



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ANKARA TEKESİ SPERMASININ NANOPÜRİFİYE EDİLEREK DONDURULMASI

Havva Alemdar

DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi M. Borga TIRPAN

ANKARA
2018

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKARA TEKESİ SPERMASININ NANOPÜRİFİYE
EDİLEREK DONDURULMASI**

Havva ALEMDAR

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

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi M. Borga TIRPAN

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğünün 17L0239012
numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2018

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ankara Tekesi Spermasının Nanopürifiye Edilerek Dondurulması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Havva ALEMDAR

Tarih: 02.11.2018

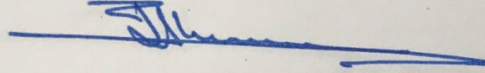
İmza:

KABUL VE ONAY

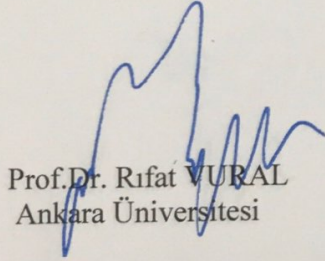
Türkiye Cumhuriyeti
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Dölerme ve Suni Tohumlama Doktora Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

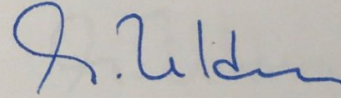
Savunma Tarihi:02/11/2018



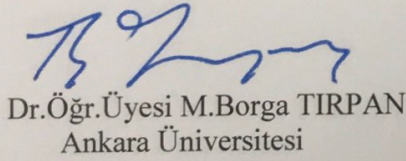
Prof.Dr.Ergun AKÇAY
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



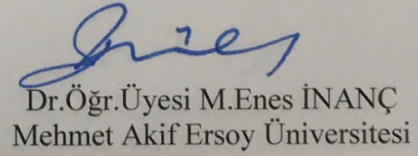
Prof.Dr. Rifat VURAL
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr.Savaş YILDIZ
Kafkas Üniversitesi



Dr.Öğr.Üyesi M.Borge TIRPAN
Ankara Üniversitesi



Dr.Öğr.Üyesi M.Enes İNANÇ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

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

Prof. Dr. Mehmet Akan
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Ankara Keçileri	1
1.2. Ankara Keçilerinin Reprodüktif Özellikleri	2
1.3. Androlojik Açıdan Yardımcı Üreme Teknikleri	3
1.3.1. Ankara Tekelerinden Sperma Alınması	4
1.3.2. Ankara Tekesi Spermasının İşlenmesi	5
1.4. Spermatozoa Seleksiyon Yöntemleri	7
1.5. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerinin Genel Özellikleri	13
1.5.1. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerinin Kullanım Alanları	15
1.5.2. Manyetik Demir Oksit Nanopartikülleri ile Seleksiyon	17
1.5.3. Manyetik Demir Oksit Nanopartikülleri ile Spermatozoa Seleksiyonu	18
1.6. Spermatolojik Analizler	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1. Gereç	29
2.2. Yöntem	30
2.2.1. Ankara Tekesi Seçimi	30
2.2.2. Nanopartikül Doz Optimizasyonu	30
2.2.3. Farklı Sıcaklıklarda Nanopürifikasyon	31
2.2.4. Motilite ve Kinetik Parametre Analizleri	35
2.2.5. Morfolojik Analizler	36
2.2.6. İstatistiksel Analizler	39
3. BULGULAR	41
3.1. Ankara Tekelerinin Androlojik Muayene Bulguları	41
3.2. Doz Optimizasyon Bulguları	42
3.3. Farklı Sıcaklıklarda Nanopürifikasyonda Taze Sperma Muayene Bulguları	43
3.4. Farklı Sıcaklıklarda Nanopürifikasyonda Çözüm-Sonu Muayene Bulguları	43
3.4.1. Motilite ve Kinetik Parametre Bulguları	43
3.4.2. Morfolojik Analiz Bulguları	51
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
ÖZET	72

SUMMARY	73
KAYNAKLAR	74
EKLER	85
Ek-1. Etik Kurul Kararı	85
ÖZGEÇMİŞ	86



ÖNSÖZ

Ankara keçileri ülkemize özgü bir keçi ırkı olmasına karşın, Ankara keçisi üretimi açısından ülkemiz Amerika ve Afrika ülkelerinin gerisinde kalmış durumdadır. Buna rağmen diğer ülkelerde Ankara keçileri özen gösterilerek yetiştirilse de, ülkemizdeki Ankara keçilerinin tiftik özelliklerine yetişemedikleri belirtilmektedir. Ancak, ülkemizdeki üretim seviyesinin düşük kalması nedeniyle ülkemiz günümüzde önemli üretici olma vasfını yitirmiş durumdadır.

Keçi ırklarının çoğundan yüksek reproduktif verim elde edilebilmektedir. Ancak, Ankara keçileri için reproduktif verim düşüklüğü en büyük problemi oluşturmaktadır. Reproduktif verimin artırılması için ileri yardımcı üreme teknikleri kullanılmakta; bunlar içerisinde erkek seçimi büyük önem taşımaktadır. Bunun temel nedeni; erkek seçimi sayesinde verim özelliklerinin daha kısa sürede artırılabilmesi, seleksiyon şansının artırılması ve bu sayede verimi düşük hayvanların sürüden çıkartılmasına olanak sağlamasıdır. Verim özellikleri yüksek olan tekelerden faydalanma oranının artırılması için günümüze kadar suni tohumlama gibi yardımcı üreme tekniklerinin yanı sıra birçok sperm seleksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Ancak, bu sperm seleksiyon yöntemleri spermatozoada mekanik hasar oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, tez çalışması yeni geliştirilmiş ve henüz tekelerde denenmemiş bir yöntem olan nanopartiküller ile sperm seleksiyonu yönteminin Ankara tekelerinin sperma kalitelerinin artırılması amacıyla kullanımının araştırılması amacıyla yapılmıştır. Nanopartiküller ile sperm seleksiyonu, ya da diğer adıyla nanopürifikasyon işleminin, Ankara tekelerinde kullanımının yanı sıra farklı sıcaklıklarda denenmesi ile saha koşullarına adapte edilebilmesi tez çalışmasının hedeflerinden biri olmuştur.

Bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi aşamalarında bana yardımcı olan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi M. Borgia TIRPAN'a; tez çalışmama kadarki doktora sürecim boyunca danışmanlığımı yapan ve her konuda yanımda olan Prof. Dr. Ali DAŞKIN'a; tez çalışmam süresince tecrübe ve zamanlarını esirgemeyerek bana

yardımcı olan tez izleme komite üyelerim Prof. Dr. Ergun AKÇAY, Prof. Dr. Rıfat VURAL ve Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Prof. Dr. Necmettin TEKİN, Prof. Dr. Ogun UYSAL'a ve Prof. Dr. Calogero STELLETTA'ya desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Doktora sürecim boyunca hem bilimsel hem de sosyal anlamda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. M. Enes İNANÇ, Dr. Koray TEKİN, Araş. Gör. K. Tuna OLGAC, Araş. Gör. Sevim KANDİŞ, Eylül AKPINAR ve Araş. Gör. Beste ÇİL'e; tez çalışmasının yürütülmesi aşamasını kolaylaştıran intörn arkadaşlarıma ve tezimin son kontrollerinde verdiği destek için Prof. Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

En önemlisi, hayatım boyunca yanımda olacağını düşündüğüm ancak aramızdan erken ayrılan biricik annem Sarah ALEMDAR'a, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Metin ALEMDAR ve kardeşim Bora ALEMDAR'a çok teşekkür ederim. Doktora sürecimin başlarında hayatıma giren ve bu süreç boyunca hayatıma her anlamda ışık tutan ve bana yol gösteren can dostum Dr. Gizem TEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALH	Sperm başının sapma mesafesi
BCF	Çapraz geçiş frekans ritmi
CASA	Bilgisayar-destekli sperm analizi
cm	Santimetre
°C	Derece santigrat
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FITC-PNA	Floresan izotiyosiyanat-konjugasyonlu <i>Arachis hypogaea</i> (peanut) agglutinin
g	Gram
HA	Hyalüronik asit
Hz	Hertz
IVF	<i>In vitro</i> fertilizasyon
ICSI	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
JC-1	5,5', 6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3' tetraetil-benzimidazolilkarbosiyenin iyodit
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
LIN	Eğrisel yol doğrusallığı
MACS	Manyetik aktivasyonlu hücre ayırıştırma sistemi
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µm/s	Mikrometre/saniye
mg	Miligram
ml	Mililitre
mV	Milivolt
Na ₂ HPO ₄ ×H ₂ O	Sodyum fosfat dibazik heptahidrat

NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
PBS	Fosfat buffer saline
PI	Propidyum iyode
PM	Progresif motilite
PNA	Peanut agglutinin
PS	Fosfatidilserin
PSA	<i>Pisum sativum</i> agglutinin
sp/ml	Spermatozoa/mililitre
ST	Suni tohumlama
STR	Ortalama yol doğrusallığı
TM	Total motilite
VAP	Ortalama yol hızı
VCL	Eğrisel hız
VSL	Doğrusal hız
WOB	Kararsızlık
%	Yüzde
~	Yaklaşık

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Lektinler ile kaplanmış nanopartiküllerin bağlandıkları spermatozoa ile birlikte sperma örneğinden miknatıs yardımı ile uzaklaştırılması 19
- Şekil 2.1.** Otomatik elektro ejakülatör 31
- Şekil 2.2.** Taze sperma örneklerinde yapılan incelemeler: A- konsantrasyon ölçümü için kullanılan fotometre; B- pH ölçümü için kullanılan pH stripleri; C- kitle hareketi ve subjektif motilite tayini 32
- Şekil 2.3.** Tris, sitrik asit, glikoz, %10 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren teke sperma sulandırıcısı 33
- Şekil 2.4.** Sulandırılmış sperma örneklerine farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon uygulaması: A- $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de; B- $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de nanopartikül eklenerek bekletilme alanları 34
- Şekil 2.5.** Nanopartikül eklenen sulandırılmış sperma örneklerinden nanopartiküllerin ayrılması: A- Sperma örneği miknatıs üzerinden alındıktan sonra dibe çökmüş olarak görünen nanopartiküller; B- Sperma örneği ayrıldıktan sonra geri kalan nanopartikül içeren kısım 34
- Şekil 2.6.** Ekilibrasyon ve dondurma işlemi aşamaları: A- ekilibrasyon için buzdolabında 1,5 saat bekleme; B- sıvı azot seviyesinden 4-5 cm yükseklikte 10 dk bekleme; C- sıvı azot içerisine daldırma; D- gobletlere yerleştirerek depolanmaya hazırlama 35
- Şekil 2.7.** Ankara tekelerinden elde edilen sperma örneklerinin farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon sonrası SYBR-14 ve PI boya kullanılarak viabilite açısından analizi: A- Kırmızı boya (PI) alan ölü spermatozoon; B- Yeşil boya (SYBR-14) alan canlı spermatozoon 37
- Şekil 2.8.** Ankara tekelerinden elde edilen sperma örneklerinin farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon sonrası FITC-PNA ve PI boya kullanılarak akrozom bütünlüğü açısından analizi: A- Baş kısmı kırmızı (PI), akrozom kısmı yeşil boya (FITC-PNA) alan akrozomu bozuk ve ölü spermatozoon; B- Baş kısmı kırmızı boya (PI) alan akrozomu boya almayan akrozomu bütün ölü spermatozoon; C- Baş kısmı veya akrozomu boya almayan akrozomu bütün ve canlı spermatozoon 38
- Şekil 2.9.** Ankara tekelerinden elde edilen sperma örneklerinin farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon sonrası JC-1 ve PI boya kullanılarak mitokondriyal aktivite açısından analizi: A- Baş kısmı kırmızı boya (PI) alan mitokondriyası boya almayan mitokondriyal aktivitesi bulunmayan ölü spermatozoon; B- Baş kısmı kırmızı boya (PI) alan mitokondriyası yeşil veya turuncu boya (JC-1) alan mitokondriyal aktivitesi olan ölü spermatozoon 39
- Şekil 3.1.** Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu total motilite bulgularının gruplar arası karşılaştırması 44

Şekil 3.2. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu progresif motilite bulgularının gruplar arası karşılaştırması	45
Şekil 3.3. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu eğrisel hız bulgularının gruplar arası karşılaştırması	46
Şekil 3.4. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu doğrusal hız bulgularının gruplar arası karşılaştırması	47
Şekil 3.5. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu ortalama yol hızı bulgularının gruplar arası karşılaştırması	48
Şekil 3.6. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu eğrisel yol doğrusallığı bulgularının gruplar arası karşılaştırması	48
Şekil 3.7. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu ortalama yol doğrusallığı bulgularının gruplar arası karşılaştırması	49
Şekil 3.8. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu kararsızlık bulgularının gruplar arası karşılaştırması	50
Şekil 3.9. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu hiperaktivite bulgularının gruplar arası karşılaştırması	51
Şekil 3.10. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu akrozom bütünlüğü bulgularının gruplar arası karşılaştırması	52

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Nanopartikül doz optimizasyonu çalışma grupları ve gruplara uygulanan işlemler	31
Çizelge 2.2. Farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon çalışma grupları ve gruplara uygulanan işlemler	33
Çizelge 2.3. Hancock solusyonu hazırlanışı	36
Çizelge 3.1. Teke seçimi amacıyla yapılan androlojik muayenede testiküler ölçüm bulguları	41
Çizelge 3.2. Nanopartikül doz optimizasyonu çalışma gruplarının ortalama taze sperma verileri	42
Çizelge 3.3. Nanopartikül doz optimizasyon çalışması çözüm sonu muayeneleri veri ortalamaları	42
Çizelge 3.4. Ankara tekelerinden elde edilen sperma örneklerinin taze muayene bulgularının ortalamaları	43
Çizelge 3.5. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu total ve progresif motilite bulgularının gruplar arası karşılaştırması	43
Çizelge 3.6. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu hız parametre bulgularının gruplar arası karşılaştırması	45
Çizelge 3.7. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu istikrarsızlık parametre bulgularının gruplar arası karşılaştırması	50
Çizelge 3.8. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu floresan boyama ile yapılan morfolojik analiz bulgularının gruplar arası karşılaştırması	51

1. GİRİŞ

1.1. Ankara Keçileri

Ankara keçilerinin anavatanı, 2000 yıldan uzun süredir barındıkları, “Küçük Asya” olarak bilinen ve ülkemiz topraklarını da kapsayan bölgedir. Yapağı üretimi amacıyla yetiştirilen keçi ırkları geniş bir alanda yayılım gösterirken, günümüzde Ankara keçisi olarak bilinen ırkın Ankara şehri yakınlarında yerleşim gösterdiği ve bu nedenle Angora ya da Ankara keçisi olarak isimlendirildiği bilinmektedir. Ankara keçisi; beyaz, uzun, kıvrıkcık ve az yağlı yapağıya sahip küçük bir keçi ırkıdır (Shelton, 1993a).

On altıncı yüzyıldan itibaren Ankara keçileri Avrupa ülkelerine götürülerek bu bölgelerde tiftik üretimi amacıyla kullanılmaya çalışılmıştır. Ancak, birçok farklı neden dolayısıyla bu çalışmalar başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Ankara keçiciliği, 1838 yılı ve sonrasında yapılan çalışmalar sayesinde Avrupa ülkelerinde de başarılı olarak uygulanmaya başlanmıştır (ESK, 2018; TYTSKB, 2018 ve Shelton, 1993a).

Ankara keçileri birçok farklı bölgeye uyum sağlayabilmektedir. Ancak, şimdiye kadar yalnızca Güney Afrika ve Amerika’da Teksas eyaleti civarında başarılı büyük endüstriyel üretim sağlanabilmiştir (Shelton, 1993a). Ülkemizde ise çeşitli ekonomik nedenlerle Ankara keçisi varlığımız 3 000 000 baştan 120 000 başa dolayısıyla, tiftik üretimimiz 6000 tondan 200 tona kadar gerilemiş durumdadır (TYTSKB, 2018). Bu durumun sonucunda “Ankara keçileri için gen kaynağını koruma” konu başlığı altında çeşitli destek programları yürütülmeye başlanmıştır (ESK, 2018). Prim ve doğrudan destek ödemeleri gibi Ankara keçisi yetiştiriciliğini teşvik etmeye yönelik uygulamalar yürütülmesine karşın, üretim 1988 yılından sonra azalmaya başlamıştır. Tiftik üretiminin, 2008 yılında tekrar artmaya başladığı ve bu artışın günümüzde de devam ettiği bildirilmektedir. Ülkemizdeki güncel Ankara keçisi baş sayısı 2017 yılı itibarıyla 201 000; tiftik üretimi ise 356 ton civarındadır. Ülkemiz, 1988 yılına kadar dünyada ham tiftik, tiftik ipliği ve kumaşı üretim ve dış satımı bakımından rakipsizken,

günümüzde önemli bir üretici ülke olma vasfını yitirmiştir (GTBKGM, 2018). Yine de, bazı kaynaklara göre diğer ülkelerde Ankara keçileri ne kadar titizlikle yetiştirilirse yetiştirilsin; ülkemizde elde edilen tiftiğin incelik, yumuşaklık ve parlaklık gibi özelliklerinin seviyesine yetişemediği bildirilmektedir (TYTSKB, 2018).

Ülkemizde halen en yaygın ikinci ırk olan Ankara keçisi, başta Ankara olmak üzere İç Anadolu Bölgesi'nde ve Siirt, Mardin ve Bitlis illerinde yetiştirilmektedir. Ancak, Ankara keçisi üretimi ve sayısı ekonomik nedenlerden dolayı hızla azalmaktadır. Günümüzde uygulanan gen kaynağı koruma programları ise sürülerde fazla sayıda damızlık bulundurma gereksinimi nedeniyle, fazladan maddi külfet getirmektedir (ESK, 2018). Bu nedenle, gen kaynaklarının korunması amacıyla ileri yardımcı üreme teknikleri kullanımı yaygınlaştırılmaya çalışılmaktadır

1.2. Ankara Keçilerinin Reprodüktif Özellikleri

Ankara keçilerinde genel reprodüktif özellikler şu şekilde tanımlanmaktadır: Pubertaya erişme, genellikle doğum sonrası ilk sezon zamanında; yani 6-8 aylık yaşta olmaktadır (Shelton, 1993b). Ankara tekeleri genellikle 7 aylık yaştan itibaren yetiştirmede kullanılmaktadır (Alaçam ve ark., 1990b). Ankara keçileri mevsimsel poliöstrik hayvanlardır. Mevsimsellik, fotoperiyodizm ile etki göstermekte; gün ışığı miktarının azalması siklusun başlamasını uyarıcı etkiye sahip olmaktadır. Erkek etkisi diğer hayvan türlerinde de görülmesine karşın Ankara keçilerinde daha belirgin uyarıcı etkilere sahiptir. Bir diğer özgün nokta ise, dişilerin sessiz östrus göstermesindeki farklılıktır. Diğer hayvan türlerindeki gibi sessiz östrus sıklıkla görülen bir durum değildir ve eğer şekillenirse, keçi 5-7 gün içerisinde tekrar östrus göstermekte, bir siklus boyunca boş kalmamaktadır. Seksüel siklus 19-21 gün arası değişmekte, östrus süresi ise ortalama 22,3 saat sürmektedir. Bir siklusta ovaryumdan genel olarak ya hiç ovum atılmamakta ya da bir veya iki ovum atılmakta; bu sayının bakım koşulları ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmektedir. Gebelik süresi, 143 ile 153 gün arası olmakla birlikte ortalama 149 gündür. Yenidoğan canlı ağırlığı 2,25 ile 3,20 kg arası değişmektedir (Shelton, 1993b).

