır sperması dondurulmasında sulandırıcıya eklenerek ayır sperması dondurma başarısının artırılacağı belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Ayır, Poliamin, Sperma dondurma, Spermidin, Spermin.

SUMMARY

Effects of Spermine and Spermidine Added Extenders on Post-thaw Spermatological Parameters in Stallion Semen Cryopreservation

Stallions are species which have low success in semen cryopreservation. Therefore, optimization of the method, technique and extenders that could increase the success in stallion semen cryopreservation is a study field that has necessity to work on. In the study, effects of polyamines, which are named Spermine and Spermidine, on long term preservation and post-thaw spermatological parameters were evaluated; and the most suitable polyamine and its dose that can be added to standard extender (INRA 96, egg yolk, glycerol) were aimed. Four adult Arabian stallions were used in the study. Semen were collected from stallions via artificial vagina once in two days. Then, semen were divided 13 aliquots. They were frozen in control and experimental extenders after extantion. INRA96 (95,5%), egg yolk (2%), glycerol (2,5%) were used as Control extender. Extenders of experimental groups were prepared as different doses of Spermine and Spermidine (0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml; 4 mg/ml) added control extenders. Stallion semen that were cryopreserved with Control and experimental extenders were evaluated in terms of motility, progressive motility, spermatozoon movement traits, abnormal spermatozoon rate, plasma membrane integrity, capacitation index, acrosome integrity and DNA fragmentation index. The study was repeated for 5 times for each stallion. At the end of the evaluations it was determined that different doses of Spermine and 0,4 mg/ml Spermidine showed better motility, progressive motility and spermatozoon movement traits, numerically. However these results were found statistically similar. On the other hand, it was obtained that 4 mg/ml Spermine and Spermidine had the lowest and statistically significant values ($p<0,001$). While statistically similar differences were obtained between Control and experimental groups in abnormal spermatozoon rate, plasma membrane integrity and acrosome integrity parameters; it was determined that all experimental groups had lower and statistically significant values in terms of capacitation and DNA fragmentation index ($p<0,001$). As result, stallion semen cryopreservation success can be increased by addition 0,4 mg/ml Spermidine that had numerically better kinetic traits or 1-2 mg/ml Spermine or Spermidine that had effective protection on capacitation and DNA fragmentation index without damaging other spermatological properties.

Keywords: Polyamine, Semen cryopreservation, Spermine, Spermidine, Stallion.

KAYNAKLAR

- AKÇAY E (2008). The effects of seminal plasma, skim milk, and tyrodes solutions on survival of stallion sperm stored at 4 °C. *Turk J Vet Anim Sci*, **32(5)**: 379-384.
- AKÇAY E, DEMİRAL O, YILDIZ S (2007). Yarışlardan çıkarılmış Arap aygırlarında bazı androlojik muayeneler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **54 (1)**: 29-34.
- AKÇAY E, REILAS T, ANDERSSON M, KATILA T (2006). Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *Journal of Veterinary Medicine*, **53**: 481-485.
- AKSOY AR (2003). Hayvan Islahı Ders Notları. Kafkas Üniversitesi Basımevi, Kars.
- ALVARENGA MA, PAPA FO, CARMO MT, KIEVITSBOSCH T, CHAVES MMBC, NETO CR (2012). Methods of concentrating stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, **32(8)**: 424-429.
- AMANN RP, PICKETT BW (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, **7(3)**: 145-173.
- ANONİM (2018a). At. Erişim adresi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/At>, Erişim tarihi: 15.11.2018.
- ANONİM (2018b). Atçılığın Tarihçesi. Erişim adresi: <https://www.tigem.gov.tr/Sayfalar/Detay/6261fcf9-7bf7-463b-b5a4-032541351ce3>, Erişim tarihi: 20.11.2018.
- ANONİM (2018c). The stallion: breeding soundness examination & reproductive anatomy. Erişim adresi: <https://articles.extension.org/pages/29121/the-stallion:-breeding-soundness-examination-and-reproductive-anatomy>, Erişim tarihi: 20.11.2018.
- AUGUSTO C, GACEK F, ARTES R (1997). Seasonal variations in stallion sperm features and their relationship with fertility of the breeding stock. *Braz J vet Res anim Sci*, **34(3)**: 167-172.
- AURICH C (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **89(1-4)**: 65-75.
- AURICH JE, KÜHNE A, HOPPE H, AURICH C (1996). Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, **46(5)**: 791-797.