Ankara tekelerinin androlojik özellikleri şu şekilde tanımlanabilmektedir (Alaçam ve ark., 1990a):

- Ejakülat miktarı ortalama 0,9 ml (0,5-3,0 ml)
- Koyu kirli krem renkte
- 1 ml'deki spermatozoa yoğunluğu ortalama $3,0 \times 10^9$ sp/ml (0,5-5,0 $\times 10^9$ sp/ml)
- Ejakülattaki toplam spermatozoa yoğunluğu ortalama $2,7 \times 10^9$ sp/ml
- pH değeri 6,5-7,0 arasında.

Gerçek genetik iyileştirmenin büyük çoğunluğu erkek seçimi ile mümkün olmakta ve daha fazla sayıda erkek oğlak elde edilmesi, daha fazla seleksiyon seçeneği yaratmaktadır (Shelton, 1993b).

1.3. Androlojik Açıdan Yardımcı Üreme Teknikleri

Yüksek reproduksiyon oranları, yetiştiriciliği yapılan hayvanlar için büyük önem taşımaktadır. Çünkü yeni doğan hayvanların sürüdeki hayvan sayısına ulaşması hatta bu sayıyı aşmaları, böylece kâr sağlamaları gerekmektedir. Fakat Ankara keçilerinde reproduktif verim düşüklüğü bilinen bir problemi oluşturmaktadır. Reproduksiyon Ankara keçilerinde problem alanlarından birini oluştururken; diğer keçi ırklarında yüksek reproduksiyon oranları elde edilebilmektedir. Buna karşın, Ankara keçilerinde reproduksiyonun geliştirilmesi için fazla çaba harcanmamıştır. Bunun temel nedeni, Ankara keçilerinin et veya süt üretimi açısından yetiştirilmemesi, aksine tiftik verimi için yetiştirilmesidir. Ankara keçilerinde sezona bağlılığın fazla olması ve tiftik üretimi için yüksek besin ihtiyacının karşılanmasındaki problemler de bu çalışmalardan istenen sonuçların elde edilmesini engellemektedir. Her yetiştiricilikte olduğu gibi Ankara keçisi yetiştiriciliğinde de reproduktif verimin yüksek olmasının avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar şu şekilde tanımlanabilmektedir (Shelton, 1993b):

- Üreticinin elindeki sürünün korunması ve ülke çapındaki hayvan sayısının sabit tutulması için hayvanların en az orta düzeyde üretilebilmesi gerekmekte,
- Yüksek seviyede reproduksiyon, arz-talep değişimleri ya da ani fiyat artışı olan durumlarda hızlı çözüme olanak sağlamakta,
- Daha fazla sayıda yavru elde edilmesi ile seleksiyon şansı artmakta ve verimi düşük hayvanların sürüden çıkartılabilmekte,
- Yüksek reproduksiyon oranı sürünün ortalama yaşını düşürdüğü için hem miktar hem kalite anlamında daha iyi tiftik üretimi gerçekleştirilmektedir.

İleri yardımcı üreme teknikleri; erkek damızlıkların fertilitite yönünden test edilmesi, suni tohumlama (ST), dondurulmuş sperma kullanımı, reproduksiyonun kontrol edilmesi ve düzenlenmesi için hormonların kullanımı, embriyo transferi ve ultrasonografik gebelik teşhisini içermektedir. Bu teknikler içerisinde yalnızca ST uygulamaları endüstri bazında uygulama alanı bulmuştur (Shelton, 1993b). Suni tohumlama uygulamalarında kullanılmak üzere belirlenen verim özellikleri ve reproduktif verimi yüksek olan hayvanlardan sperma alınmakta ve uzun süre saklanarak daha uzun vadede kullanıma sunulabilmektedir (Alaçam ve ark., 1990b).

1.3.1. Ankara Tekelerinden Sperma Alınması

Tekelerden genellikle 6-7 aylık yaştan itibaren sperma alınmaya başlanabilmektedir (Alaçam ve ark., 1990b). Bu amaçla sıklıkla suni vajen yöntemi kullanılmaktadır (Alaçam ve ark., 1990b ve Leboeuf ve ark., 2000). Ancak suni vajenle sperma alımı rutin bir uygulama haline getirilmeden önce tekelerin suni vajene iyice alıştırmaları gerekmektedir. Tekeler suni vajene alıştırmadıklarında, elektro ejakülatör yöntemi tercih edilebilmektedir. Elektro ejakülatör yöntemi de, günümüzde dünya çapında birçok ülkede kabul görmekte ve sıklıkla kullanılmaktadır (AVA, 2008; CVMA, 2013 ve NAAB, 2018).

Tekelerden sperma alma sıklığı koçlarda olduğu gibi günde bir kere önerilmektedir. Ancak zorunlu durumlarda günde 2-3 örnek alınabileceği de belirtilmektedir (Alaçam ve ark., 1990b). Hayvan refahı açısından haftada 2 veya 3 kere elektroejakülatör uygulaması yapılan hayvanlarda prosedüre karşı olumsuz bir yanıt şekillenmediği bildirilmiştir (Barth ve Bowman, 1994). Yapılan çalışmalarda, sperma alma aralıklarındaki seksüel dinlenme süresinin artırılmasının spermatozoa dondurulabilirliği açısından olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu doğrultuda, sezonun ilk yarısında 2 günlük dinlenme süreci bırakılması, sezonun ikinci yarısında da bu aralığın 3 güne çıkarılması önerilmiştir (Boue ve Corteel, 1992 ve Leboeuf ve ark., 2000). Dolayısıyla, sezon içinde haftada 2-3 sperma örneği alınması en uygun koşulu oluşturmaktadır. Alınan sperma örnekleri kısa (+5°C'de 3-4 gün) veya uzun süre (-196°C'de yıllarca) saklanarak daha sonraki suni tohumlama uygulamalarında kullanılabilir (Alaçam ve ark., 1990b).

1.3.2. Ankara Tekesi Spermasının İşlenmesi

Yüksek kalitede tiftiğe sahip Ankara keçileri ve tekelerinden daha fazla yararlanılabilmesi sperma dondurma çalışmalarının ilerletilmesi ve suni tohumlama uygulamalarının yaygınlaştırılması ile mümkün olabilmektedir (Nunes ve Salgueiro, 2011). Spermanın, özellikle dondurularak saklanması; spermatozoada yapısal, biyokimyasal ve fonksiyonel hasar oluşturarak; motilite, viabilite ve fertilitede azalma ile sonuçlanmaktadır (Leboeuf ve ark., 2000). Sperma dondurma (kriyoprezervasyon) sulandırıcılarının temel amacı; spermatozoaya enerji kaynağı sağlamak, hücreleri sıcaklıkla ilişkili stresten korumak ve spermatozoanın geçici olarak korunabilmesini sağlayacak uygun ortamın oluşturulmasıdır (Dorado ve ark., 2007 ve Purdy, 2006). Teke spermasının bu amaçla sulandırılması için kriyoprezervasyon sulandırıcısında bir hücre dışı kriyoprotektan (süt veya yumurta sarısı), bir hücre içi kriyoprotektan (gliserol, etilen glikol veya dimetil sülfoksit), bir *buffer* (Tris veya Test), bir veya daha fazla şeker (glikoz, laktoz, rafinoz, sakkaroz veya trehaloz), tuzlar (sodyum sitrat, sitrik asit) ve antibiyotikler (penisilin, streptomisin) eklenmektedir (Evans ve Maxwell, 1987). Teke spermasının dondurulması için sıklıkla Tris-glikoz sulandırıcısı

(Ritar ve Salamon, 1982) veya yağsız süt tozu sulandırıcısı (Corteel ve Baril, 1974) tercih edilmektedir. Ancak bu iki madde de seminal plazmada bulunan fosfolipaz A enzimi ile etkileşime girerek, spermatozoa üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır (Arı ve Daşkın, 2010; Purdy, 2006 ve Ritar ve Salamon, 1982). Seminal plazma ve yumurta sarısı arasındaki etkileşimin olumsuz etkileri ilk olarak Roy (1957); yağsız süt tozu ile oluşan olumsuz etkiler ise ilk olarak Nunes ve ark. (1982) tarafından bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada; teke spermasının santrifüjden önce daha büyük hacimlerle sulandırılmasının, seminal plazmanın uzaklaştırılmasını kolaylaştırdığı ve seminal plazmanın uzaklaştırılmasının çözüm sonu spermatolojik parametre verilerini daha iyi hale getirdiği belirlenmiştir (Ritar ve Salamon, 1982). Yapılan bir başka çalışmada, Ankara tekesi sperma örneğinin yıkanması, yani seminal plazmanın uzaklaştırılması gerektiği sonucuna varılmış ve elde edilen spermatozoa peletine boğa veya koç seminal plazması eklenmesiyle başarılı sonuçlar elde edilebileceği gösterilmiştir (Arı ve Daşkın, 2010). Teke spermasıyla yapılan diğer çalışmalarda ise seminal plazma uzaklaştırılmadan da başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (Ritar ve Salamon, 1982). Elde edilen bu çelişkili sonuçlar, dondurulabilirliğin tekelerin bireysel farklılıklarından etkilenebileceğini göstermektedir (İnanç ve ark., 2017).

In vivo koşullarda spermatozoa fertilizasyon alanına ulaşana kadar aşamalı olarak birçok bariyerden geçerek seçilmektedir. Bu aşamalardan yola çıkılarak, spermatozoanın tohumlama ya da *in vitro* fertilizasyon (IVF) gibi yardımcı reproduktif işlemler öncesinde seçilmesinin, bu uygulamalarının başarısını artıracak düşüncesine ulaşılmıştır (Rodriguez-Martinez, 2007). Bu amaçla günümüze kadar çeşitli spermatozoa seleksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar temel olarak; *swim-up*, Percoll solüsyonu ile santrifüj (*continuous percoll gradient*), filtrasyon (*glass wool filtration*), *Sephadex* filtrasyon (*glass wool Sephadex filtration*), lökösorb filtrasyon (*leucosorb filtration*) ve santrifügasyon olarak bilinmektedir. Bu yöntemlerin tamamı santrifügasyon işlemini içermektedir. Santrifügasyon işlemi de spermatozoaya mekanik olarak zarar verebilmektedir (Sieme ve ark., 2003). Bu durum spermatozoa seleksiyonu için santrifügasyon işlemini içermeyen yeni yöntemler geliştirilmesi gereksinimini ortaya çıkarmıştır. Son yıllarda ise, nanoteknoloji alanının gelişmesiyle

birlikte, demir oksit nanopartikülleri ile seleksiyon ya da diğer adıyla nanopürifikasyon (Feugang ve ark., 2015) yöntemi geliştirilmiştir.

1.4. Spermatozoa Seleksiyon Yöntemleri

Suni tohumlama ve IVF gibi amaçlarla işlenen sperma örneklerinden hasarlı spermatozoanın tohumlama öncesi aşamalarda uzaklaştırılmasının; hayvan yetiştiriciliği yapılan merkezlerde fertilitite oranı ve ekonomik açıdan fayda sağlayacağı düşünülmektedir (Feugang, 2017). Çiftlik hayvanı üretiminde bu durumun oluşturulabilmesi için çeşitli spermatozoa seleksiyon yöntemleri geliştirilmiştir (Durfey ve ark., 2018).

Suni tohumlama amaçlı kullanılacak olan spermanın kalite analizlerinde rutin olarak uygulamalarının pratikliğinden dolayı; spermatozoa yoğunluğu, motilitesi ve morfolojisine bakılmaktadır. Ancak bu parametreler spermanın fertilitesinin belirlenmesi açısından yeterli olmamaktadır (Feugang ve ark., 2015 ve Flowers, 1997). Buna karşın viabilite faktörleri, dişi genital kanalında spermatozoanın ilerlemesi ve fertilizasyon alanında oosit ile etkileşime girmelerine olan önemli etkisi nedeniyle sperma fertilitesinin belirlenmesini sağlayabilecek kayda değer araçlardır (Feugang ve ark., 2015; Gadea, 2005; Katz ve ark., 1989 ve Lee ve ark., 2014). Ancak, viabilite değerlendirmesi genellikle daha uzun sürmekte ve tohumlama dozları hazırlandıktan sonra sonuç elde edilebilmektedir. Bu nedenle zarar görmüş spermatozoanın uzaklaştırılması büyük fayda sağlayabilmektedir. Bu prosedür, canlı ve ölü spermatozoa arasındaki gereksiz yarışın ortadan kaldırılmasına olanak vererek; daha fazla sayıda canlı spermatozoanın fertilizasyon bölgesine ulaşmasını sağlamakta ve fertilititeye katkıda bulunabilmektedir (Feugang ve ark., 2015).

Doğada türlerin devamlılığı için spermatozoon ile oositin birleşmesi bir gerekliliktir. Spermatozoon, oosite ulaşana kadar dişi genital kanalı içerisinde birçok engel ile karşılaşarak seçilmektedir (Holt ve Van Look, 2004). Spermatozoanın oviduktal epitel hücreleri ile etkileşimi aracılığıyla daha aktif bir seleksiyon işlemi

oluşarak; yüksek motiliteli, canlı spermatozoa alt-popülasyonu fertilizasyon alanına akrozom reaksiyonu geçirerek zona pellusida ile bağlanmaya hazır hale gelerek ulaşmaktadır (Ardon ve ark., 2008 ve Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009). Bu sayede, dişi genital kanalı çift filtre özelliğine sahip kabul edilmektedir: İlkinde spermatozoanın seminal plazmadan ayrılmasını sağlamakta, takiben de anormal spermatozoanın ilerlemesini engelleyici birçok bariyer oluşturmaktadır (Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009 ve Taylor ve ark., 2008). Ancak, düşük kaliteli sperma örneklerinin düşük gebelik oranları ile sonuçlanma nedeni hakkında iki görüş mevcuttur. Bunlardan ilki, doğal filtre mekanizmalarının tüm anormal spermatozoayı eleyerek geriye fertilizasyon için yetersiz sayıda spermatozoa bırakması; diğeri ise filtre mekanizmalarının yüksek anormal spermatozoa sayıları ile başa çıkamaması ve anormal spermatozoon ile oluşan fertilizasyonun zigotik gelişimi gerçekleştirememesidir (Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009).

In vitro fertilizasyon uygulamalarında dişi genital kanalda doğal seleksiyon aşamalarının hiçbiri gerçekleşmemektedir (Hunter ve Rodriguez-Martinez, 2002 ve Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009). Bu nedenle, fertilizasyon damlaları içerisindeki oositlere sperma örneklerinin eklenmesinden önce hem seminal plazmanın uzaklaştırılması hem de iyi kalitede spermatozoa seçiminin yapılması gerekmektedir. Bu sayede, spermatozoa seleksiyon yöntemleri ST uygulamaları için sperma dozlarının hazırlanmasından çok, IVF amaçlı spermatozoa hazırlama işlemlerinde tercih edilmektedir (Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009). Diğer yandan, suni tohumlama için kullanılan damızlık boğaların spermasında temelde karşılaşılan hasarların bazılarının tohumlama dozu artırılarak tolere edilebildiği bildirilmektedir. Ancak, nükleer krater/diademler gibi bazı hasarların varlığı durumunda tohumlama dozunun artırılmasıyla dahi gebelik oranının düşüşü engellenememektedir (Saacke ve ark., 2000). Bu nedenle seleksiyonun ST öncesinde yapılması, ST dozunun fertilesini artıracak potansiyele sahiptir (Feugang ve ark., 2015).

Yardımcı üreme tekniklerinin ana bileşenleri olarak günümüzde sıklıkla dansite gradyanlı santrifügasyon ve *swim-up* gibi rutin sperma hazırlama teknikleri

kullanılmaktadır (Gil ve ark., 2013 ve Said ve Land, 2011). Ancak, apoptoz ve erken apoptoz, DNA bütünlüğü, membran maturasyonu ve ultrastrüktür gibi diğer spermatozoa özellikleri rutin sperma hazırlama teknikleri ile doğrudan hedeflenememektedir. İstenen bu özellikler spermatozoa seleksiyonu ile elde edilebilmekte ve fertilitenin önemli belirleyicilerini oluşturabilmektedir. Bu nedenler doğrultusunda, yeni ve ileri spermatozoa seleksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Said ve Land, 2011).

Dişi genital kanalında iyi kalitede spermatozoa seçimini taklit etmek amaçlı birçok mekanizma önerilmiştir. Bu mekanizmalar, ya spermatozoanın sperma bırakılma alanından uzaklaşmasını taklit edecek şekilde seminal plazmadan aktif veya pasif olarak ayrılmasını sağlamakta, ya da bunun yanı sıra *in vivo* koşullarda uterotubal geçiş sırasında olduğu gibi daha iyi kalitede spermatozoayı ejakülatın geri kalanından ayırma özelliğini de içermektedir (Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009).

Spermatozoanın dişi genital kanalında karşılaştığı bariyerler ve spermatozoayı yönlendiren mekanizmalar dikkate alınarak motil spermatozoanın seçilmesini sağlayan laminar sıvı akımı içeren mikrokanal sistemleri geliştirilmiştir. Bu yöntem sayesinde spermatozoanın hücre kalıntılarından ayrıldığı ve elde edilen sperma örneğinin motilite ve morfolojik verilerinin iyileştiği bildirilmektedir (Cho ve ark., 2003).

Sperm hücrelerinde çift kırılım analizi, normallik ölçütü olarak öne sürülmüştür. Çift kırılım analizi; organize ve piknotik olmayan spermatozoon çekirdeği, normal akrozom ve motil kuyruğu içeren karmaşık bir yapının belirlenmesinde kullanılabilir. Daha önce de bildirildiği gibi, zayıf bir çift kırılma formunun üst üste bindirildiği spermatozoon başının olgun çekirdeğinde güçlü bir negatif intrinsik çift kırılma mevcuttur (Baccetti, 2004 ve Gianaroli ve ark., 2008). Sperm hücresinin baş kısmında çift kırılma olmasının, hücrenin sağlıklı olduğunu gösterdiği ve çift kırılımlı spermatozoa oranının yoğunluk, viabilite ve motilite ile ilişkili olarak belirgin ölçüde değişiklik gösterdiği bildirilmektedir (Gianaroli ve ark., 2008).

Spermatozoa morfolojisi erkek *in vivo* ve *in vitro* fertilitésinin majör belirleyicilerinden biri olarak bilinmektedir (Kruger ve Coetzee, 1999; Said ve Land, 2011; Van Der Merwe ve ark., 2005 ve Van Waart ve ark., 2001). Bu amaçla morfolojik olarak rastgele boyanmış hücrelerin 1000× büyütmede seçilmesi işlemi gerçekleştirilmektedir. Ancak bu yöntemler rutinde intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi uygulamalarda spermatozoanın boyama olmaksızın 400× büyütmede seçilmesi işlemine entegre edilememektedir (Bartoov ve ark., 2002 ve Said ve Land, 2011).

Sulandırılmış ejakülat veya yıkanmış spermatozoa peleti içerisindeki motil spermatozoanın bir süspansiyondan başka bir medium veya farklı içerikli bir sulandırıcı içerisine geçme yeteneğine dayanan birçok seleksiyon yöntemi bulunmaktadır (Mortimer, 2000). Genellikle migrasyon olarak adlandırılan bu yöntemlerde spermatozoa, etkili bir şekilde seminal plazma ortamından kendini uzaklaştırmaktadır (Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009). Böylece, seleksiyon spermatozoanın sadece motilitesine bağlı olmakta ve normal baş morfolojisi, kromatin bütünlüğü veya viabilite ve akrozom bütünlüğüne ilişkin bir seleksiyon sağlamamaktadır (Somfai ve ark., 2002). Hyalüronik asit (HA) içeren medium kullanılarak yapılan migrasyon işlemi sayesinde membranı sağlam olan spermatozoa seçilebilmektedir (Shamsuddin ve Rodriguez-Martinez, 1994). Herhangi bir migrasyon yönteminin temel dezavantajı, düşük sperma toplama oranları (%10-20) elde edilebilmesidir (Hallap ve ark., 2004). Bu durum da çoğu hayvan türünde suni tohumlama dozları oluşturulması açısından yöntemin pratik olmaması ile sonuçlanmaktadır (Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009). Spermatozoon plazma membranında HA bağlanma alanlarının oluşması, spermatozoa seleksiyonunda temel olarak kullanılan bir spermatozoon olgunluk kriteridir (Huszar ve ark., 1997 ve Said ve Land, 2011). Hyalüronik asit; servikal mukus, kumulus hücreleri ve foliküler sıvının normal bir bileşeni olduğu için (Cayli ve ark., 2003), şimdiye kadar yapılan klinik IVF çalışmalarında HA ile seçilen spermatozoa kullanımını takiben fertilizasyon veya embriyo gelişimi açısından istenmeyen herhangi bir etki oluşumu bildirilmemiştir (Huszar ve ark., 2007).

Filtrasyon etkisi ile seleksiyon, spermatozoanın; cam fiberleri, *Sephadex* boncukları veya membran boşlukları gibi filtre materyalleri ile etkileşimi ve spermatozoanın hareket kabiliyeti sayesinde oluşmaktadır (Mogas ve ark., 1998 ve Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009). Aksiyon mekanizması henüz net olmasa da (Anzar ve ark., 1997); canlı olmayan spermatozoa, motil ve fonksiyonel kabul edilen spermatozoaya göre ortam ile daha fazla bağlanmaktadır (Bussallou ve ark., 2008). Örneğin *Sephadex*'in motil olmayan ve ölü olan spermatozoanın yüzey yüklerinde değişiklik nedeniyle bir araya toplanmasına neden olduğu (Ahmed ve ark., 2003) veya *Sephadex* partiküllerine kapasite olan spermatozoa üzerindeki bir proteinin bağlandığı düşünülmektedir (Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009 ve Samper ve ark., 1995).

Kolloid santrifügasyonda sulandırılmış sperma; spermatozoayı seminal plazmadan etkili bir şekilde ayıran ve ayrıca iyi motilite, viabilite ve kromatin bütünlüğüne sahip spermatozoa alt-popülasyonunu seçen kolloid katmanları içerisinde santrifüj edilmektedir (Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009). Dansite gradyanı içerisinde santrifügasyon sırasında, hücreler kendi dansiteleriyle uyumlu olan (eşyoğunluklu) noktaya doğru hareket etmektedir (Pertoft, 2000). Santrifügasyon koşulları (g kuvveti ve zaman) ve kolloidin fiziksel özellikleri değiştirilerek, en dirençli ve iyi kalitede spermatozoa içeren spermatozoa peleti elde edilmektedir (Morrell ve Rodriguez-Martinez, 2009). Yakın zamana kadar bu yöntem yalnızca dansite gradyanlı santrifügasyon olarak bilinmekte iken, İsveç Tarım Bilimleri Üniversitesi'nde bulunan bazı araştırmacılar tarafından tek katmanlı santrifügasyon tekniği geliştirilmiştir (Morrell ve ark., 2008 ve Thys ve ark., 2008). Tek katmanlı santrifügasyon yöntemi, dansite gradyanlı santrifügasyona göre daha kolay ve yüksek hacimlerdeki sperma örneklerinde uygulanabilme özelliği sayesinde ön plana çıkmıştır (Morrel ve Rodriguez-Martinez, 2009).

Spermatozoayı boyut ve elektronegatif yük açısından seçmek için elektroforez temelli bir teknoloji geliştirilmiştir. Boyut kriteri, yalnızca spermatozoa seçilmesini garantilerken, lökositler ve olgunlaşmamış germ hücrelerinin ayrıştırılmasına olanak sağlamaktadır. Elektroforez ile spermatozoa seleksiyonu, hızlı bir yöntem olması gibi çeşitli avantajları bulunmasına karşın; spermatozoa motilitesine negatif etkilerinin

bildirilmesi (Ainsworth ve ark., 2005 ve Engelmann ve ark., 1988), alet ekipmanın kullanımının zor ve maliyetinin yüksek olması gibi nedenlerle androloji laboratuvarlarında yer edinmemektedir (Said ve Land, 2011). Spermatozoon membranı ile çevresi arasındaki elektrik potansiyeli olarak tanımlanan ve olgun spermatozonda 16-20 mV arasında (Ishijima ve ark., 1991) olan spermatozoon zeta potansiyeli (elektrokinetik potansiyel) temel alınarak bir başka yöntem geliştirilmiştir (Chan ve ark., 2006). Bu yöntem, kolay ve ucuz bir yöntem olarak kabul edilmekte ve yüksek voltajlı elektrik akımı kullanmamakta olsa da; düşük sayıda spermatozoa toplama ile sonuçlandığı için kullanımı sınırlı kalmaktadır (Said ve Land, 2011). Zeta potansiyeli seleksiyon yöntemi, motilite oranı üzerinde herhangi bir etki yaratmamakta; buna karşın elektroforez seleksiyonu motilitenin azalmasına neden olarak olumsuz etki oluşturmaktadır (Ainsworth ve ark., 2005 ve Said ve Land, 2011).

Erken apoptozisin bir özelliği olan fosfatidilserinin (PS) spermatozoon membranının dışına çıkması, apoptotik olmayan spermatozoa seleksiyonu için temel teşkil etmektedir. Fosfatidilserinin dışarı çıkışı, Annexin-V ile konjuge edilmiş paramanyetik mikropartiküller ile bağlanmasına olanak sağlamakta; manyetik aktivasyonlu bir hücre ayırıştırma sistemi (MACS) kullanılarak apoptotik spermatozoanın işaretlenmesi ve ayırıştırılmasına imkân tanımaktadır (Grunewald ve ark., 2001 ve Said ve Land, 2011). Manyetik aktivasyonlu hücre ayırıştırma sisteminin lökosit veya olgunlaşmamış germ hücrelerini uzaklaştırma özelliği olmadığı için bu teknik genellikle seminal plazma ve diğer kontaminantların uzaklaştırılması için dansite gradyanlı santrifügasyon ile birlikte kullanılmaktadır (Said ve ark., 2005a; Said ve ark., 2005b). Dansite gradyanlı santrifügasyon yönteminin MACS ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, MACS kullanımının gebelik sonuçlarını artırdığı sonucuna ulaşılmıştır (Gil ve ark., 2013).

Annexin-V boyası kullanılarak apoptotik olmayan spermatozoanın manyetik olarak ayırıştırılması kolay, hızlı, ucuz ve yüksek hassasiyettedir (Said ve ark., 2008). Ancak teknik, özel laboratuvar koşulları gereksinimi nedeniyle, her koşulda uygun olmamaktadır (Said ve Land, 2011). Ek olarak, dansite gradyanlı santrifügasyon ve MACS işlemlerinin birleşimi, tekrarlı santrifügasyon ve re-süspansiyon aşamalarını

içerdiği için spermatozoa sayısı düşük olan sperma örneklerinde çok az spermatozoa toplanabileceği için fayda sağlamayacağı öne sürülmektedir (Said ve ark., 2008). Sistem, apoptotik spermatozoayı ayırma özelliği için ticari olarak mevcut *glass wool* seleksiyon sütunlarının modifikasyonu üzerine kurulmuştur. Bu işlem, *glass wool*'un apoptotik spermatozoaya bağlanan Annexin-V ile kaplanmasını içermektedir (Grunewald ve ark., 2007). İki işlemin birleştirilmesinin, spermatozoanın dondurma işlemlerinden sonra viabilite oranlarını artırmak konusunda yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Said ve Land, 2011).

1.5. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerinin Genel Özellikleri

Manyetik materyaller, en dıştaki elektronlarının dönmesiyle manyetik dipol oluşturan materyallerdir. Paramanyetik fazdaki bir materyal ise, ayrılmış dipollerle karakterizedir. Bu dipoller yalnızca dışarıdan bir manyetik alan ile düzenlenebilmektedir (Figuerola ve ark., 2010). Bu durum manyetik alanı artırmaktadır. Paramanyetik materyaller manyetik alandan uzaklaştırıldığında, manyetik özellikleri devam etmemektedir (Gupta ve Gupta, 2005 ve Mohammed ve ark., 2017).

Kristaldeki manyetik dipoller, kendiliğinden birbirlerine paralel olarak yerleşebilmekte; böylece düzenlenmek için dışarıdan bir manyetik alana ihtiyaç olmaksızın yanıt oluşturabilmektedir. Bu durum, ferromanyetizm olarak adlandırılmaktadır (Figuerola ve ark., 2010). Ferromanyetizm, birden fazla atom varlığında gerçekleşen kooperatif bir olay olarak kabul edilmektedir. Ferromanyetik partiküller manyetik alandan uzaklaştırılsa da, manyetiklikleri kalıcı olmaktadır (Gupta ve Gupta, 2005). Süperparamanyetik maddelerde ise paramanyetik ve ferromanyetik özellikler ortak olarak bulunmakta ve çoğu biyomedikal uygulama için yüksek manyetik doygunluğa sahip süperparamanyetik partiküller tercih edilmektedir (Borlido ve ark., 2013).

Demir oksit, demir ve oksijen elementleri tarafından oluşturulan bir bileşiktir. Doğada 3 ana demir oksit bileşiği bulunmaktadır. Bunlar: Nadir bulunan demir (II) oksit (FeO); demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) yani doğal mineral manyetit ve demir (III) oksit (Fe₂O₃) ya da diğer adıyla magemittir (Mohammed ve ark., 2017 ve Rahman ve ark., 2011). Demir oksit bileşiklerinin boyutlarının küçültülmesi, manyetik materyallerin biyomedikal uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır (Figuerola ve ark., 2010). ‘Nanopartikül’ boyut olarak 1 ila 100 nanometre (nm) boyutundaki maddeleri sınıflandırmak için kullanılan bir terimdir. Nanoteknolojinin gelişmesiyle, özellik ve taşınma anlamında bir bütün gibi davranan küçük maddeler olarak tanımlanan partiküller birçok alanda yer edinmeye başlamıştır (Rahman ve ark., 2011). Nanopartikül üretiminde önemli olan bir nokta partiküllerin boyutudur. Bunun nedeni, belirli sınırlardan daha küçük olan nanopartiküllerin manyetik özelliklerinin değişmesidir (Gupta ve Gupta, 2005 ve Mohammed ve ark., 2017). Örneğin 15 nm’den küçük partiküller ferromanyetizm özelliğini kaybetmektedir (Gupta ve Gupta, 2005).

Birçok demir oksit bileşeni doğada bulunabilse de, günümüzde özellikle biyomedikal araştırmalara uygunluk açısından magemit ve manyetit kullanılmaktadır (Borlido ve ark., 2013 ve Figuerola ve ark., 2010). Demir oksit nanopartiküllerinin sentezlenmesi için birçok yöntem vardır (He ve ark., 2014; Lu ve ark., 2007 ve Mohammed ve ark., 2017). Bunlardan bazıları; termal dekompozisyon, metal redüksiyon, mikroemülsiyon/nanoemülsiyon-bazlı sentez, hidrotermal/solvotermal sentez ve *flow* enjeksiyon yöntemleridir (He ve ark., 2014). Çoğunlukla tercih edilen yöntem olan ko-presipitasyon, yani eş zamanlı olarak bazik bir ortamda Fe²⁺ ve Fe³⁺ iyonlarının çöktürülmesi işlemi, kolay ve ucuz olmasıyla dikkat çekmektedir. Nanopartikül üretiminde en büyük önemi taşıyan faktörler; boyut, içerik, kolloidal stabilite ve yüzey fonksiyonlarıdır (Figuerola ve ark., 2010 ve Gupta ve Gupta, 2005).

Biyomedikal uygulamalarda kullanılan demir oksit bileşiklerinde yeterli düzeyde manyetizm, kimyasal stabilite, düşük toksisite ve düşük üretim maliyetleri olması gerekmektedir (Figuerola ve ark., 2010). Nanopartikül teknolojisi, özellikle biyomedikal, optik ve elektronik alanlarda kullanılabilirdiği için günümüzde bilimsel olarak çok ilgi görmektedir (Rahman ve ark. 2011).

1.5.1. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerinin Kullanım Alanları

Manyetik materyallerin özellikleri milattan önce 6. yüzyılda biliniyor olmasına karşın, bu özelliklerin fiziksel açıklaması 18. yüzyılda yapılabilmıştır (Livingston, 1997 ve Yavuz ve ark., 2009). Manyetik özelliklerin tanımlanmasını takiben, yeni gelişen kimyasal ve madencilik endüstrilerinde manyetik materyaller kullanılmaya başlanmıştır. İlk başlarda manyetik materyallerin kullanıldığı alanlar tamamen materyalin intrinsik manyetizmine bağlıyken, zamanla manyetik ayrıştırma teknolojisi karmaşıklaşmış ve daha fazla endüstriyel alanda yer bulmuştur (Yavuz ve ark., 2009).

Demir oksit nanopartikülleri; ferro-sıvılar (Raj ve ark., 1995) ve manyetokalorik buzdolabı (McMichael ve ark., 1992) gibi mekanik sektörde birçok alanda kullanılmaktadır (Rahman ve ark., 2011). Ayrıca, demirin kuvvetli indirgeyici özelliği sayesinde, kontamine su kaynaklarındaki ağır metal, farmasötik kalıntılar gibi birçok organik ve inorganik kirlilik kaynağı uzaklaştırılabilmektedir (Mohammed ve ark., 2017).

Biyomedikal alanda manyetik materyallerin kullanılabilmesi, yalnızca hedef için özel olarak üretilmiş ticari manyetik partikül elde edilmesiyle mümkün olmaktadır. Bu durum da, manyetik ayrıştırma işleminin konvansiyonel hale gelerek geniş çapta kullanılmasını önlemektedir. Manyetik ayrıştırıcılar prensipte birçok problemin çözümü için fayda sağlasa da, ayrıştırıcı parçaların tasarlanması ve parça üretim teknolojisinin karmaşıklığı nedeniyle yaygın olarak kullanılamamaktadır. Buna karşın, manyetik parçaların ticari olarak üretimi 2000'li yılların başından beri artmış ve biyomedikal uygulamalarda kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Bazı araştırmacılar, yüksek kalitede nanokristal özelliği gösteren ve daha geniş yüzey alanına sahip manyetik özlü materyallerin taşıyıcı olarak kullanımının ve kullanım alanlarının genişleyeceğini öngörmektedir (Yavuz ve ark., 2009).

Demir oksit, diğer manyetik parçalara kıyasla daha yüksek biyouyumluluğa sahip olması ve süperparamanyetik özellikleri sayesinde biyomedikal teknolojilerde tercih edilen materyal olmuştur (Figuerola ve ark., 2010 ve Mohammed ve ark., 2017).

Manyetik özellik gösteren demir oksit nanopartikülleri, biyoteknolojik alanlarda; protein, nükleik asit saflaştırma veya ayırma, tedavi amaçlı ilaç, gen ve radyonükleid iletimi, hipertermi oluşturarak tümör katabolizmasının sağlanması, manyetik biyosensör teknolojisi gibi alanlarda kullanılmasının yanı sıra manyetik rezonans ve infrared görüntüleme sistemleri için kontrast madde güçlendirici olarak da yer edinmiştir (Corchero ve Villaverde, 2009; Gupta ve Gupta, 2005; Kalambur ve ark., 2005; Mohammed ve ark., 2017; Pankhurst ve ark., 2003 ve Teng ve ark., 2009).

Manyetik ayırıştırma yöntemleri biyoteknoloji ve medikal alanlarda; protein ve hücre ayırıştırma, manyetik ilaç iletimi gibi birçok biyokimyasal işlem için uzaktan kontrol edilebilme imkânı sunması nedeniyle dikkat çekmiştir. Endüstriyel uygulamalara kıyasla laboratuvar koşullarında kullanılacak olan manyetik parçaların üretimine ayrıca özen gösterilmesi gerekmektedir (Yavuz ve ark., 2009).

İlk manyetik ilaç hedefleme uygulamaları 1970'li yılların sonlarında denenmiştir (Mosbach ve Schroder, 1979; Senyei ve ark., 1978; Yavuz ve ark., 2009 ve Widder ve ark., 1978). Uygulamanın başarılı olabilmesi için, taşıyıcının tamamen kontrol edilebilir olması gereklidir. Taşıyıcının toplanmaması, pıhtılaşmaması, tıkanmaya yol açmaması ve devamlı manyetik olmaması kesinlikle bulunması gereken özelliklerden olduğu için, süperparamanyetik demir oksitler, bu amaçla kullanılmaya en uygun partikülleri teşkil etmektedir (Yavuz ve ark., 2009).

Nanopartiküllerin boyutları ve yüzey alanları belirlenerek, bir tümörü hem pasif hem de aktif olarak hedeflemeleri sağlanabilmektedir. Pasif olarak tümör bölgesindeki yoğun damarlaşma ve damarların geçirgen yapısı sayesinde bölgede nanopartiküllerin toplanması şeklinde; aktif olarak ise, nanopartikül yüzeylerinin kanser hücrelerine spesifik ligandlarla kaplanması sayesinde tümör olan bölgede toplanabilmektedir (Figuerola ve ark., 2010). Nanopartiküllerin hedef spesifik hale getirilmesi için yüzeyleri kimyasal olarak amidler veya ester bağlarıyla eşlenerek, nanopartiküller istenen antikor, protein ya da ligandlarla kaplanmaktadır (Gupta ve Gupta, 2005).

Manyetik demir oksit nanopartiküllerinin yüzeyleri hedefe spesifik hale getirildikten sonra manyetik alanlar tarafından kontrol edilerek ısıtılabilir. Bu özellik, kanser tedavisinde lokalize hipertermik hücre ölümleriyle tümörün ortadan kaldırılmasını sağlayabilmektedir (Corchero ve Villaverde, 2009; Gupta ve Gupta, 2005 ve Mohammed ve ark., 2017).

1.5.2. Manyetik Demir Oksit Nanopartikülleri ile Seleksiyon

Ayrıştırma işleminin hızı önemli olmadığı ve ayrıştırılması istenen materyal katı veya süspansiyon halinde olduğunda genellikle sedimentasyon ve santrifüj yöntemleri tercih edilmektedir. Daha hızlı bir işlem yapılması gerektiği durumlarda ise filtrasyon sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, ayrıştırılacak karışımın içerisinde doğal olarak manyetik özellik barındıran maddeler bulunduğu manyetik ayrıştırma en iyi yöntem olarak kabul edilmektedir. Doğal olarak manyetik özellik taşımayan maddelerin bulunduğu durumlarda bile, ayrılması istenen ürünü hedefleyecek şekilde üretilen manyetik parçaların kullanılabilmesi, manyetik ayrıştırma işlemini neredeyse tüm sistemlere uygulanabilir hale getirmektedir (Yavuz ve ark., 2009). Manyetik ayrıştırma yöntemleri, santrifüj gibi rutin olarak kullanılan yöntemlerle karşılaştırıldığında, protein saflaştırmaya benzer şekilde hızlı ölçüm ve yüksek hücre ayrıştırıcılığı gibi avantajlar taşımaktadır (Chang ve ark., 2005 ve Yavuz ve ark., 2009). Manyetik materyaller kalıcı mıknatısların bir versiyonu olup, bu materyallerin bakım masrafı ve enerji ihtiyacı en az seviyededir. Ancak bu avantaj, manyetik parçaların biyolojik bileşenlerle etkileşime girebilmesi için kaplanma gereksinimi nedeniyle etkisini yitirmektedir (Haukanes ve Kvam, 1993; Lewin ve ark., 2000; Ugelstad ve ark., 1983 ve Yavuz ve ark., 2009).