- AURICH JE, KÜHNE A, HOPPE H, AURICH C (1998). Effects of seminal plasma on stallion semen quality after cryopreservation. *J Reprod Fertil Abstr Ser*, **15**: 34.
- AVCI M, TIRPAN MB, TEKİN K, AKÇAY E (2016). The influence of insemination time, age and semen dose on fertility of mares inseminated with frozen semen. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **63(4)**: 359-364.
- BACHRACH U (2010). The early history of polyamine research. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 490-495.
- BATAILLE B, MAGISTRINI M, PALMER E (1990). Objective determination of sperm motility in frozen-thawed stallion semen. Correlation with fertility. Quoi de neuf en matière d'études et de recherches de le cheval? 16ème journée d'étude, 7 Mart, Paris, Fransa.
- BAUMBER-SKAIFE J, LOOMIS PR, TABERNER E, ALTHOUSE GC, SQUIRES EL (2016). Comparison of the determination of cell viability by the nuclecounter SP-100 and flow cytometry in frozen-thawed equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, **43**: 57.
- BERGQVIST AS, JOHANNISSON A, BÄCKGREN L, DALIN AM, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, MORRELL JM (2011). Single Layer Centrifugation of Stallion Spermatozoa through Androcoll™-E does not Adversely Affect their Capacitation-Like Status, as Measured by CTC Staining. *Reproduction in Domestic Animals*, **46(1)**: 74-78.
- BLACKSHEAR PJ, MANZELLA JM, STUMPOT DJ, WEN L, HUANG JK, ØYEN O, YOUNG WS (1989). High level, cell-specific expression of ornithine decarboxylase transcripts in rat genitourinary tissues. *Molecular Endocrinology*, **3(1)**: 68-78.
- BRINSKO SP, BLANCHARD TL, VARNER DD, SCHUMACHER J, LOVE CC (2011). Manual of Equine Reproduction (3rd Edition). Elsevier, Missouri, Amerika Birleşik Devletleri. Chapter 13.
- BRINSKO SP, CROCKETT EC, SQUIRES EL (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, **54(1)**: 129-136.
- BRITO LF (2007). Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, **6(4)**: 249-264.
- BRITO LF, GREENE LM, KELLEMAN A, KNOBBE M, TURNER R (2011). Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*, **76(4)**: 745-750.

- CLULOW JR, MANSFIELD LJ, MORRIS LHA, EVANS G, MAXWELL WMC (2008). A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **108(3-4)**: 298-308.
- COLENBRANDER B, GADELLA BM, STOUT TAE (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, **38(4)**: 305-311.
- CONSTANTINESCU GM (2007). Anatomy of reproductive organs. In: *Comparative Reproductive Biology*, Ed.: Schatten, H., Constantinescu, G.M., Blackwell Publishing, Iowa, Amerika Birleşik Devletleri. Chapter 2.
- CONSUEGRA C, CRESPO F, BOTTREL M, ORTIZ I, DORADO J, DIAZ-JIMENEZ M, PEREIRA B, HIDALGO M (2018). Stallion sperm freezing with sucrose extenders: A strategy to avoid permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, **191**: 85-91.
- CUI XS, KIM NH (2005). Polyamines inhibit apoptosis in porcine parthenotes developing in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, **70**: 471-477.
- ÇEBİ Ç (2013). Ekzogen olarak uygulanan ve spermaya katılan oksitosin ve prostaglandin hormonlarının aygır sperma kalitesi üzerine etkisi. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ÇEBİ ŞEN Ç, AKÇAY E (2015). The effect of oxytocin and prostaglandin hormones added to semen on stallion sperm quality. *Turk J Vet Anim Sci*, **39**: 705-708
- ÇEVİK M, TUNCER B (2005). Evcil hayvanlarda seminal plazmanın fiziko-kimyasal yapısı ve üreme fonksiyonları üzerindeki etkileri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **45(2)**: 63-72.
- DANZIN C, JUNG MJ, GROVE J, BEY P (1979). Effect of α -difluoromethylornithine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, on polyamine levels in rat tissues. *Life Sciences*, **24(6)**: 519-524.
- DE LEEUW FE, CHEN HC, COLENBRANDER B, VERKLEIJ AJ (1990). Cold – induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, **27**: 171-183.
- DOGAN I, NUR Z, POLAT U (2009). Correlations between seminal plasma enzyme activities and semen parameters in seminal fluid of Arabian horses. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **10(2)**: 119-124.
- EL-BADRY DA, EL-MAATY AMA, GAMAL A (2017). The effect of trehalose supplementation of INRA-82 extender on quality and fertility of cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, **48**: 86-92.