Biyolojik materyallerin manyetik olarak ayrıştırılması yöntemi 30 yıldan uzun süredir hızlı ve etkili bir çözüm sunmaktadır (Dunnill ve Lilly, 1974; Guesdon ve Avrameas, 1977; Hirschbein ve Whitesides, 1982; Hubbuch ve ark., 2001; Robinson ve ark., 1973 ve Yavuz ve ark., 2009). Özellikle, manyetik partiküllerin düzgün kaplanması; maliyeti azaltmakla birlikte basitleştirilmiş ve hızlı bir saflaştırma işlemi

sağlamaktadır (Safarik ve Safarikova, 2004; Setchell, 1985 ve Yavuz ve ark., 2009). Manyetik hücre ayırımı ilk olarak 1975 yılında insanlarda kırmızı kan hücrelerinin manyetik özelliklerinden faydalanılarak gerçekleştirilmiştir (Melville ve ark., 1975). Kısa bir süre sonrasında, kırmızı kan hücreleri ve lenfoid hücrelerin ayırımı için manyetik mikrokürelerin antikor veya lektinlerle kaplanarak kullanılabilirdiği bildirilmiştir (Borlido ve ark., 2013 ve Molday ve ark., 1977).

Manyetik ayırıştırma yöntemi, hedef hücrelerin doğrudan saflaştırılması ya da istenmeyen kısmın ayrılıp uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Her iki durumda da, hücreler arası ayırımın yapılması için belirli işaretlere gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla nanopartikül yüzeyleri genellikle hücre yüzeyinde bulunan belirli bir antijene bağlanan antikorlarla kaplanarak hücre seçimi için kullanılmaktadır (Borlido ve ark., 2013). Gelişmekte olan medikal uygulamalar içerisinde nanopartikül hedefleme yönteminin yardımcı üreme tekniklerinde seleksiyon amaçlı kullanımı da yer almaktadır (Corchero ve Villaverde, 2009).

1.5.3. Manyetik Demir Oksit Nanopartikülleri ile Spermatozoa Seleksiyonu

Nanopartiküller kullanılarak spermatozoa seleksiyonuna yönelik yapılan ilk çalışmalarda laboratuvar testlerine ağırlık verilerek, nanopürifikasyon işleminin spermatozoa canlılığı ve hasarlı spermatozoa oranına etkisine bakılmış, nanopürifikasyon protokolünün optimize edilmesi amaçlanmıştır. Bu testlerin sonuçlarından yola çıkılarak IVF ve ST çalışmaları da yürütülmüştür (Sutovsky ve Kennedy, 2013).

Memeli hayvanların sperması değişken seviyelerde fertilite oranlarına sahip olmaktadır. Belirli anormal spermatozoa tiplerinin, oositleri fertilize edebilen normal spermatozoanın yüzeyinde bulunmayan eşsiz hücre yüzey bileşenleri oluşturduğuna dair bulgular gittikçe artmaktadır (Baska ve ark., 2008; İbrahim ve ark., 2000; Odhiambo ve ark., 2014; Olson ve ark., 2004; Sutovsky ve ark., 2001 ve Sutovsky ve Lovercamp, 2010). Bu tip spermatozoa yüzey bileşenleri, spermatozoa kalite ve

fertilitesinin negatif biyobelirteçleri olabilmekte (Odhiambo ve ark., 2014 ve Sutovsky ve Lovercamp, 2010), özel problemler kullanılarak belirlenebilmekte ve spermatozoa seleksiyonu için nanopartikül kullanılarak hedeflenebilmektedir (Odhiambo ve ark., 2014 ve Sutovsky ve Kennedy, 2013).

Hücre hedefleme amacıyla, spermatozoa yüzeyinde bulunan lektin ve karbonhidrat reseptör sistemlerinden yararlanılmaktadır. Lektinler, spermatozoon plazma membranındaki karbonhidratlara bağlanarak aglütinasyona neden olmaktadır. Özellikle domuzlar üzerinde yapılan birçok çalışmada, ekzojen lektinler kullanılarak fertil ve subfertil erkek hayvanlarda bu karbonhidratların normal, kapasite olmuş ve akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoa ile ilişkisi incelenmiştir (Feugang ve ark., 2015; Gonzales-Chabbarri ve ark., 1994; Herrera ve ark., 2002 ve Xin ve ark., 2014). İnsanlarda ve boğalarda hasarlı spermatozoanın yüzeyinde bulunan ubikuitinden faydalanılarak hasarlı spermatozoanın nanopartiküller ile uzaklaştırılmasına yönelik bir çalışma yürütülmüştür (Sutovsky ve ark., 2001). Boğa sperması ile yapılan güncel bir çalışmada lektinler (anti-ubikuitin veya PNA) ile kaplanmış manyetik nanopartiküller kullanılarak sperma örneklerinden anormal spermatozoa uzaklaştırılmış (Şekil 1.1) ve anti-ubikuitin ile kaplı nanopartiküller kullanıldığında suni tohumlama sonrasında sperma örneklerinin fertilité oranlarının arttığı gözlenmiştir (Odhiambo ve ark., 2014).



Şekil 1.1. Lektinler ile kaplanmış nanopartiküllerin bağlandıkları spermatozoa ile birlikte sperma örneğinden mıknatıs yardımı ile uzaklaştırılması (Odhiambo ve ark., 2014).

In vitro fertilizasyon ve ST çalışmalarının her ikisinde de bazı gruplarda nanopürifikasyon sayesinde gebelik oranlarında artış gözleendiği bildirilmiştir. Anti-ubikuitin ile kaplı nanopartiküller kullanılarak nanopürifiye edilen ve dozu yarıya düşürülen sperma örneğinden elde edilen gebelik sonuçları normal dozda işlem görmemiş sperma örneğine yakın, yarım doz işlem görmemiş sperma örneğinden ise daha fazla bulunmuştur. Ayrıca, damızlık boğalar ve farklı düvelerden elde edilen değişken gebelik sonuçları, nanopürifikasyon işleminin bazı boğa ve düvelerde diğerlerine kıyasla daha etkili olabileceğinden söz edilmektedir (Sutovsky ve Kennedy, 2013).

İnsan sperması kullanılarak yapılan birçok çalışmada rutin sperma işleme prosedürlerine Annexin-V ile kaplanmış nanopartikül seleksiyonu eklenmiş ve bulgular karşılaştırılmıştır. Tüm bu çalışmaların sonuçları nanopartikül ile seleksiyon prosedürünün rutin uygulanan prosedür olan dansite gradyanlı santrifügasyona ek olarak uygulandığında rutin spermatolojik analiz sonuçları, dondurma işlemine dayanıklılık ve fertilité açısından önemli bir katkıda bulunduğunu göstermektedir (Grunewald ve ark., 2006; Lee ve ark., 2010; Rawe ve ark., 2010; Said ve ark., 2005a; Said ve ark., 2005b; Said ve ark., 2006; Said ve ark., 2008 ve Vendrell ve ark., 2014). Buna karşın, yapılan bir dansite gradyanlı santrifügasyon ile birlikte nanopartikül seleksiyonu veya *swim-up* yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; *swim-up* yönteminin nanopartikül ile seleksiyon yöntemine göre motilite, morfoloji ve DNA fragmentasyonu açısından daha iyi sonuç verdiğiinden bahsedilmektedir (Nadalini ve ark., 2014).

Yapılan bir başka çalışmada, suni tohumlama için hazırlanan domuz spermasında özel olarak apoptoz aşamasındaki spermatozoayı hedef alacak nanopartiküller kullanılarak yeni geliştirilen bu yöntemin etkinliği araştırılmıştır. Bunun sonucunda, motilite parametrelerinden progresif hareket parametrelerini artırdığı ancak spermatozoanın güçlü hareketi ile ilgili parametreleri etkilemediği görülmektedir. Geliştirilen nanopartikül teknolojisinin sperma örneklerinin seleksiyonunda kullanımı; sperma dozlarının daha yüksek kalitede spermatozoa

içerecek şekilde zenginleştirilmesini sağlamak ve bu sayede fertilité performansını artırmaya yönelik umut vadetmektedir (Feugang ve ark., 2015).

İnsanlarda çeşitli lektin ve boyalar ile kaplı demir oksit nanopartiküllerinin kullanıldığı çalışmalara bakıldığında, çoğunlukla Annexin-V kaplamasının kullanıldığı dikkat çekmektedir (Grunewald ve ark., 2006; Lee ve ark., 2010; Nadalini ve ark., 2014; Rawe ve ark., 2010; Said ve ark., 2005a; Said ve ark., 2005b; Said ve ark., 2006; Said ve ark., 2008 ve Vendrell ve ark., 2014). Bu çalışmalarda Annexin-V kaplı nanopartiküller, apoptotik olan (Nadalini ve ark., 2014) veya erken apoptotik spermatozoaya bağlanması amacıyla kullanılmıştır (Odhiambo ve ark., 2014). Domuzlarda yapılan bir çalışmada, PNA ile kaplı nanopartiküller kullanılarak akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoanın uzaklaştırılması hedeflenmiştir (Feugang ve ark., 2015). Boğalarda yapılan bir çalışmada; ubikuitin, PNA ve PSA kaplı demir oksit nanopartikülleri kullanılmış ve defektli ya da oosit fertilizasyonu gerçekleştiremeyecek spermatozoanın uzaklaştırılması amaçlanmıştır (Odhiambo ve ark., 2014). Yapılan güncel bir çalışmada da, Annexin-V ve PNA/PSA kaplı nanopartiküllerin erken apoptotik spermatozoa ve akrozom membranı hasarlı veya prematüre kapasitasyon geçirmiş spermatozoanın yüzeyinde oluşan glikanlar ile bağlandığı bildirilmiştir (Durfey ve ark., 2018). Günümüze kadar yapılan nanopartiküller ile spermatozoa seleksiyonu çalışmalarında henüz kullanılmamış olan silika manyetit nanopartiküllerinin ise motil olmayan spermatozoayı hedeflediği belirtilmektedir (Clemente Associates Incorporated, 2016).

1.6. Spermatojik Analizler

Günümüzde kullanılan spermatozoa seleksiyon yöntemlerinin etkinliği genellikle motil spermatozoa sayısı, toplanan spermatozoa sayısı veya morfolojik olarak normal ve motil spermatozoa sayısı analiz edilerek belirlenmektedir (WHO, 2010 ve Srivastava ve ark., 2017).

Modern reproduktif teknolojilerde, temel amaç canlı yavru eldesi olarak kabul edildiğinde, spermatozoa fonksiyonuna ilişkin teorik ve pratik bilgi en önemli faktör olmaktadır. Suni tohumlama tekniklerinin başarısı, kullanılan sperma örneklerinin taze, kısa süreli saklanmış veya dondurulup-çözdürülmüş olması fark etmeksizin yüksek kalitede olmasına bağlıdır. Bu nedenle, sperma örneklerinin kalitelerinin kontrol edilmesi ve fertilité durumlarının tahmin edilebilmesi önem taşımaktadır (Holt ve ark., 2007). Spermatozoa motilite ve morfolojisi, spermatozoa kalitesinin incelenmesinde ve spermatozoa kalitesiyle fertilité arasındaki korelasyonun oluşturulmasında kullanılan önemli parametrelerdir (Verstegen ve ark., 2002).

Sperma analizlerinin ilk yapıldığı zamanlarda, spermatozoa kalitesi; kitle hareketi ve motilite gibi subjektif parametreler ve spermatozoa yoğunluğu ve morfolojik anormallikler gibi objektif parametreler ile değerlendirilmiştir. Subjektif yöntemler nedeniyle oluşan %30'a kadarlık bir hata payı nedeniyle turbidimetri (Donnelly ve ark., 1998), lazer-Doppler spektroskopisi (Budworth ve ark., 1987), zamanlı pozlama fotomikrografı (Aitken ve ark., 1983) ve fotometrik yöntemler (Burkman, 1991) gibi birçok yöntem geliştirilmiştir (Mortimer, 1997 ve Verstegen ve ark., 2002). Sonrasında ise, bilgisayarlı dijital görüntü analizi, gittikçe hız kazanan mikrobilgisayarlar ve *video frame* yakalayıcı düzeneklerin gelişmesiyle birlikte pratik olarak uygun bir yöntem haline almış (Glazzard ve ark., 1983); bunun sonucunda gerçek zamanlı spermatozoa motilite analiz ekipmanları geliştirilmiştir. Bu cihazlara, kolektif olarak bilgisayar-destekli sperm analizi (CASA) cihazı denmekte (Boyers ve ark., 1989) ve günümüzde çoğu spermatozoon baş hareketlerini, video kayıtlarından veya gerçek zamanlı olarak analiz etmektedir. Manüel veya yarı-otomatik gidiş-izi analizine göre CASA'nın avantajları; gidiş-izinin yeniden oluşturulmasında manüel müdahaleye gerek olmaması ve kinematik analizlerde kullanılan zamanın bir fraksiyonu süresinde her bir gidiş-izinin analiz edilebilmesidir (Mortimer, 1997).

Spermatozoanın flagellar ve baş hareketlerinin ölçüm unsurları için yöntemler geliştirilmiştir. Klinik önemin büyük bir kısmı spermatozoon baş hareketlerine verilse de; flagellar hareketin motiliteyi belirlediği ve bu nedenle spermatozoon baş

hareketlerinin kinematik tanımlamalarının değerlendirilmesi ve geliştirilmesinde göz önünde bulundurulması gerektiği unutulmamalıdır (Mortimer, 1997).

Serbest yüzen spermatozoanın gidiş-izleri flagellar ritim şekli ile belirlenmektedir. Böylece, farklı flagellar ritim modelleri farklı gidiş-izlerine yol açmaktadır (Suarez ve ark., 1983). Flagellar hareketin incelendiği ilk çalışmalarda, flagellum bileşenlerinin hareket özelliklerinin belirlenmesi için hidrodinamik prensipleri kullanmıştır (Denehy, 1975; Gray, 1955; Gray, 1958 ve Gray ve Hancock, 1955). Bu çalışmalarda, dikey eksene göre flagellum üzerindeki noktaların hareketleri incelenmiş ve flagellar ritim genliği, dalga boyu, frekansı ve dalga hızı belirlenmiştir. Dalga hızı, flagellum boyunca birbirini takip eden noktalar arasındaki faz farklılıkları ile hesaplanmıştır. Bu çalışmalardan sonra, flagellar analizler için alternatif yöntemler önerilmiş ve bu yöntemler güncel birçok flagellar hareket çalışmasında yer edinmiştir (Mortimer, 1997).

Önceki çalışmalar baş-orta kısım kesişimini spermatozoon üzerinde referans noktası almış olsa da (Suarez ve ark., 1983), video görüntüleme ve CASA gelişimi bu noktanın belirlenmesinin manüel ve yarı-otomatik gidiş-izi analiz yöntemlerine göre daha zor olması ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle günümüzde artık referans noktası olarak spermatozoon baş merkezi kullanılmaktadır (Mortimer, 1997).

Spermatozoa hareket parametreleri genellikle; üç spermatozoa hareket hız değeri, üç hız oranı ve üç spermatozoa istikrarsızlık karakterini gösteren parametreleri içermektedir (Lu ve ark., 2014). Çalışmalarda sıklıkla kullanılan CASA parametreleri; total motilite (TM), progresif motilite (PM), eğrisel hız (VCL), doğrusal hız (VSL), ortalama yol hızı (VAP), eğrisel yol doğrusallığı (LIN), ortalama yol doğrusallığı (STR), spermatozoon başının sapma mesafesi (ALH) ve çapraz geçiş frekans ritmini (BCF) içermektedir (Kathiravan ve ark., 2011). Bu CASA parametreleri, mikroskopik alan içerisinde hareket eden her bir spermatozoonun hareket parametrelerini tanımlamak amacıyla modellenmiş ve düzenlenmiştir (Kathiravan ve ark., 2011 ve Verstegen ve ark., 2002).

Alınan sperma örneğinin fertilité potansiyelinin değerlendirilmesi açısından motilité en önemli özelliklerden biri olarak kabul edilmektedir (Verstegen ve ark., 2002). Total motilité, hareketli spermatozoanın toplam spermatozoa yoğunluğuna oranı olarak belirlenmekte ve yüzde olarak bildirilmektedir. Progresif motilité, orta VAP değerinden daha büyük yol hızıyla hareket eden ve standart eşik değerden daha büyük STR'ye sahip olan hücre sayısının yüzde olarak ifade edilmesi ile elde edilmektedir (Kathiravan ve ark., 2011).

Spermatozoon merkezinin hareket hızı parametreleri; eğrisel hız (VCL), doğrusal hız (VSL) ve ortalama yol hızıdır (VAP) (Boyers ve ark., 1989 ve Lu ve ark., 2014). Bu hızların her biri spermatozoonun ilerleyişinin farklı bir unsurunu tanımlamaktadır (Mortimer, 1997). Belirlenen bu hız parametreleri içerisinde, VCL her zaman en yüksek değerde olurken, VSL en düşük değer olarak belirlenmektedir. Spermatozoon hareketleri düzgün ve doğrusal olduğu zaman VAP değeri, VSL değerine neredeyse eşit olarak hesaplanmaktadır (Kathiravan ve ark., 2011).

Eğrisel yol, gerçek 3 boyutlu gidiş-izinin 2 boyutlu bir yansımasıdır. Eğrisel hız, spermatozoonun eğrisel yol/yollar boyunca aldığı mesafeyi ifade etmekte ve gidiş-izi boyunca aldığı yolun toplanması ve zaman açısından düzeltilmesi ile hesaplanmaktadır (Holt ve ark., 2007; Mortimer, 1997 ve Verstegen ve ark., 2002).

Doğrusal hız, gidiş-izinin ilk ve son noktaları arasında doğrusal çizgi mesafesinin bulunması ve zaman açısından düzeltilmesi ile belirlenmektedir. Bu değer, zaman içerisinde net alınan mesafeyi vermektedir (Holt ve ark., 2007; Kathiravan ve ark., 2011; Mortimer, 1997 ve Verstegen ve ark., 2002).

Ortalama yol hızı, spermatozoonun genel gidiş-izinin uzunluğuna dair bilgi vermektedir (Holt ve ark., 2007; Kathiravan ve ark., 2011; Mortimer, 1997 ve Verstegen ve ark., 2002). Ortalama yol hızı, ortalama yolun uzunluğunun belirlenmesi ve zamana göre düzeltilmesi ile hesaplanmaktadır. Ortalama yolun matematiksel olarak belirlenmesi için, yolun koordinatlarının (x, y) ortalaması alınmakta ve alınan bu ortalamaların düzenlenmesi gerekmektedir (Kathiravan ve ark., 2011 ve Mortimer,

1997). Bu işlem sırasında fazla düzeltme veya az düzeltme gibi problemler oluşabilmektedir. Yetersiz düzeltme az sayıda nokta belirlenmesi nedeniyle, fazla düzeltme ise fazla sayıda nokta belirlenmesi nedeniyle oluşmaktadır. Bu durumun engellenmesi için, CASA cihazlarında adapte olabilen düzeltme programları bulunmaktadır (Mortimer, 1997).

Gidiş-izinin daha detaylı açıklanması için, üç hız oran değeri geliştirilmiştir: Bunlar; LIN, doğrusal çizgi ve eğrisel yolların karşılaştırılması; STR, doğrusal çizgi ve ortalama yol karşılaştırması; ve kararsızlık (WOB), ortalama ve eğrisel yolların karşılaştırmasıdır (Boyers ve ark., 1989; Lu ve ark., 2014 ve Mortimer, 1997).

Eğrisel yol doğrusallığı, spermatozoon tarafından alınan 3 boyutlu yolun 2 boyutlu yansıması ile net aldığı yol arasındaki ilişkiyi tanımlamakta ve $(VSL/VCL) \times 100$ şeklinde hesaplanmaktadır (Holt ve ark., 2007; Mortimer, 1997 ve Verstegen ve ark., 2002). Eğrisel yol doğrusallığının fertilité ile belirgin bir ilişkisi bulunduğu; hatta fertilitenin tahmin edilmesinde tek başına kullanılabileceği düşüncesini savunan bazı araştırmacılar mevcuttur (Marshburn ve ark., 1992 ve Verstegen ve ark., 2002).

Ortalama yol doğrusallığı, net alınan yol ile spermatozoonun genel gidiş-izi arasındaki ilişkiyi tanımlamakta ve $(VSL/VAP) \times 100$ şeklinde hesaplanmaktadır (Holt ve ark., 2007; Kathiravan ve ark., 2011; Mortimer, 1997 ve Verstegen ve ark., 2002). Bu değer, spermatozoonun izlediği yolun düz bir çizgiden sapma mesafesini ölçmektedir (Kathiravan ve ark., 2011).

Kararsızlık, ortalama yol üzerinde asıl gidilen yolun salınımını ifade etmekte ve $(VAP/VCL) \times 100$ şeklinde hesaplanmaktadır (Lu ve ark., 2014 ve Mortimer, 1997).

Spermatozoa istikrarsızlık karakteristiğini yansıtan parametreler; ALH, BCF ve ortalama açısal yer değiştirmeyi (MAD) içermektedir (Lu ve ark., 2014).

Spermatozoon başının sapma mesafesi, spermatozoon yüzerken baş salınımının ortalama genişliğini ifade etmekte (Holt ve ark., 2007; Kathiravan ve ark., 2011 ve Verstegen ve ark., 2002) ve flagellar ritim örtüsünün yaklaşık değeri olarak kullanılmaktadır. Doğru bir genlik değeri değildir; çünkü dalganın tepe noktasıyla kıvrımın kıvrılma noktası arasındaki dikey mesafeyi ölçmemekte, merkez noktasının yol içerisinde tepe ve vadi noktaları arasındaki mesafesini vermektedir (Mortimer, 1997). Spermatozoon başının sapma mesafesinin hesaplanması için birçok yöntem bulunmakta ve 2 tip ALH bildirilmekte; ALH_{max} , yol boyunca belirlenen en yüksek ALH değerini, ALH_{mean} ise yol boyunca bazı ALH değerlerinin ortalamasını ifade etmektedir (Mortimer, 1997).

Çapraz geçiş frekans ritmi, flagellar ritim sıklığı hakkında fikir vermesi açısından geliştirilmiştir. Spermatozoonun her kuyruk hareketi başlangıcında döndüğü varsayıldığında, her bir apeks, flagellar atımdaki bir değişimin; eğrisel yol her yön değiştirdiğinde ise, ortalama yol yeni bir flagellar ritmin sonucu olmaktadır (Mortimer, 1997). Çapraz geçiş frekans ritmi flagellar ritim modelindeki büyük değişikliklerin tahmin edilebilmesi açısından faydalı bir parametredir (Kathiravan ve ark., 2011).

Hiperaktivasyon, memeli spermatozoasının hızlı, progresif ve doğrusal olmayan bir hareket şekli olarak tanımlanmaktadır (Kathiravan ve ark., 2011 ve Verstegen ve ark., 2002). Bu hareket şekli kapasitasyon sonrasında, bir diğer ifadeyle akrozom reaksiyonundan hemen önce dişi genital kanalı içerisinde ilerlemeleri sırasında ortaya çıkmaktadır. Hiperaktivasyon sırasında, spermatozoonun izlediği yol ve hızı büyük oranda değişmektedir. Bu değişiklikler; geniş genlik, baş ve kuyruğun belirgin şekilde lateral hareketleri ile birlikte yavaş veya progresif olmayan bir motilite ve olduğu yerde dönme (*star-spin*) hareketini içermektedir (Kathiravan ve ark., 2011). Hiperaktivasyonun spermatozoona, özellikle zona olmak üzere oosit dış katmanları arasından geçerken, kuvvetli itici bir güç sağladığı düşünülmektedir (Kathiravan ve ark., 2011 ve Yanagimachi, 1984). Bazı çalışmalarda, hiperaktive motilitesini kaybeden spermatozoanın *in vitro* koşullarda oositleri fertilize edemediği belirlenmiştir (Fleming ve Kuehl, 1985; Fleming ve Yanagimachi, 1982 ve Kathiravan ve ark., 2011). Bu fizyolojik işlemin objektif ölçümünün, spermatozoanın fonksiyonel

kabiliyetlerinin değerlendirilmesi açısından biyolojik bir belirteç olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (Kathiravan ve ark., 2011).

Membran bütünlüğü ve yarı-geçirgen özelliğinin stabilitesi spermatozoonun canlılığının ön koşullarını oluşturmaktadır. Membran sağlam olduğu halde, fonksiyonel olarak dengesiz olduğunda, spermatozoon çevresi ile etkileşime geçememekte dolayısıyla fertilizasyon yeteneğini kaybetmektedir (Rodriguez-Martinez, 2007). Viabilite ya da diğer adıyla ölü/canlı oranı, sperma örneği içerisinde bulunan canlı spermatozoa oranını ifade etmektedir. Bu oranın belirlenmesi için sıklıkla kullanılan SYBR-14 floresan boyası membran-permeabl özelliğe sahiptir. SYBR-14 canlı hücrenin membranından geçerek hücre çekirdeğini parlak yeşil bir renge boyamakta; propidyum iyode (PI) canlı hücrenin membranını geçememekte, dolayısıyla yalnızca ölü olan hücreleri kırmızıya boyayabilmektedir (Nagy ve ark., 2003). SYBR-14 ve PI birlikte kullanıldığında, yeşil ve kırmızı spermatozoa sayımı yapılarak viabilite oranı kolaylıkla elde edilebilmektedir (Garner ve ark., 1994; Garner ve ark., 1997 ve Nagy ve ark., 2003). Bu yöntem ilk olarak 1994 yılında geliştirilerek boğa spermasında denenmiş (Garner ve ark., 1994); takip eden yılda aynı araştırmacılar tarafından boğa spermasının yanı sıra domuz, koç, tavşan, fare ve insan spermasında viabilitenin belirlenmesinde kullanılmış ve diğer yöntemlere göre avantajlı olduğu bildirilmiştir (Garner ve Johnson, 1995).

Fertilizasyonun bir önkoşulu olan akrozom bütünlüğü, faz-kontrast mikroskopik analiz ile *in vitro* olarak değerlendirilebilmektedir (Rodriguez-Martinez, 2007). Floresan boya olarak floresan izotiyosiyanat-konjugasyonlu *Arachis hypogaea* (peanut) aglütinin (FITC-PNA) ve PI boyası birlikte kullanıldığında, akrozomu bütün olan spermatozoonun akrozomu boya almamakta ve floresan renk vermemekte, akrozom reaksiyonu geçirmiş veya akrozomu hasarlı spermatozoonun akrozom kısmı ise yeşil floresan parlama ile ayırt edilmektedir. Bu yöntemde, spermatozoa hücre olmayan partiküllerden kolaylıkla ayırt edilebildiği için iki boyalı spermatozoa akrozom bütünlüğü değerlendirmesi; taze ve *in vitro* kapasite edilmiş spermatozoa için güvenilirliği yeterli kabul edilmektedir (Nagy ve ark., 2003).

Spermatozoanın orta kısmında helikal yerleşim gösteren mitokondrilerin iç kısmındaki bölüm, enerji üretim noktasıdır. Aksonemin proksimal kısmının çevresindeki mitokondri yerleşimi, flagellar motilitede kullanılan enerjinin sağlanması için mitokondri aktivitesinin gerekli olduğunu göstermektedir (Mortimer, 1997). Mitokondriyal aktivasyonun incelenmesi için kullanılan floresan boyalar içerisinde 5,5', 6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3' tetraetil-benzimidazolilkarbosiyanin iyodit'in (JC-1) diğer boyalara göre daha detaylı bilgi edinilmesine olanak sağladığı için avantajlı olduğu bildirilmektedir. Bu boya hem yeşil dalgaboylarında (510-520 nm), hem de kırmızı-turuncu aralığında (590 nm) eksitasyon ve emisyon pikleri yapmaktadır. Yüksek membran potansiyeline sahip mitokondriler kırmızı-turuncu, düşük ile orta arası membran potansiyeline sahip olan mitokondriler ise yeşil floresan parlama yapmaktadır. Ancak, kırmızı ve yeşil floresan parlamalarının ayırt edilmesi güç olabilmektedir. Böyle durumlarda floresan veren ve hiç floresan parlama oluşturmayan mitokondrilerin sayılarının oranına bakılarak motilite hakkında yorum yapılabilmektedir (Garner ve ark., 1997).

Tüm bu bilgiler ışığında, tez çalışmasında Ankara tekesi spermasının kalitesinin artırılması amacıyla Annexin-V, PSA ve silika manyetit ile kaplı nanopartiküller kullanılarak sperma örnekleri nanopürifiye edilmiştir. Nanopürifikasyon işleminin şimdiye kadar uygulandığı çalışmalarda prosedürün yalnızca 37°C'de yapıldığı dikkat çekmektedir. Bu sıcaklıkta spermanın bekletilmesinin spermatozoa üzerinde olumsuz etkiler oluşturabileceği çekincesi göz önünde bulundurularak, nanopürifikasyon işleminin saha koşullarına adaptasyonunun kolaylaştırılması için, tez çalışması kapsamında 21°C ve 4°C'de nanopürifikasyon işlemlerinin uygunluğunun araştırılması hedeflenmiştir. Bunun yanı sıra, nanopürifikasyon yöntemi uygulanan Ankara tekesi spermasının dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında spermatozoanın korunmasına katkısı, rutinde kullanılan kinetik (TM, PM, VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, hiperaktivite) ve morfolojik parametreler (akrozom bütünlüğü, viabilite, mitokondriyal aktivasyon) ile değerlendirilerek, bu yöntemin tekelerde rutin ve saha koşullarında kullanıma uygunluğu ve başarısının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Tez çalışması, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan 3 adet Ankara tekesinden toplanan sperma örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma prosedürü, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylanmıştır (Etik Kurul Onayı Karar No: 2018-14-90). Etik kurul onayı ekte sunulmuştur.

Çalışmanın tamamı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği Dölerme ve Suni Tohumlama Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dışkapı Kampüsünde Dölerme ve Suni Tohumlama Laboratuvarında bulunan alet ve ekipmanlar (Su banyosu-Kottermann, Accucel fotometre-IMV technologies, Suni vajen, Elektro Ejakülatör-Minitube e320, Buzdolabı, CASA-Sperm Class Analyzer®-Microptic, Floresan mikroskop-Leica DM2500) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan nanopartiküller; silika manyetit, Annexin-V ve *Pisum sativum* agglutin (PSA) ile kaplı demir oksit nanopartikül kokteyli şeklinde (Clemente Associates Incorporated, Madison, Connecticut, Amerika Birleşik Devletleri) alınmıştır. Floresan analizleri için; SYBR-14/Propidyum İyode (*Live/Dead Sperm Viability Kit*, İnvitrogen, Thermo Fischer Scientific), *Arachis hypogaea* (peanut) lektini (FITC-PNA, 1 mg liyofilize pudra, Sigma) ve JC-1 (5 mg, İnvitrogen, Thermo Fischer Scientific) boyları kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Ankara Tekesi Seçimi

Tez çalışması, 2017 yılı Kasım ayı ile 2018 Temmuz ayları arasında yürütülmüştür. Tez çalışmasında kullanılan Ankara tekeleri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bir örnek şekilde rasyonla beslenmektedir. Tez çalışması için, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan toplam 4 adet sağlıklı Ankara tekesi androlojik muayene sistemiği doğrultusunda muayene edilerek 3 teke çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir. Ankara tekelerinin seçilmesi amacıyla birleştirilmiş androlojik muayene sistemiği uygulanmıştır. Bu amaçla ilk olarak tekelerin genel muayeneleri (yaş tayini ve genel fiziksel muayene) yapıldıktan sonra ultrasonografik ve testiküler ölçümler ile reproduktif organ muayeneleri gerçekleştirilmiş ve bulgular kaydedilmiştir. Daha sonra her tekeden birer sperma örneği alınarak spermatolojik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Birleştirilmiş androlojik muayene sistemiği sonucunda elde edilen bulgular değerlendirilerek tez çalışmasında kullanıma uygun 3 Ankara tekesi belirlenmiştir.

2.2.2. Nanopartikül Doz Optimizasyonu

Tekelerin sperma örneklerinin genel ortalamalarının belirlenmesi ve nanopartikül doz optimizasyonu amacıyla ön çalışma yapılmıştır (Çizelge 2.1). Tez çalışmasında kullanılan nanopartikül dozu bu çalışma sonucunda kesinleştirilmiştir. Nanopartikül dozları 1 ml sulandırılmış sperma örneğine eklenen nanopartikül miktarı (μg) şeklinde belirtilmiş; bu aşamadaki nanopürifikasyon işlemi 37°C 'de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.1. Nanopartikül doz optimizasyonu çalışma grupları ve gruplara uygulanan işlemler.

Gruplar	Sulandırılan Spermaya Uygulanan İşlemler			
	1 ml sulandırılmış spermaya katılan nanopartikül miktarı	Bekleme süresi (5 dk aralıklarla karıştırılarak)	Mıknatıs üzerinde ayırma süresi	Ekilibrasyon süresi
Kontrol	-	-	-	1,5 saat
1	1 µg	20 dk	10 dk	1,5 saat
5	5 µg	20 dk	10 dk	1,5 saat
10	10 µg	20 dk	10 dk	1,5 saat
20	20 µg	20 dk	10 dk	1,5 saat

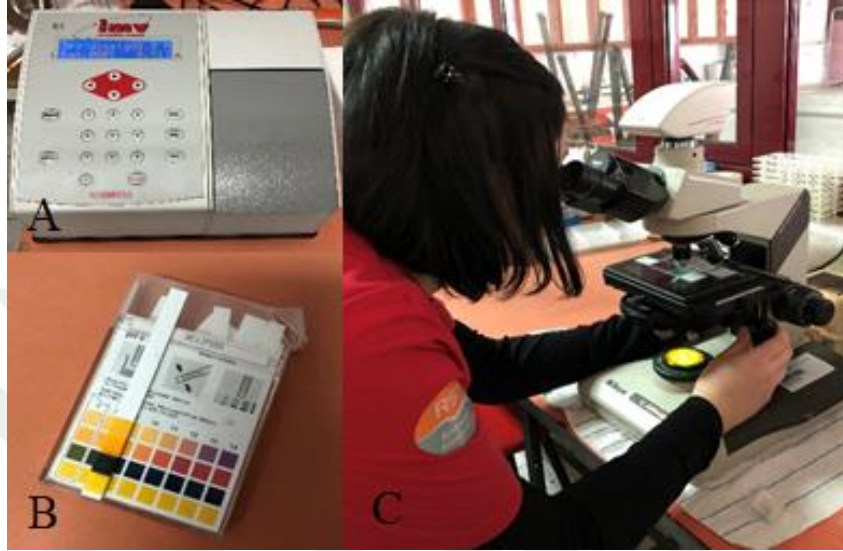
2.2.3. Farklı Sıcaklıklarda Nanopürifikasyon

Tez çalışmasında Ankara tekelerinden minitube e320 otomatik elektroejakülatör yardımıyla sperma örnekleri alınmıştır (Şekil 2.1). Tez çalışmasında kullanılan 3 Ankara tekesinden haftada 2 kez olmak üzere toplamda 7'şer sperma örneği toplanmıştır. Alınan sperma örnekleri; miktar, pH, yoğunluk, kitle hareketi ve motilite açısından değerlendirilerek normospermi özelliği gösteren örnekler çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil 2.1. Otomatik elektro ejakülatör.

Toplanan sperma örneklerinde miktar, pH, kitle hareketi ve yoğunluk sulandırma öncesinde ölçülerek kaydedilmiştir. Sperma örnekleri sulandırıldıktan sonra subjektif motilite yüzdeleri 5 farklı mikroskobik alanın incelenmesi ve ortalama motilitenin hesaplanmasıyla kaydedilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Taze sperma örneklerinde yapılan incelemeler: A- konsantrasyon ölçümü için kullanılan fotometre; B- pH ölçümü için kullanılan pH stripleri; C- kitle hareketi ve subjektif motilite tayini.

Her bir örnek 200×10^6 sp/ml dozu dikkate alınarak; Tris, sitrik asit, glikoz, %10 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren sulandırıcı (Şekil 2.3) kullanılarak sulandırılmıştır. Alınan ve sulandırılan her örnek 4 gruba ayrılmıştır (Çizelge 2.2).

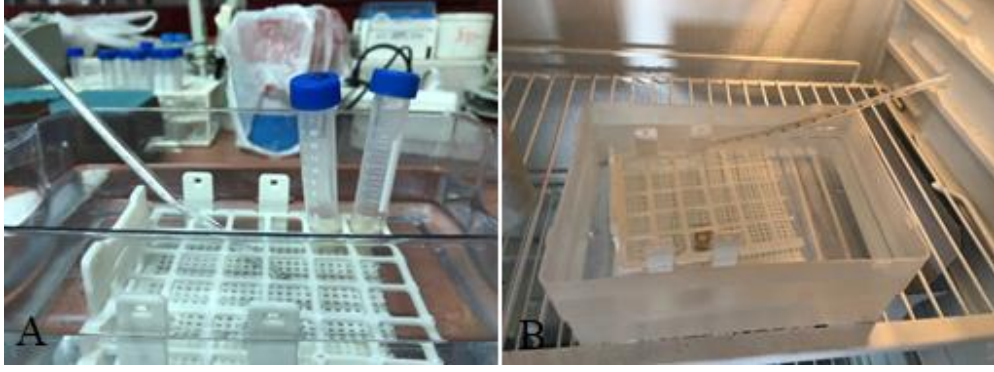


Şekil 2.3. Tris, sitrik asit, glikoz, %10 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren teke sperma sulandırıcısı.

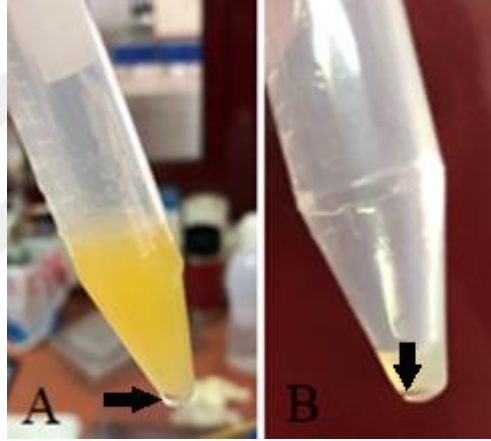
Çizelge 2.2. Farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon çalışma grupları ve gruplara uygulanan işlemler.