- EL-SHESHTAWY RI, EL-BADRY DA, GAMAL A, EL-NATTAT WS, ALMAATY AMA (2016). Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **5(4)**: 331-334.
- GEBAUER MR, PICKETT BW, FAULKNER LC, REMMENG EE, BERNDTSON WE (1976). Reproductive physiology of the stallion. VII. Chemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa. *Journal of Animal Science*, **43**: 626-632.
- GERLACH T, AURICH JE (2000). Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*, **58(3-4)**: 197-213.
- GHALLAB AM, SHAHAT AM, FADL AM, AYOUB MM, MOAWAD AR (2017). Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology*, **79**: 14-20.
- GRAHAM JK (1996). Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **12(1)**: 131-147.
- GUIMARAES T, LOPES G, PINTO M, SILVA E, MIRANDA C, CORREIA MJ, DAMASIO L, THOMPSON G, ROCHA A (2015). Colloid centrifugation of fresh stallion semen before cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affecting seminal kinetics. *Theriogenology*, **83(2)**: 186-191.
- HARRIS JM, IRVINE CHG, EVANS MJ (1983). Seasonal changes in serum levels of FSH, LH and Testosterone and in semen parameters in stallions. *Theriogenology*, **19(3)**: 311-322.
- HEISE A, KÄHN W, VOLKMANN DH, THOMPSON PN, GERBER D (2010). Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **118(1)**: 48-53.
- HIDALGO M, ORTIZ I, DORADO J, MORRELL JM, GOSÁLVEZ J, CONSUEGRA C, DIAZ-JIMENEZ M, PEREIRA B, CRESPO F (2017). Stallion sperm selection prior to freezing using a modified colloid swim-up procedure without centrifugation. *Animal Reproduction Science*, **185**: 83-88.
- HOFFMANN N, OLDENHOF H, MORANDINI C, ROHN K, SIEME H (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science*, **125(1)**: 112-118.
- HOFFMANN B, LANDECK A (1999). Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Animal Reproduction Science*, **57(1-2)**: 89-98.
- HOFFMANN N, OLDENHOF H, MORANDINI C, ROHN K, SIEME H (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science*, **125(1-4)**: 112-118.

- HOOGEWIJS MK, DE VliegHER SP, GOVAERE JL, DE SCHAUWER C, DE KRUIF A, VAN SOOM A (2012). Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. *Equine Veterinary Journal*, **44(5)**: 542-549.
- İLERİ K, AK İ, PABUÇÇUOĞLU S, BİRLER S (2008) Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. Ders Notları. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Masaüstü Yayıncılık Ünitesi, İstanbul.
- JANETT F, THUN R, NIEDERER K, BURGER D, HÄSSIG M (2003). Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*, **60(3)**: 453-461.
- JASKO DJ, LEIN DH, FOOTE RH (1990). Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987–1988). *J Am Vet Med Assoc*, **197**: 389–394.
- JASKO DJ (1992). Evaluation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **8(1)**: 129-148.
- JASKO DJ, MORAN DM, FARLIN ME, SQUIRES EL (1991). Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, **35(6)**: 1059-1067.
- JOHNSON L (1991). Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biol Reprod*, **44**: 284–291.
- JUYENA NS, STELLETTA C (2012). Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*, **33(4)**: 536–551.
- KARESKOSKI AM, RIVERA DEL ALAMO MM, GUVENC K, REILAS T, CALVETE JJ, RODRIGUEZ- MARTINEZ H, ANDERSSON M, KATILA T (2011). Protein composition of seminal plasma in fractionated stallion ejaculates. *Reproduction in Domestic Animals*, **46**: 79-84.
- KARESKOSKI M, KATILA T (2008). Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*, **107**: 249-256.
- KATILA T (2001). In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **42(2)**: 199-217.
- KATILA T, KARESKOSKI M (2006). Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkunde*, **22(2)**: 193-200.
- KATILA T, REILAS T, GÜVENC K, ALM K, ANDERSSON M (2004). The effect of seminal plasma on motility characteristics and viability of spermatozoa after cooled storage. Proceedings of the 3rd Meeting of the European Equine Gamete Group. 12-15 Ekim, Pardubice, Çekya.