Gruplar	Nanopartikül eklenme sıcaklığı	Bekleme süresi (5 dk aralıklarla karıştırarak)	Mıknatıs üzerinde ayırma süresi	Ekulibrasyon süresi
Kontrol	-	-	-	1,5 saat
37°C	37°C	20 dk	10 dk	1,5 saat
21°C	21°C	20 dk	10 dk	1,5 saat
4°C	4°C	20 dk	10 dk	1,5 saat

İlk grup nanopartikül uygulamasına dahil edilmeden doğrudan payetlere çekilerek rutin prosedür doğrultusunda ekulibrasyon ve dondurma işlemleri gerçekleştirilmiştir. İkinci gruba $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de; 3. gruba $21\pm 1^\circ\text{C}$ 'de; 4. gruba ise $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'de nanopartikül ($10\ \mu\text{g/ml}$ sulandırılmış sperma) eklenmiş ve 20 dakika boyunca 5 dakikada bir hafif dairesel hareketlerle karıştırılarak bekletilmiştir (Şekil 2.4). Daha sonra örnekler mıknatıs üzerinde 10 dakika bekletilerek uzaklaştırılması istenen spermatozoaya bağlanan nanopartiküllerin dibe çökmesi sağlanmıştır (Şekil 2.5). Sonrasında üstte kalan sperma alınarak rutin ekulibrasyon ve dondurma protokolleri uygulanmıştır.

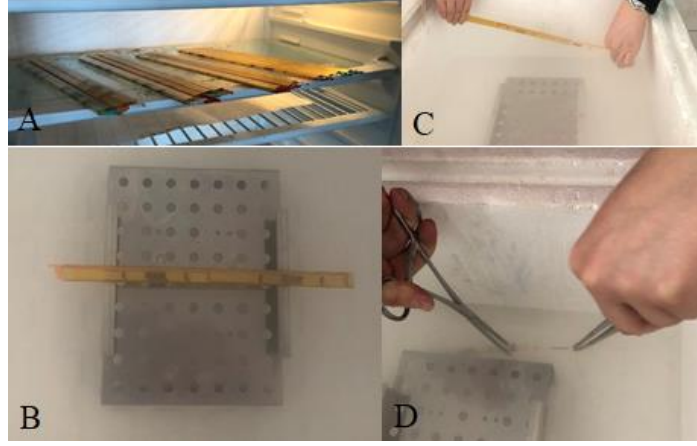


Şekil 2.4. Sulandırılmış sperma örneklerine farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon uygulaması: A- $21\pm 1^\circ\text{C}$ 'de; B- $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'de nanopartikül eklenerek bekletilme alanları.



Şekil 2.5. Nanopartikül eklenen sulandırılmış sperma örneklerinden nanopartiküllerin ayrılması: A- Sperma örneği mıknatıs üzerinden alındıktan sonra dibeye çökmüş olarak görünen nanopartiküller; B- Sperma örneği ayrıldıktan sonra geri kalan nanopartikül içeren kısım.

Ekilibrasyon ve dondurma protokolü Leboeuf ve ark. (2000)'ın çalışmasından modifiye edilmiştir. Tüm gruplar pratikte kullanılan yöntemine göre; 4°C 'de 1,5 saat ekilibrasyona tabi tutulmuş ve sıvı azot seviyesinden 4-5 cm yüksekte olacak şekilde sıvı azot buharında 10 dakika bekletilip sıvı azot içerisine yerleştirilerek dondurulmuştur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ekilibrasyon ve dondurma işlemi aşamaları: A- ekilibrasyon için buzdolabında 1,5 saat bekleme; B- sıvı azot seviyesinden 4-5 cm yükseklikte 10 dk bekleme; C- sıvı azot içerisine daldırma; D- gobletlere yerleştirerek depolanmaya hazırlama.

Dondurulan örnekler azot tankı içerisinde; çözüm sonu analizler yapılana kadar bekletilmiştir.

2.2.4. Motilite ve Kinetik Parametre Analizleri

Gruplardaki sperma örneklerinin çözüm sonu motiliteleri ve hareket özellikleri CASA, *Sperm Class Analyzer* (SCA® v.4.2, Barcelona, Spain) ile değerlendirilmiştir. Her bir örnekten 5 µl alınarak lam üzerine damlatılmış ve üzeri lamel ile kapatılarak; sisteme bağlı faz-kontrast mikroskopunda 100× objektifte 60 *frame*'lik kamera (Basler®) kullanılarak her bir örnek için en az 5 farklı alandan alınan görüntüler analiz edilmiştir. Yapılan analizde spermatozoa TM (%), PM (%), VCL (µm/s), VSL (µm/s), VAP (µm/s), LIN (%), STR (%), WOB (%), ALH (µm), BCF (Hz), hiperaktivite (%) parametreleri değerlendirilerek kaydedilmiştir.

2.2.5. Morfolojik Analizler

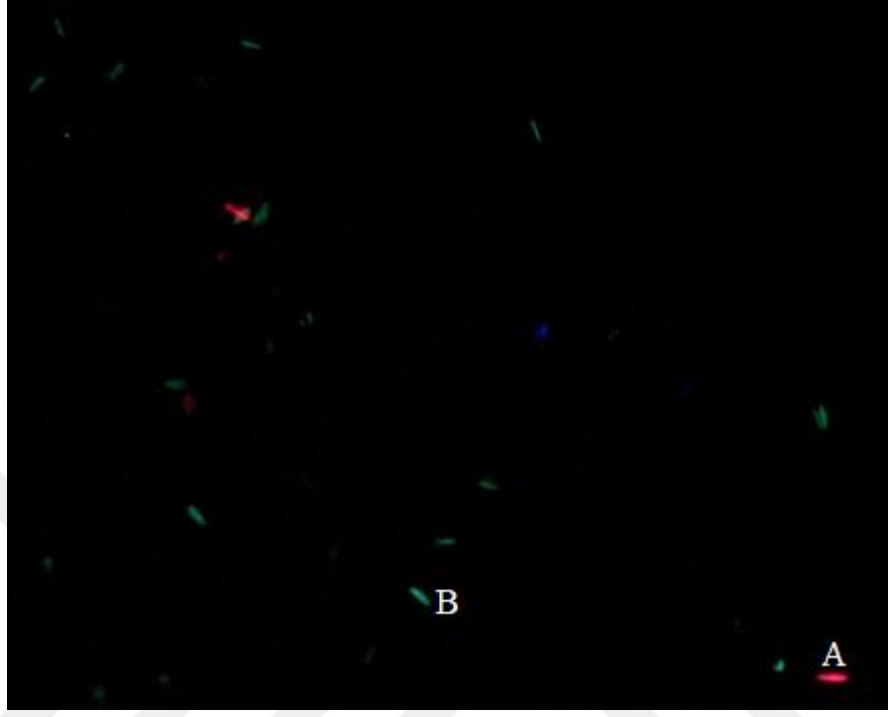
Floresan mikroskobu kullanılarak yapılan analizlerde üç ayrı boyama protokolü izlenmiştir. Bu boyama protokollerinde ortak olarak Hancock solüsyonu kullanılmıştır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Hancock solüsyonu hazırlanışı (Schafer ve Holzmann, 2000).

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

Gruplardaki spermatozoa, viabilite açısından değerlendirilmek için ölü/canlı kiti (SYBR-14/PI Moleküler Probe: L7011 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ile boyanmıştır. Boyama protokolü Garner ve Johnson (1995)'nin çalışmasından modifiye edilmiştir. SYBR-14 çalışma solüsyonu 1:50 oranında dimetil sülfoksit (DMSO- Applichem A3006) ile sulandırılmıştır. 0,22 µml'lik Millipore Millex-GV filtre ile filtre edildikten sonra 80 µl'lik parçalara ayrılarak -20°C'de saklanmıştır. Kit içerisinde bulunan PI boyası kullanıma hazır halde alınmış ve 0,22 µm'lik Millipore Millex-GV filtre ile filtre edildikten sonra 75 µl'lik parçalara ayrılarak -20°C'de saklanmıştır. Çözdürülen spermalar, 1:2 oranında *fosfat buffer saline* (PBS) ile sulandırıldıktan sonra 30 µl alınan sperma 8,5 µl SYBR-14 eklenerek 37°C'de 7 dakika bekletilmiş, sonrasında 2,5 µl PI ile karıştırılmış ve 37°C'de 7 dakika daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde fizyasyon sağlanması için, hazırlanan solüsyona 10 µl Hancock solüsyonu (Schafer ve Holzmann, 2000) eklenmiştir. Boyanan örnekten 2,5 µl'lik bir damla alınarak lama damlatılmış ve üzerine lamel kapatılmıştır. Floresan mikroskopta membran bütünlüğü açısından her bir örnekten en az 200 spermatozoa incelenmiştir. Baş kısımları açık yeşille boyalı olanlar membranı

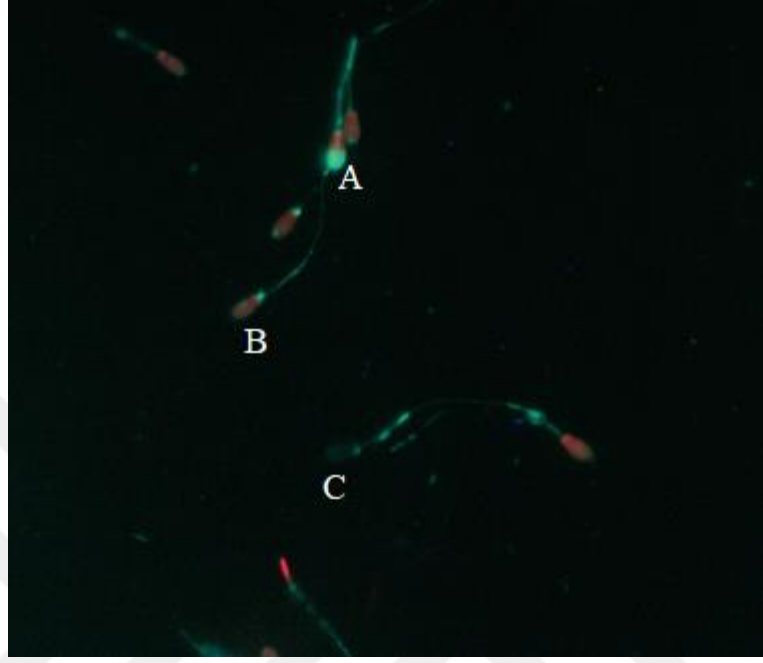
sağlam (canlı) spermatozoayı, kırmızı boyalı olanlar ise membranı hasarlı (ölü) spermatozoayı temsil edecek şekilde analiz sonuçları kaydedilmiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Ankara tekelerinden elde edilen sperma örneklerinin farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon sonrası SYBR-14 ve PI boya kullanılarak viabilite açısından analizi: A- Kırmızı boya (PI) alan ölü spermatozoon; B- Yeşil boya (SYBR-14) alan canlı spermatozoon.

Spermatozoa akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesi için Nagy ve ark. (2003)'ün protokolü modifiye edilerek; FITC-PNA (L7381 FITC-PNA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) ve PI boyası kullanılmıştır. Bir mg FITC-PNA liyofilize toz preparat üzerine 1 ml PBS eklenerek boyama solüsyonu hazırlanmış ve daha sonra filtre edilerek 100 µl'lik bölümlere ayrılıp -20°C'de saklanmıştır. Çözdürülen sperma 1:2 oranında PBS ile sulandırılmış ve daha sonra 60 µl sulandırılmış spermaya 10 µl FITC-PNA ve 2,5 µl PI eklenmiştir. Hazırlanan preparat iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiş ve fikzasyon için 10 µl Hancock solüsyonu (Schafer ve Holzmann, 2000) eklenmiştir. Boyanan sperma örneğinden 2,5 µl alınarak lama damlatılmış ve üzerine lamel kapatılmıştır. Floresan mikroskopta akrozom bütünlüğü açısından her bir örnekten en az 200 spermatozoa incelenmiştir.

Akrozomu yeşil boya alanlar hasarlı; akrozomu boya almayanlar ise sağlam akrozoma sahip spermatozoayı temsil etmiş ve analiz sonuçları kaydedilmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Ankara tekelerinden elde edilen sperma örneklerinin farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon sonrası FITC-PNA ve PI boyaları kullanılarak akrozom bütünlüğü açısından analizi: A- Baş kısmı kırmızı (PI), akrozom kısmı yeşil boya (FITC-PNA) alan akrozomu bozuk ve ölü spermatozoon; B- Baş kısmı kırmızı boya (PI) alan akrozomu boya almayan akrozomu bütün ölü spermatozoon; C- Baş kısmı veya akrozomu boya almayan akrozomu bütün ve canlı spermatozoon.

Spermatozoa mitokondriyal aktivasyonu Garner ve ark. (1997)'ın protokolü modifiye edilerek değerlendirilmiştir. Stok solüsyon, JC-1 (T3168 JC-1, Invitrogen) ve DMSO solüsyonu ile hazırlanmış; filtre edildikten sonra 25 µl'lik bölümlere ayrılarak -20°C'de saklanmıştır. Çözdürülen sperma 1:5 oranında PBS ile sulandırıldıktan sonra 300 µl spermaya 2,5 µl JC-1 ve 2,5 µl PI eklenerek karıştırılmış ve inkübasyon için 37°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra fikzasyon için 20 µl Hancock solüsyonu (Schafer ve Holzmann, 2000) eklenmiştir. Boyanan örnekten 2,5 µl alınarak lama damlatılmış ve üzerine lamel kapatılmıştır. Floresan mikroskopta mitokondriyal aktivasyon yönünden her bir örnek için en az 200 spermatozoa incelenmiştir. Mitokondrinin olduğu orta kısımda parlak sarı/turuncu veya yeşil floresanın bulunması mitokondriyal aktivitenin olduğunu, orta kısmın boya almaması

ise mitokondriyal aktivitenin olmadığını ifade etmiş ve analiz sonuçları kaydedilmiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Ankara tekelerinden elde edilen sperma örneklerinin farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon sonrası JC-1 ve PI boya kullanılarak mitokondriyal aktivite açısından analizi: A- Baş kısmı kırmızı boya (PI) alan mitokondriyası boya almayan mitokondriyal aktivitesi bulunmayan ölü spermatozoon; B- Baş kısmı kırmızı boya (PI) alan mitokondriyası yeşil veya turuncu boya (JC-1) alan mitokondriyal aktivitesi olan ölü spermatozoon.

2.2.6. İstatistiksel Analizler

Elde edilen tüm veriler önemlilik testlerinden önce parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilk testi ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelenmiştir. Normal dağılan değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış, gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Tukey Testi'nden yararlanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü Kruskal Wallis testi ile yapılmış, gruplar

arası farklılığın anlamlı bulunduğu değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Bonferroni düzeltmesi ile birlikte Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Değişkenler arası ilişkinin incelendiği parametreler (Voltaj, miktar, pH, konsantrasyon, kitle hareketi ve subjektif motilite) için Spearman korelasyon katsayısı testi uygulanmıştır. Elde edilen bulgular ortalama \pm standart hata şeklinde sunulmuştur. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelenmiş ve SPSS Statistics Subscription programından yararlanılmıştır.



3. BULGULAR

3.1. Ankara Tekelerinin Androlojik Muayene Bulguları

Çalışma için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim ve Araştırma Çiftliğinde bulunan 4 adet Ankara tekesine yapılan androlojik muayene sonuçları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Teke seçimi amacıyla yapılan androlojik muayenede testiküler ölçüm bulguları.

Kulak No	2001	2003	0790	4856
Yaş	1-2	1-2	4-5	>10
<i>Testiküler Ölçümler</i>				
Skrotal çevre (cm)	10,5	10,2	14,5	10,0
Sol testis genişliği (cm)	3,5	3,7	5,5	4,0
Sağ testis genişliği (cm)	4,0	3,5	5,0	3,0
Sol testis yüksekliği (cm)	5,5	6,0	10,0	8,0
Sağ testis yüksekliği (cm)	7,0	6,5	10,0	6,0
Sol testis derinliği (cm)	3,0	3,5	5,5	3,5
Sağ testis derinliği (cm)	3,5	3,0	5,5	3,5
Testiküler dejenerasyon indeksi (0-3)	0	0	2	3
<i>Spermatolojik Ölçümler</i>				
Miktar (ml)	1,5	1,5	2,5	-
pH	6,7	7	6,5	-
Yoğunluk (sp/ml)	1,5×10 ⁹	0,9×10 ⁹	3×10 ⁹	-
Kitle hareketi (0-5)	4	3	5	-
Subjektif motilite (%)	77	60	87	-

Ultrasonografik muayene sırasında 2001 kulak numaralı tekenin sol testis mediastinumunun ince olduğu; 4856 kulak numaralı tekenin ise testislerinde geniş kalsifikasyon alanları gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, 4856 kulak numaralı tekenin genital organlarının palpasyonu sırasında sağ epididimisinin şişkin olduğu ve testislerin normalden sert bir yapıda olduğu belirlenmiştir. Androlojik muayene kapsamında bu tekedan sperma alınamamıştır. Yapılan androlojik muayenelerin sonucunda 4856 kulak numaralı tekenin yaşı ve testiküler dejenerasyon indeksinin yüksek olması nedeniyle artık reproduktif gerekliliklerini yerine getiremeyeceğine, bu gerekçeyle de çalışmadan ve sürüden çıkarılmasına karar verilmiştir.

3.2. Doz Optimizasyon Bulguları

Oluşturulan doz ve kontrol gruplarının taze sperma verileri Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Nanopartikül doz optimizasyonu çalışma gruplarının ortalama taze sperma verileri (Ort±SH).

Sperma örneği sayısı (n)	Sperma miktarı (ml)	Sperma pH değeri	Sperma yoğunluğu (sp/ml)	Spermanın kitle hareketi skorlaması (0-5)	Spermanın subjektif motilitesi (%)
9	2,73 ± 0,15	6,5 ± 0,06	1,9×10 ⁹ ± 0,3×10 ⁹	4,83 ± 0,17	90,25 ± 0,25

Yapılan nanopartikül doz optimizasyon çalışması sonucunda çözüm sonu TM, PM, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF veya hiperaktivite açısından gruplar arası herhangi bir fark gözlenmemiştir (p>0,05; Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Nanopartikül doz optimizasyon çalışması çözüm sonu muayeneleri veri ortalamaları (Ort±SH).

Parametre	Gruplar					p değeri
	Kontrol	1 µg	5 µg	10 µg	20 µg	
TM (%)	64,66 ± 5,30	73,57 ± 6,42	67,03 ± 14,23	87,70 ± 6,26	87,33 ± 5,52	0,214
PM (%)	4,46 ± 1,98	6,67 ± 1,73	7,03 ± 2,67	10,90 ± 1,83	7,70 ± 0,64	0,270
VCL (µm/s)	39,14 ± 5,19	41,37 ± 4,44	44,77 ± 8,16	61,53 ± 5,27	44,80 ± 1,10	0,089
VSL (µm/s)	15,03 ± 4,42	17,87 ± 2,86	20,00 ± 5,58	24,63 ± 2,28	17,67 ± 0,52	0,450
VAP (µm/s)	23,91 ± 4,88	28,50 ± 3,65	31,43 ± 8,18	45,37 ± 2,87	28,97 ± 0,82	0,076
LIN (%)	36,91 ± 5,58	42,77 ± 2,53	42,53 ± 5,77	39,73 ± 1,16	39,43 ± 0,19	0,799
STR (%)	60,81 ± 5,04	62,23 ± 2,37	62,47 ± 2,28	63,07 ± 6,36	60,83 ± 0,03	0,990
WOB (%)	60,51 ± 4,45	68,63 ± 1,52	67,63 ± 7,18	68,53 ± 4,00	64,80 ± 0,25	0,632
ALH (µm)	3,43 ± 0,15	2,97 ± 0,17	2,73 ± 0,07	3,30 ± 0,23	3,07 ± 0,15	0,079
BCF (Hz)	6,42 ± 0,87	6,27 ± 0,46	6,70 ± 0,40	6,90 ± 0,12	6,47 ± 0,43	0,913
Hiperaktivite (%)	8,98 ± 3,46	8,90 ± 3,46	4,90 ± 2,50	12,40 ± 1,33	8,73 ± 0,73	0,414

p>0,05: Aynı satırdaki gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadığını ifade etmektedir.