- KAVAK A, JOHANNISSON A, LUNDEHEIM N, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, AIDNIK M, EINARSSON S (2003). Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, **76(3-4)**: 205-216.
- KENNEY RM, EVENSON DP, GARCIA MC, LOVE CC (1995). Relationships between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm, and seasonal pregnancy rate. *Biology of Reproduction*, **52**: 647-653.
- KENNEY RM, HURTGEN J, PIERSON R, WITHERSPOON D, SIMONS J (1983). Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. *Hastings Journal of Society for Theriogenology*, **9**: 100.
- KOSINIAK K (1975). Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, **23**: 59-61.
- KUISMA P, ANDERSSON M, KOSKINEN E, KATILA T (2006). Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **48(1)**: 14-21.
- KÜÇÜK O (2005). Aygır besleme ve üreme performansı. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2(2)**: 103-109.
- KWON H, WU G, BAZER FW, SPENCER TE (2003). Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus. *Biology of Reproduction*, **69**: 1626-1634.
- LEFEVRE PLC, PALIN MF, MURPHY BD (2011). Polyamines on the reproductive landscape. *Endocrin Reviews*, **32(5)**: 694-712.
- LOOMIS PR, GRAHAM JK (2008). Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, **105(1-2)**: 119-128.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ C, CRESPO F, ARROYO F, FERNÁNDEZ JL, ARANA P, JOHNSTON SD, GOSÁLVEZ J (2007). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. *Theriogenology*, **68(9)**: 1240-1250.
- MANTOVANI R, ROTA A, FALOMO ME, BAILONI L, VINCENTI L (2002). Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reproduction Nutrition Development*, **42(3)**: 217-226.
- McKINNON AO, SQUIRES EL, VAALA WE, VARNER DD (2011). Equine Reproduction (2nd Edition). Blackwell Publishing, Oxford, Birleşik Krallık.

- MELENDREZ CS, RUTTLE JL, HALLFORD DM, CHAUDHRY PS, CASILLAS ER (1992). Polyamines in ejaculated ram spermatozoa and their relationship with sperm motility. *Journal of Andrology*, **13(4)**: 293-296.
- MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA M, KORDAN W (2011). Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive process in mammals. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **14(3)**: 489-499.
- MOORE AI, SQUIRES EL, GRAHAM JK (2005a). Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, **51(3)**: 241-249.
- MOORE AI, SQUIRES EL, GRAHAM JK (2005b). Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, **63(9)**: 2372-2381.
- MORALES ME, RICO G, BRAVO C, TAPIA R, ALVAREZ C, MENDEZ JD (2003). Progressive motility increase caused by L-arginine and polyamines in sperm from patients with idiopathic and diabetic asthenozoospermia. *Ginecologia y obstetricia de Mexico*, **71**: 297-303.
- NEILD DM, GADELLA BM, CHAVES MG, MIRAGAYA MH, COLENBRANDER B, AGUERO A (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, **59(8)**: 1693-1705.
- NEILD DN, GADELLA BM, AGUERO A, STOUT TAE, COLENBRANDER B (2005). Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, **89(1-4)**: 47-56.
- PALMER E, MAGISTRINI M (1992). Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Veterinaria Scandinavica, Supplementum (Denmark)*, **88**: 137-152.
- PEGG AE, WANG X (2009). Mouse models to investigate the function of spermine. *Communicative & Integrative Biology*, **2(3)**: 271-274.
- PHETUDOMSINSUK K, SIRINARUMITR K, CHOOTHEA A, SUTHANMAPINUNT P, KORNKAEWRAT K, LAIKUL A, AMORNSAK S, PINYOPUMMIN A (2009). Freezability of Thai native crossbred horse semen in different extenders. *Board of Reviewing Editors*, **39(2)**: 105-114.
- POMMER AC, LINFOR JJ, MEYERS SA (2002). Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. *Theriogenology*, **57(5)**: 1493-1501.
- RAMIRES NETO C, MONTEIRO GA, SOARES RF, PEDRAZZI C, DELL'AQUA Jr JA, PAPA FO, CASTRO-CHAVES MM, ALVARENGA MA (2013). New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*, **79(7)**: 1120-1123.