Bu doz optimizasyonu çalışması sonucunda, nanopartikül ile spermatozoa seleksiyonu çalışmaları yürüten araştırmacılardan elde edilen bilgiler de göz önünde bulundurularak; işlenecek olan sulandırılmış 1 ml sulandırılmış spermaya 10 µg dozun uygun olduğu, etkilerinin çalışmanın sonraki aşamalarında daha fazla tekrar ile incelenmesi gerektiğine karar verilmiştir.

3.3. Farklı Sıcaklıklarda Nanopürifikasyonda Taze Sperma Muayene Bulguları

Çalışmada kullanılan tüm tekelerin sperma örnekleri toplandıktan sonra yapılan taze sperma muayenesinden elde edilen bulguların ortalamaları Çizelge 3.4'te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Ankara tekelerinden elde edilen sperma örneklerinin taze muayene bulgularının ortalamaları (Ort±SH).

	Sperma örneği sayısı (n)	Elektro ejakülatör voltajı	Sperma miktarı (ml)	Sperma pH değeri	Sperma yoğunluğu (sp/ml)	Spermanın kitle hareketi skorlaması (0-5)	Spermanın subjektif motilitesi (%)
Ortalama	21	4,48 ± 0,13	1,93 ± 0,16	6,79 ± 0,07	1,6×10 ⁹ ± 0,3×10 ⁹	3,81 ± 0,24	81,14 ± 2,62

3.4. Farklı Sıcaklıklarda Nanopürifikasyonda Çözüm-Sonu Muayene Bulguları

3.4.1. Motilite ve Kinetik Parametre Bulguları

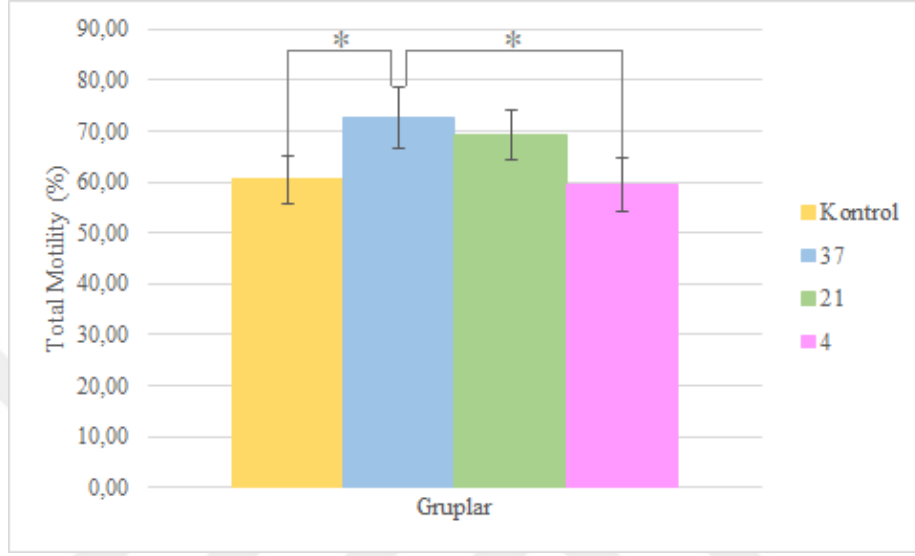
Çözüm sonu total ve progresif motilite bulguları Çizelge 3.5'te sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Ankara tekeleri spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu total ve progresif motilite bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

Parametre	Gruplar				p değeri
	Kontrol (n=21)	37°C (n=21)	21°C (n=21)	4°C (n=21)	
TM (%)	60,48 ± 2,79 ^a	72,75 ± 3,43 ^b	69,13 ± 2,83 ^{ab}	59,57 ± 3,06 ^a	0,005
PM (%)	5,15 ± 1,60 ^a	9,76 ± 1,93 ^b	9,82 ± 1,53 ^b	5,69 ± 1,40 ^a	<0,001

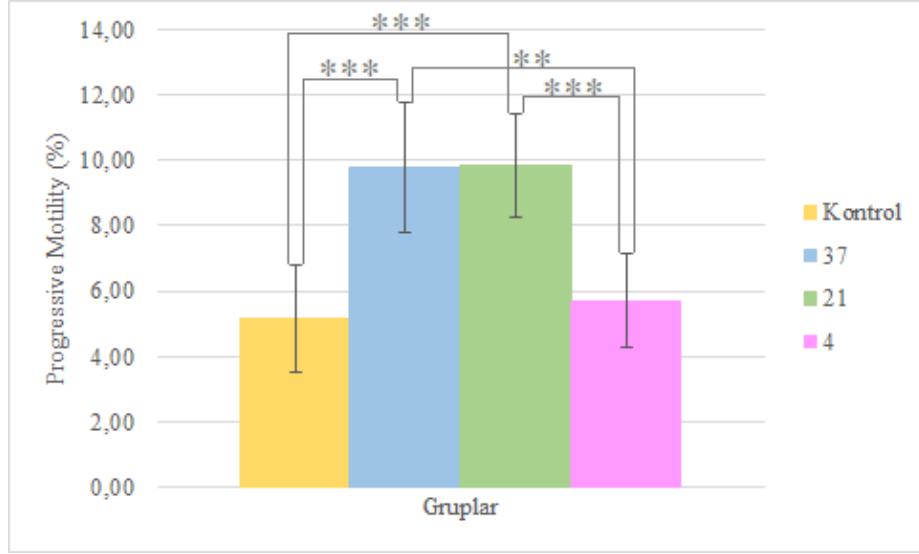
a, b, c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).

Çalışma gruplarında TM açısından gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,005$). Total motilite yüzdesinin 37°C grubunda, kontrol ($p=0,027$) ve 4 °C ($p=0,015$) gruplarına göre ise yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer gruplar arasında TM açısından bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$; Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu total motilite bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).
* $p<0,001$: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

Progresif motilite yüzdesi açısından gruplar arası farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Kontrol grubunun PM verilerinin, 37°C ($p=0,001$) ve 21°C ($p<0,001$) gruplarına göre düşük olduğu görülmüştür. Benzer şekilde 4°C grubunun PM yüzdesi, 37°C ($p=0,002$) ve 21°C ($p=0,001$) gruplarına göre belirgin şekilde düşük bulunmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu progresif motilite bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

p<0,01; *p<0,001: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

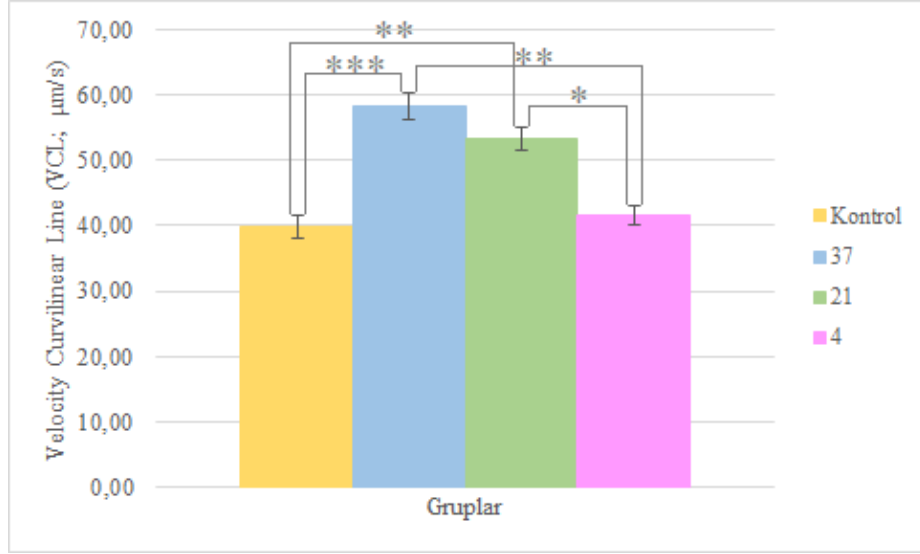
Çözüm sonu hız parametre bulguları Çizelge 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu hız parametre bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

Parametre	Gruplar				p değeri
	Kontrol (n=21)	37°C (n=21)	21°C (n=21)	4°C (n=21)	
VCL (µm/s)	39,80±1,72 ^a	58,31±1,97 ^b	53,19±1,75 ^b	41,61±1,52 ^a	<0,001
VSL (µm/s)	15,84±5,47 ^a	26,90±5,81 ^b	26,17±5,72 ^b	17,15±3,92 ^a	<0,001
VAP (µm/s)	24,97±2,18 ^a	44,05±1,88 ^b	38,05±1,64 ^b	25,72±1,20 ^a	<0,001
LIN (%)	38,08±5,65 ^a	45,42±5,69 ^{ab}	47,61±5,87 ^b	40,09±3,35 ^a	0,003
STR (%)	62,24±2,17 ^{ab}	61,09±1,92 ^a	68,03±1,59 ^b	64,60±1,18 ^{ab}	0,019
WOB (%)	62,10±5,77 ^a	74,92±5,25 ^b	69,00±5,97 ^b	61,24±3,62 ^a	<0,001

a, b, c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).

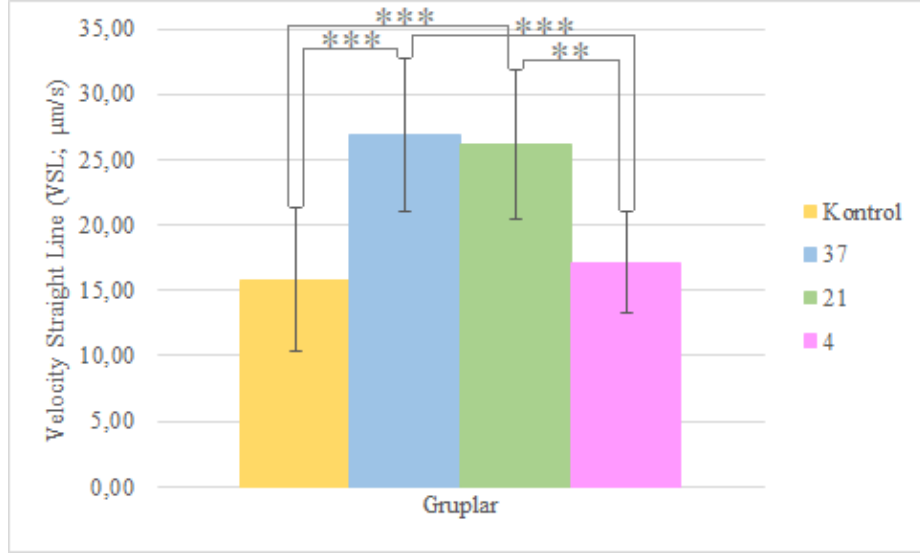
Yapılan istatistiksel incelemelerde VCL açısından gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur (p<0,001). Kontrol grubu VCL verileri, 37°C (p<0,001) ve 21°C (p=0,002) gruplarına göre düşük belirlenmiştir. Kontrol ile 4°C grupları arasında bir farka rastlanmazken (p=0,443); 37°C (p=0,002) ve 20°C (p=0,011) gruplarının VCL sonuçlarının 4°C grubuna göre yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu eğrisel hız bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

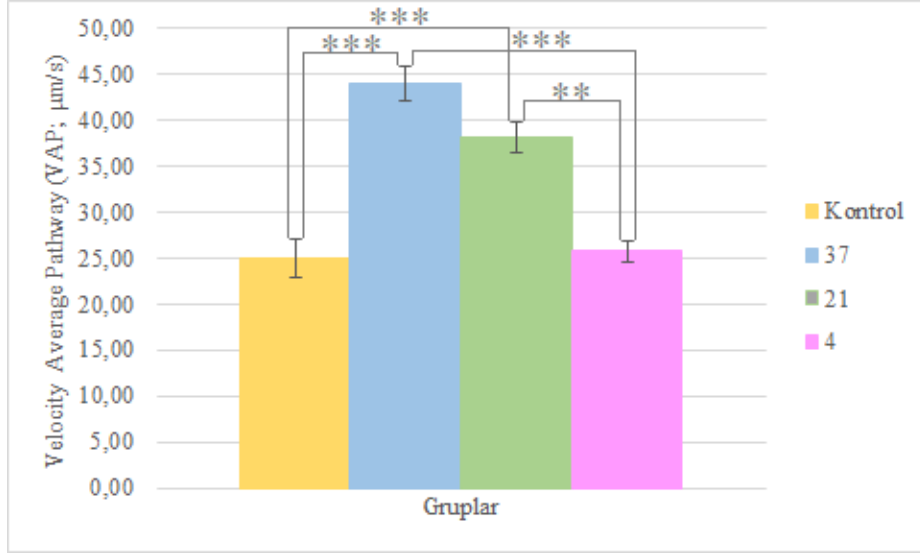
Doğrusal hız açısından gruplar arası farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p<0,001). Kontrol grubunun VSL değerlerinin 37°C ve 21°C gruplarına göre düşük olduğu gözlenmiştir (p<0,001). Kontrol ile 4°C grupları arasında bir farka rastlanmazken (p=0,497); 4°C grubunun VSL değerleri, 37°C (p=0,001) ve 21°C (p=0,003) gruplarından düşük bulunmuştur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu doğrusal hız bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

p<0,01; *p<0,001: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

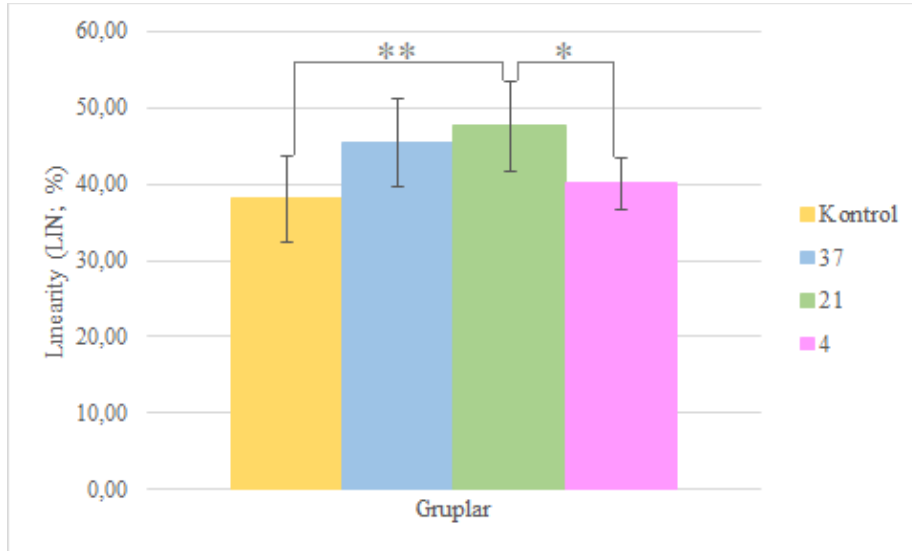
Ortalama yol hızı açısından gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur (p<0,001). Kontrol grubunun VAP değerlerinin, 37°C (p<0,001) ve 21°C (p=0,001) gruplarına göre düşük olduğu belirlenmiştir. Kontrol ile 4°C grupları arasında bir farka rastlanmazken (p=0,529); 4°C grubunun VAP değerlerinin 37°C (p<0,001) ve 21°C (p=0,002) gruplarına kıyasla düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu ortalama yol hızı bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

p<0,01; *p<0,001: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

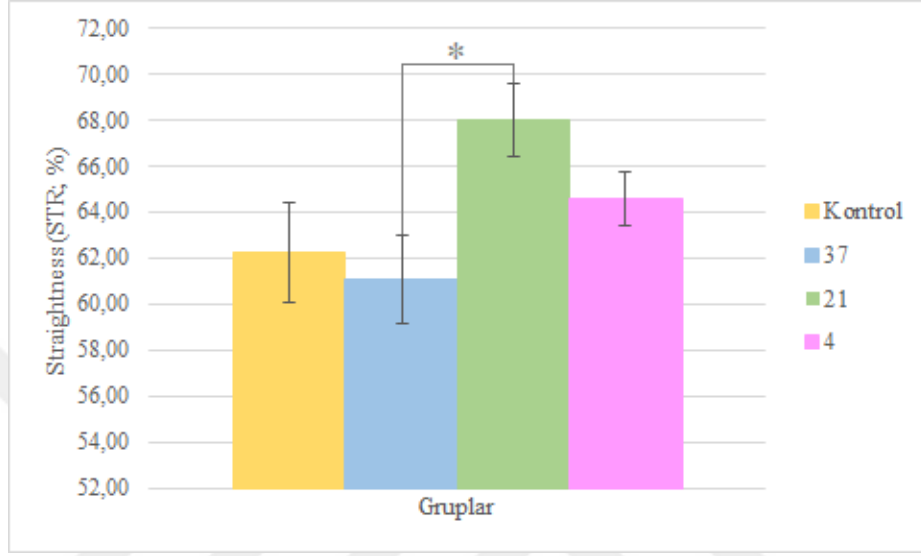
Eğrisel yol doğrusallığı açısından gruplar arası farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir (p=0,003). Kontrol (p=0,006) ve 4°C (p=0,044) gruplarının LIN verileri 21°C grubundan belirgin şekilde düşük bulunmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu eğrisel yol doğrusallığı bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

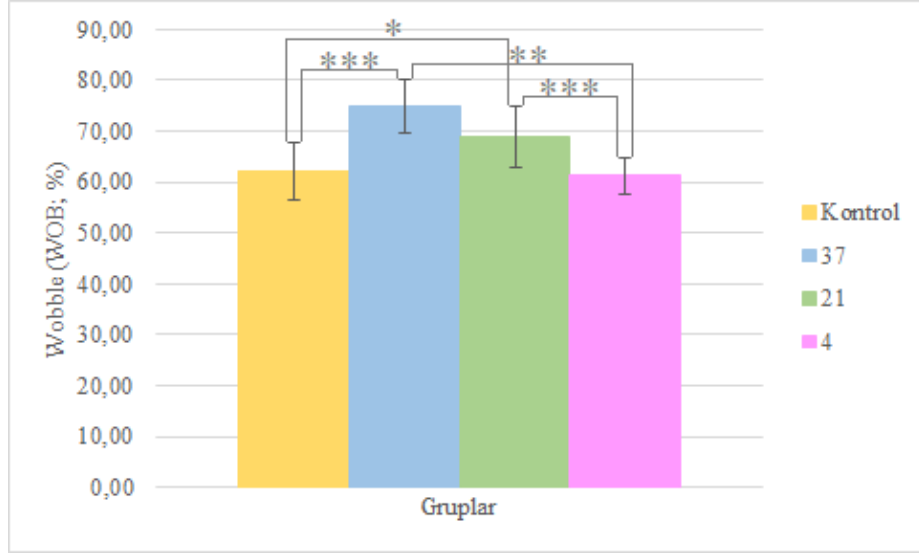
*p<0,05; **p<0,01: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

Ortalama yol doğrusallığı açısından gruplar arası farkın anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p=0,019$). Diğer gruplar arasında anlamlı herhangi bir farklılık oluşmazken ($p>0,05$); 21°C grubunda STR değerlerinin 37°C grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir ($p=0,019$; Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu ortalama yol doğrusallığı bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).
* $p<0,05$: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

Kararsızlık açısından gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Kontrol grubunun WOB değerlerinin, 37°C ($p<0,001$) ve 21°C ($p=0,025$) gruplarına göre düşük olduğu belirlenmiştir. Bahsi geçen diğer hız parametrelerine benzer şekilde, kontrol ile 4°C grupları arasında anlamlı bir farka rastlanmazken ($p=0,984$); 4°C grubunun WOB değerlerinin 37°C ($p<0,001$) ve 21°C ($p=0,009$) gruplarına kıyasla düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu kararsızlık bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

Bilgisayar destekli sperm analizi kapsamında analiz edilen istikrarsızlık parametre bulguları Çizelge 3.7’de sunulmuştur.