- RIGBY SL, BRINSKO SP, COCHRAN M, BLANCHARD TL, LOVE CC, VARNER DD (2001). Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal Reproduction Science*, **68(3-4)**: 171-180.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H, KVIST U, ERNERUDH J, SANZ L, CALVETE JJ (2011). Seminal plasma proteins: What role do they play?. *American Journal of Reproductive Immunology*, **66(1)**: 11-22.
- ROSER JF (2001). Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Animal Reproduction Science*, **68(3-4)**: 139-151.
- ROSER JF (2008). Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science*, **107(3-4)**: 179-196.
- RUBINSTEIN S, BREITBART H (1991). Role of spermine in mamalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biochem J*, **278**: 25-28.
- RUBINSTEIN S, LAX Y, SHALEV Y, BREITBART H (1995). Dual effect of spermine on acrosomal exocytosis in capacitated bovine spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1266**: 196-200.
- RUIZ-CORTÉS ZT (2012). Gonadal sex steroids: production, action and interactions in mammals. In *Steroids - From Physiology to Clinical Medicine*. Ed.: Ostojic, S. InTech, Rijeka, Hirvatistan. Chapter 1.
- SALAZAR JL, TEAGUE SR, LOVE CC, BRINSKO SP, BLANCHARD TL, VARNER DD (2011). Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*, **76(3)**: 409-418.
- SAMPER JC, HELLANDER JC, CRABO BG (1991). Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, **44**: 107-114.
- SARAGUSTY J, GACITUA H, PETTIT MT, ARAV A (2007). Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reproduction in Domestic Animals*, **42(6)**: 610-615.
- SCHEMBRI MA, MAJOR DA, MAXWELL WMC, SUTTIE JJ, EVANS G (2002). Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reproduction, Fertility and Development*, **14(4)**: 225-233.
- SETYAWAN EMN, KIM MJ, OH HJ, KIM GA, JO YK, LEE SH, CHOI YB, LEE BC (2016). Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **479**: 927-932.

- SHOJAEIAN K, NOURI H, KOHRAM H (2018). Does MnTBAP ameliorate DNA fragmentation and in vivo fertility of frozen-thawed Arabian stallion sperm?. *Theriogenology*, **108**: 16-21.
- SIDDIQUE RA, ATREJA SK (2013). Effect of L-Arginine and spermine-NONOate on motility, viability, membrane integrity and lipid peroxidation of Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Livestock Science*, **153**: 147-153.
- SIEME H, MARTINSSON G, RAUTERBERG H, WALTER K, AURICH C, PETZOLDT R, KLUG E (2003). Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reproduction in Domestic Animals*, **38(2)**: 134-140.
- SÖNMEZ M (2007). Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Androloji. Ders Notları. Üniversitesi Basımevi, Elazığ, Türkiye.
- SQUIRES EL, KEITH SL, GRAHAM JK (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, **62(6)**: 1056-1065.
- TABOR H, TABOR CW (1964). Spermidine, spermine, and related amines. *Pharmacological Reviews*, **16(3)**: 245-300.
- TIRPAN MB, AKÇAY E, ÇEBİ Ç, AKŞEN Ü, YILDIRIM S, TEKİN N (2015). In vitro evaluation of short-term preserved stallion semen in different doses and temperatures. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **21(4)**: 539-544.
- VARNER DD (2003). Methods for evaluation of stallion for breeding soundness. Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, 1-2 Şubat, Pisa, İtalya.
- VARNER DD (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, **70(3)**: 448-462.
- VARNER DD, BLANCHARD TL, LOVE CL, GARCIA MC, KENNEY RM (1987). Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, **28(5)**: 709-723.
- VIDAMENT M, DUPERE AM, JULIENNE P, EVAIN A, NOUE P, PALMER E (1997). Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, **48(6)**: 907-917.
- WATSON PF (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, **7(4)**: 871-891.
- WEBER JA, WOODS GL (1993). Ultrasonographic measurement of stallion accessory sex glands and excurrent ducts during seminal emission and ejaculation. *Biology of Reproduction*, **49**: 267-273.

WEINER KX, DIAS JA (1992). Developmental regulation of ornithine decarboxylase (ODC) in rat testis: comparison of changes in ODC activity with changes in ODC mRNA levels during testicular maturation. *Biology of Reproduction*, **46(4)**: 617-622.

WILLIAMS-ASHMAN HG, LOCKWOOD DH (1970). Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **171**: 882-894.

YENER SM, GÜCÜYENER Ö, ÖZBEYAZ C (2006). Horse breeding in Turkey. Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 17-20 Eylül 2006, Antalya, Türkiye.

YILMAZ O (2012). Türkiye Yerli At Irkları ve Bir Koruma Çalışması. *YYÜ Tar Bil Derg*, **22(2)**: 117-133

EKLER

Ek-1 Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı



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

TOPLANTI TARİHİ : 02/03/2016
TOPLANTI NO : 2016-6
DOSYA NO : 2016-59
KARAR NO : 2016-6-67

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Necmettin Tekin'in yaptığı, araştırmacı olarak Arş.Gör.Kemal Tuna Olğaç'ın katıldığı "Aygır Sperması Dondurulmasında Sulandırıcıya Eklenen Poliaminlerin Çözüm Sonu Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiştir. Söz konusu çalışma, 15 Şubat 2014 tarihli Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğinin, 8 inci maddesinin sekizinci fıkrasının (k) bendi kapsamında ele alınmış olup, çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu iznine tabi değildir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatih CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

	Anabilim Dalı			
Uzm.Vet.Hek.Attila IŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	<i>Atıl</i>
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	<i>Osman</i>
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	<i>Aygun</i>

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Kemal Tuna
Soyadı : OLGAÇ
Doğum yeri ve tarihi : ANKARA / 23.02.1989
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Bekâr
Askerlik durumu : Yapıldı
İletişim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Altındağ/Ankara 0312 317 0315/4243

II- Eğitimi

2007-2012 :Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Lisans) / ANKARA
2003-2007 : Etimesgut Anadolu Lisesi / ANKARA
1996-2003 : Yunus Emre İlköğretim Okulu / ANKARA
Yabancı dili : İngilizce

III- Ünvanları

2012 : Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2013-Devam ediyor : Araştırma Görevlisi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
2012-2013 : T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimler Derneği
Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Derneği
Cryobiology

VI- Bilimsel İlgi Alanları

TIRPAN MEHMET BORGA, GÜRLER HAKAN, OLGAÇ KEMAL TUNA, DASKIN ALI (2018). Effects of boron added bull semen extender on some post-thaw spermatological parameters. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 65(2), 123-128., Doi: 10.1501/Vetfak_0000002837

İNANÇ MUHAMMED ENES, TEKİN KORAY, AKKURT MUSTAFA YENAL, OLGAÇ KEMAL TUNA, YILMAZ BURAK, ÇİL BESTE, TASDEMİR UMUT, TUNCER PÜRHAN BARBAROS, BÜYÜKLEBLEBİCİ SERHAT, UYSAL ONGUN, ÇINAR KUL BENGİ (2018). Genomewide association of male reproductive traits in Aksaray Malaklı dogs. *Reproduction In Domestic Animals*, 53(6), 1555-1562., Doi: 10.1111/rda.13302

TIRPAN MEHMET BORGA, TEKİN KORAY, ÇİL BESTE, ALEMDAR HAVVA, İNANÇ MUHAMMED ENES, OLGAÇ KEMAL TUNA, STELLETTA CALOGERO, DASKIN ALİ (2018). The effects of different PMSG doses on estrus behavior and pregnancy rate in Angora goats. *animal*, 1-6., Doi: 10.1017/S1751731118001908

İNANÇ MUHAMMED ENES, TEKİN KORAY, OLGAÇ KEMAL TUNA, YILMAZ BURAK, ÇİL BESTE, TASDEMİR UMUT, TUNCER PÜRHAN BARBAROS, BÜYÜKLEBLEBİCİ SERHAT, DURMAZ EMRE, UYSAL ONGUN (2018). Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on semen cryopreservation of Aksaray Malaklı shepherd dogs of different ages. *ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE*, 193, 191-200., Doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.068

İNANÇ MUHAMMED ENES, OLGAÇ KEMAL TUNA, TEKİN KORAY, ÇİL BESTE, ALEMDAR HAVVA, ÖZEN DOĞUKAN, UYSAL ONGUN (2018). Kolesterol ve 7-Dehidrokolesterolün Farklı Gliserol Oranları İle Boga Sperması Dondurulmasına Etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, Doi: 10.9775/kvfd.2018.19958

STELLETTA CALOGERO, TEKİN KORAY, TIRPAN MEHMET BORGA, ALEMDAR HAVVA, ÇİL BESTE, ÖZTUTAR STELLETTA FATMA, OLGAÇ KEMAL TUNA, İNANÇ MUHAMMED ENES, DASKIN ALİ (2017). Vulvar thermal pattern following synchronization of estrus is linked to fertility after timed artificial insemination in goat . *Theriogenology*, 103, 137-142. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.038>

OLGAÇ KEMAL TUNA, AKÇAY ERGÜN, ÇİL BESTE, UÇAR BURAK MEHMET, DASKIN ALİ (2017). The use of infrared thermography to detect the stages of estrus cycle and ovulation time in anatolian shepherd dogs. *Journal of Animal Science and Technology*, 59, 21-26., Doi: <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0146-4>

TIRPAN MEHMET BORGA, GÜRLER HAKAN, OLGAÇ KEMAL TUNA, KAYA UFUK (2017). Effects of Different Equilibration Conditions on Cryopreserved Bovine Sperm Quality. *Kocatepe Veterinary Journal*, 10(2), 57-65., Doi: 10.5578/kvj.54069

İNANÇ MUHAMMED ENES, TEKİN KORAY, OLGAÇ KEMAL TUNA, TIRPAN MEHMET BORGA, ALEMDAR HAVVA, ÇİL BESTE, KAYA UFUK, STELLETTA CALOGERO, DASKIN ALİ (2017). Effects of region and individualism traits on sperm freezeability of Angora Goats. *Journal of Turkish Veterinary Medical Society*, 88(1), 31-39. (Kontrol No: 3645688)

OLGAÇ KEMAL TUNA, TEKİN KORAY, İNANÇ MUHAMMED ENES, TIRPAN MEHMET BORGA, DASKIN ALİ, AKÇAY ERGÜN (2014). Alageyiklerde Dama dama dama başlıca androlojik değerlendirmeler. *Veteriner Hekimler Dernegi Dergisi*, 85(2), 12-19.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri

Ankara Keçilerinde donmus sperma ile laparoskopik transservikal intrauterin ve intraservikal tohumlama yöntemlerinin gebelik sansına etkileri - AÜBAP (Araştırmacı) 17/06/2014 - 17/06/2015 (ULUSAL)

Aksaray Malaklısı Çoban Köpeği ırkında Türk Mastifi androlojik ve spermatolojik özelliklerin SNP ile genom boyu ilişkilendirilmesi -Tübitak 1001. (Araştırmacı) 15/09/2014 - 25/05/2018 (ULUSAL)

Honamlı teke spermasının dondurulmasına lesitin ve siklodekstrinli bileşenlerin etkisi – AÜBAP (Araştırmacı) 05/12/2018-Devam ediyor.

Verdiği seminerler

Ay gırlarda androlojik muayeneler ve damızlık seçimi. Doktora Semineri, 2014.

Ay gır reproduksiyonunda seminal plazma proteinleri ve önemi. Doktora Semineri, 2015.

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2014, Ankara/TÜRKİYE.

Küçük Ruminantlarda Laparoskopik İntrauterin Suni Tohumlama, 2013, Kars/TÜRKİYE.

İngilizce Akademik Yayın Hazırlama Eğitimi, 2014, Hannover/ALMANYA.

Araştırma Görevlileri için Eğiticilerin Eğitimi Programı, 2016, Ankara/TÜRKİYE

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

8. Ulusal Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, 2016, Antalya/TÜRKİYE.