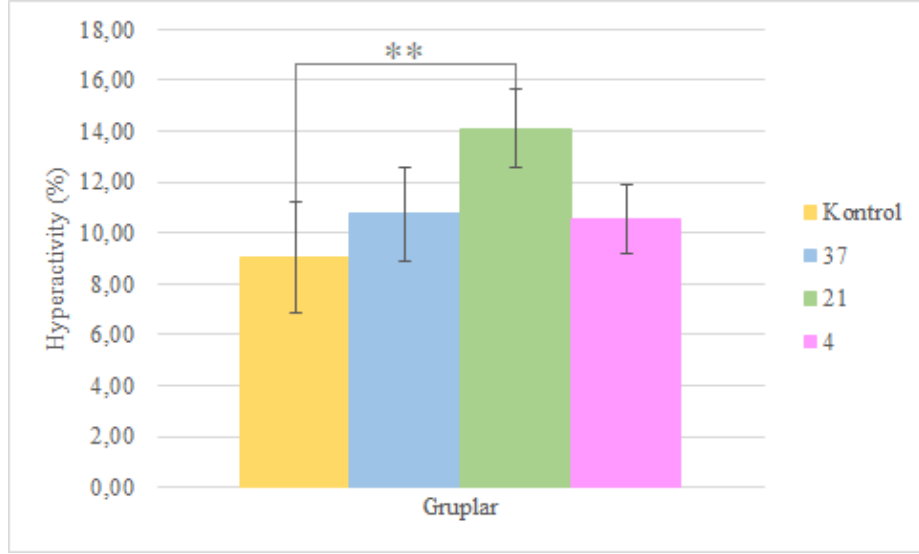
Çizelge 3.7. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu istikrarsızlık parametre bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

Parametre	Gruplar				p değeri
	Kontrol (n=21)	37°C (n=21)	21°C (n=21)	4°C (n=21)	
ALH (µm)	2,81±2,08	2,71±1,96	2,90±1,61	2,81±1,28	0,165
BCF (Hz)	5,95±5,98	6,55±5,28	6,75±5,51	6,50±3,75	0,417
Hiperaktivite (%)	9,05±2,17 ^a	10,74±1,83 ^{ab}	14,10±1,54 ^b	10,53±1,35 ^{ab}	0,007

a, b, c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).

Gruplar arası farkların incelendiği parametreler içerisinde ALH (p=0,165) ve BCF (p=0,417) açısından anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir.

Hiperaktivite açısından gruplar arası farkın anlamlı olduğu tespit edilmiş (p=0,007), bu farklılığın yalnızca 21°C grubunun hiperaktivite sonuçlarının kontrol grubuna göre düşük olmasından kaynaklandığı belirlenmiştir (p=0,004; Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu hiperaktivite bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).
**p<0,01: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

3.4.2. Morfolojik Analiz Bulguları

Floresan boyama ile yapılan morfolojik analiz bulguları Çizelge 3.8'de sunulmuştur.

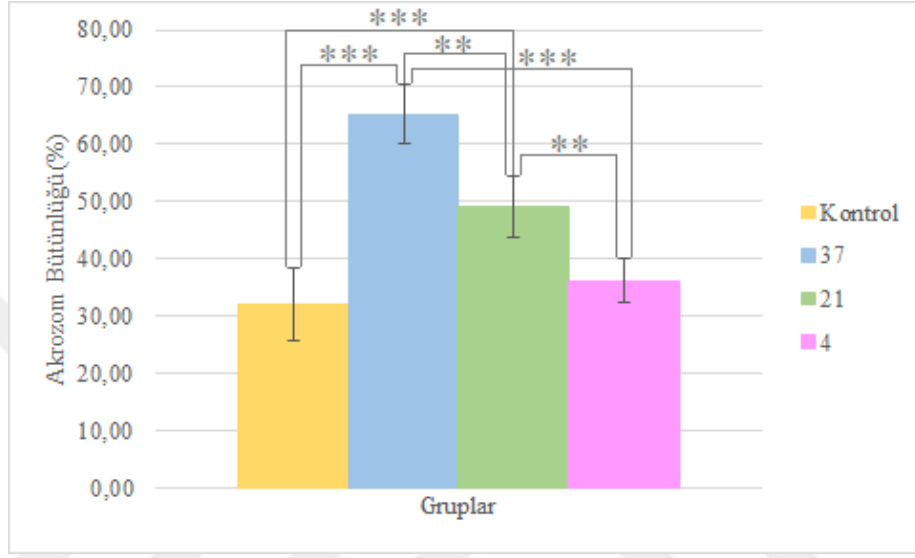
Çizelge 3.8. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu floresan boyama ile yapılan morfolojik analiz bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort±SH).

Parametre	Gruplar				p değeri
	Kontrol (n=21)	37°C (n=21)	21°C (n=21)	4°C (n=21)	
Akrozom bütünlüğü (%)	32,02±6,25 ^a	65,29±5,08 ^c	49,10±5,28 ^b	36,17±3,82 ^a	<0,001
Viabilite (%)	23,07±2,17	27,86±1,64	27,30±1,47	29,55±0,87	0,309
Mitokondriyal aktivasyon (%)	59,78±3,29	60,12±4,79	60,61±5,49	63,56±3,29	0,892

a, b, c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).

Floresan boyama ile yapılan viabilite (p=0,309) ve mitokondriyal aktivasyon oranları (p=0,892) açısından gruplar arası fark belirlenmemiştir. Akrozom bütünlüğü oranı açısından ise gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur (p<0,001). Kontrol grubunun akrozom bütünlüğü oranlarının, 37°C ve 21°C gruplarına göre düşük olduğu

($p < 0,001$) gözlenmiştir. Benzer şekilde 4°C grubunda da 37°C ($p < 0,001$) ve 21°C ($p = 0,002$) gruplarına göre düşük akrozom bütünlüğü oranları tespit edilmiştir. En yüksek akrozom bütünlüğü oranına sahip 37°C grubunun, ikinci en yüksek oranlara sahip olan 21°C grubundan da anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p = 0,002$; Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Ankara tekesi spermasının farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyonu sonrası çözüm sonu akrozom bütünlüğü bulgularının gruplar arası karşılaştırması (Ort \pm SH).

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: Gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

4. TARTIŞMA

Birleştirilmiş androlojik muayene sistematığı erkeklerin damızlık kalitelerinin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Rutin olarak uygulanan yöntem fiziksel ve reproduktif muayeneyi içermekte, daha güncel yaklaşımlar ise ultrasonografik testiküler ve eklenti bezi muayenesi ve CASA spermatolojik analizlerini kapsamaktadır (Daşkın ve ark., 2015). Tez çalışmasında kullanılan tekeler androlojik muayene sistematığında yer alan fiziksel, reproduktif muayenelerin yanı sıra ultrasonografik muayene yöntemi de kullanılarak değerlendirilmiştir. Konu ile ilgili Ankara tekelerinde yapılan bir çalışmada birleştirilmiş androlojik muayene sistematığı incelenmiş, testiküler fonksiyonun yüksek oluşunun dondurulabilirlik oranı ile doğru orantılı olduğu belirtilmiştir (Daşkın ve ark., 2015). Ankara tekelerinin androlojik muayenesini içeren bir diğer çalışmada ise, kullanılan 7 tekedan elde edilen skrotal çevre uzunlukları; en yüksek 28,8 cm, en düşük 17,3 cm ve ortalama 23,6 cm olarak bildirilmiştir (Tekin, 2017). Ancak tez çalışmasına dahil edilen 3 tekenin skrotal çevre uzunlukları (~11,7 cm) bu çalışmada bildirilen sınırların altında kalmıştır. Bunun nedeninin, çalışmaya dahil edilen tekelerden 2'sinin 1-2 yaş aralığında oluşu ve 4-5 yaş aralığında olan tekenin de testiküler dejenerasyon indeksinin 2 olarak belirlenmesi olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışmasında kullanılan tekelerin androlojik muayeneleri kapsamında alınan sperma örneklerinin miktarlarının (~1,8 ml) Ankara tekesi ırkı için bildirilen diğer çalışmalar ile uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir (Tekin, 2017, 1,13 ml; Tırpan, 2012, 1,31 ml). Aynı ırkın sperma pH değerleri 6,5-7 arasında kabul edilmektedir (Tırpan, 2012). Tez çalışmasında elde edilen pH bulguları (~6,7) bu görüşü desteklemektedir. Ankara tekesi spermasının yoğunluğu yapılan çalışmalarda en az 3×10^9 olarak bildirilmektedir. Yaptıkları çalışmalarında Tırpan (2012) bu değeri $3,20 \times 10^9$; Tekin (2017) ise $4,85 \times 10^9$ olarak belirlemiştir. Tez çalışmasında elde edilen yoğunluk değerleri ($\sim 1,8 \times 10^9$ sp/ml) ise bu sayıların altında kalmıştır. Bu durumun, tez çalışmasında androlojik muayene amacıyla elde edilen sperma örneklerinin miktarlarının fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tez çalışmasına dahil

edilen Ankara tekelerinin spermatolojik incelemesinde kitle hareketi açısından başarılı oldukları düşünülmektedir. Androlojik muayene aşamasında ortalama 4 değerinde kitle hareketi elde edilmiş ve bu değer Tekin (2017)'nin çalışmasında belirlediği 3,97 ile benzer belirlenmiştir. Subjektif motilite değerleri açısından bakılacak olursa tez çalışmasına dahil edilen tekelerin taze sperma motilitelerinin (~%75), Ankara tekelerinde yapılan diğer iki çalışmadan düşük ortalamaya sahip olduğu gözlenmektedir (Tekin, 2017, %82,74; Tırpan, 2012, %87,14). Bunun, tez çalışmasında kullanılmak üzere teke seçimi amacıyla androlojik muayenelerin sezon başlangıcında yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tez çalışmasında androlojik muayene sistematigi kullanılarak 3 teke seçilmiştir. Seçilen tekelerin androlojik muayene bulguları bazı parametreler açısından diğer araştırmalarda kullanılan tekelerin verilerinden farklılıklar gösterse de; özellikle pH ve kitle hareketi açısından benzer sonuçlar vermiştir. Ortaya çıkan farklılıkların diğer araştırmalarda kullanılan tekelerin yaşları, sayıları, sperma alma sıklığı ve zamanına bağlı olabileceğinin yanı sıra; bakım-besleme ve çevre koşullarının da etkisiyle oluştuğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, androlojik muayene kapsamında elde edilen sperma örneklerinin sezon dışında alındığı göz önünde bulundurularak tez çalışmasında kullanıma elverişli olduğu belirlenmiştir.

Nanopürifikasyon hakkında daha önce bildirilen çalışmalarda doz optimizasyonu incelenmemiştir. Tez çalışmasının ilk aşamasında gerçekleştirilen doz optimizasyon işlemleri sonucunda elde edilen veriler herhangi bir farklılık oluşturmamıştır. Bu nedenle, tez çalışmasında daha önce yapılmış olan araştırmalar göz önünde bulundurularak doz belirlenmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan 3 tekeden elde edilen sperma örneklerinin ilk muayeneleri sonucunda ortalama değerler; sperma miktarı 1,93 ml, pH değeri 6,79, yoğunluğu $1,6 \times 10^9$ sp/ml, kitle hareketi 3,81, subjektif motilite ise %81,14 olarak belirlenmiştir. Ankara tekelerinde yapılan bir başka çalışmada taze sperma muayene bulguları; miktar 1,31 ml, yoğunluk $3,2 \times 10^9$ sp/ml, ve pH 6,5-7 aralığında olacak şekilde belirlenmiştir (Tırpan, 2012). Bir diğer çalışmada ise; sperma miktarı 1,13 ml,

kitle hareketi 3,97, yoğunluk $4,9 \times 10^9$ sp/ml, subjektif motilite %82,74 olarak belirtilmiştir (Tekin, 2017). Tez çalışmasında elde edilen taze sperma muayene bulgularının, daha önce bildirilen bu iki çalışma ile genel anlamda uyumlu olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, tez çalışması kapsamına dahil edilen spermaların normospermik özellik gösterdiği ve dondurulmaya uygun olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasında sperma örneklerinin motilite, hız ve diğer parametrelerinin analizi için CASA, *Sperm Class Analyzer* (SCA® v.4.2, Barcelona, Spain) kullanılmıştır. Nanopürifikasyon hakkında daha önce bildirilen yayınlarda ise çoğunlukla Hamilton-Thorne olmak üzere, farklı CASA sistemlerine yer verilmiştir. Farklı CASA cihazları arasında sonuçlar değişken olabilmektedir (Hu ve ark., 2013). Hatta, parametre ayarları uyumlu olan aynı CASA sistemleri kullanıldığında bile farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (Ehlers ve ark., 2011). Bu nedenle kullanılan CASA sisteminin standardizasyonu ve kalite kontrolü önem taşımaktadır (Lu ve ark., 2014).

Rutin olarak kullanılan CASA analizleri, spermanın fizyolojik durumuna ilişkin değerli bilgi sağlayan birçok spermatozoa motilite parametresini içerdiği için, subjektif mikroskopik sperma değerlendirmesine göre fertilitenin tahmininde daha doğru sonuç alınmasını sağlama potansiyeline sahiptir (Christensen ve ark., 1999; Farrell ve ark., 1998 ve Kartiravan ve ark., 2011). Farrell ve ark. (1998), taze boğa spermasında CASA ile ölçülen motilite parametrelerinin tümünün, boğa fertilitésinin belirlenmesinde başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir. Ayrıca, yalnızca motil spermatozoanın fertilizasyon yeteneğine sahip olması nedeniyle, spermatozoa motilitesinin sperma kalitesi tayininde en önemli kriterlerden biri olduğu bilinmektedir (İnanç ve ark., 2014).

Barbas ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, tekelerde taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma analiz bulgularını incelemiştir. Çözüm sonu TM bulgularının (%59,32), tez çalışması kontrol (%60,48) ve 4°C grupları (%59,57) ile benzer olduğu; 37°C (%71,75) ve 21°C (%69,13) gruplarından ise düşük olduğu dikkat çekmektedir. Ankara tekeleri üzerinde yapılan bir çalışmada, çözüm sonu TM değerlerinin (%47,89), tez çalışmasında yer alan tüm gruplardan düşük olduğu gözlenmiştir (Tırpan

ve Tekin, 2015). Yine Ankara tekelerinin kullanıldığı bir başka çalışmada çözüm sonu TM bulguları (%60,91), tez çalışması kontrol (%60,48) ve 4°C grupları (%59,57) ile benzer; 37°C (%71,75) ve 21°C (%69,13) gruplarından ise düşük olarak bildirilmiştir (Tekin, 2017). Bu durum, tez çalışması kapsamındaki nanopürifikasyon uygulamasının TM açısından başarılı olduğunu destekler niteliktedir.

Spermatozoa motilitesi, yapısal ve fonksiyonel özelliklerin sonucu olarak ortaya çıkmakta ve erkeklerde fertilité oranının belirlenmesinde en önemli bileşenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Barbas ve ark., 2018; Larsen ve ark., 2000 ve Satake, 2006). Kathiravan ve ark. (2008), boğa spermatozoasının farklı hareket parametrelerini incelemiş ve oosit penetrasyon/fertilizasyon oranı ile progresif motilité arasında pozitif korelasyon belirlemiştir. Farklı CASA parametreleri arasında, fertilizasyon oranına progresif motilitenin %62,6 oranında katkı sağladığı belirtilmiştir (Kathiravan ve ark., 2008 ve Kathiravan ve ark., 2011). Her ne kadar tez çalışmasında teke sperması kullanılmış olsa da, nanopürifikasyon sonrası PM yüzdelerinde artış şekillenmesi, nanopartikül uygulaması ile fertilité başarısının artırılabilmesine işaret etmektedir. Ankara tekeleri üzerinde yapılan bir çalışmada çözüm sonu PM verileri (%17,86), tez çalışmasında yer alan tüm gruplardan (Kontrol, %5,15; 37°C, %9,76; 21°C %9,82; 4°C, %5,69) yüksek belirlenmiştir (Tırpan ve Tekin, 2015). Tez çalışmasında, TM bulgularının 37°C'de (%72,75) nanopartikül ile seleksiyon sonrasında diğer tüm gruplardan (Kontrol, %60,48; 21°C, %69,13; 4°C, %59,57); PM bulgularının ise 37°C (%9,76) ve 21°C (9,82) gruplarında, diğer gruplardan (Kontrol, %5,15; 4°C, %5,69) yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular domuz spermasının PNA/PSA kaplı nanopartiküller (Feugang ve ark., 2015) ve Annexin-V veya PNA/PSA kaplı nanopartiküller (Durfey ve ark., 2018) kullanılarak yapılan iki ayrı nanopürifikasyon çalışması ile benzerlik göstermektedir. İnsan sperması kullanılarak yapılan bir çalışmada, dondurma öncesi ve sonrasında Annexin-V ile kaplı nanopartiküller ile seleksiyon uygulamaları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada dondurma sonrası nanopartikül ile seleksiyonu takiben motilitenin ciddi oranda azaldığı belirlenmiş (nanopürifiye sperma örneği; %2: kontrol grubu; %20); aksine dondurma öncesi nanopürifikasyon uygulaması motilité oranlarında (nanopürifiye sperma örneği; %38,5: kontrol grubu; %20) artışa yol açarak, avantaj sağlamıştır (Said ve ark.,

2005b). İnsan spermasında yapılan bir diğer Annexin-V kaplı nanopartiküller ile seleksiyon çalışmasında, hızlı ve progresif spermatozoa oranı nanopürifiye sperma grubunda (%40,20), kontrol grubuna (%34) göre belirgin şekilde yüksek bulunmuştur (Nadalini ve ark., 2014). Farklı alet ekipmanlar ile domuz ve insan spermasında gerçekleştirilen nanopürifikasyon uygulamaları sonrasında PM yüzdelerinin artışı, tez çalışmasının sonuçları ile uyumlu olmuştur. Bu nedenle nanopartikül ile seleksiyon işleminin, alet ekipman ve türden bağımsız olarak PM yüzdelerini önemli ölçüde artırdığı düşünülmektedir. Total motilite açısından tez çalışmasından farklı sonuçların gözlemlendiği bir araştırmada, insan spermasında dansite gradyanlı santrifügasyon işlemini takiben Annexin-V ile kaplı nanopartiküller ile seleksiyon işlemi yapılmış ve yalnızca dansite gradyanlı santrifügasyon uygulanan örnekler kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca CASA cihazından <math><5\%</math>'lik bir fark dilimi bulunan *Copenhagen Rigshospitalet Image House Sperm Motility Analysis System* (CRISMAS) kullanılmış ve spermatozoa motilitesinin nanopürifikasyon sonrası (%67,0), kontrol grubuna (%79,3) göre azalmasına karşın bu durumun olumsuz bir etki oluşturmadığı belirtilmiştir (Lee ve ark., 2010). İncelenen bu çalışmada elde edilen farklı sonuçların; türler, nanopartikül kaplamasında kullanılan lektinler, nanopürifikasyon protokollerindeki değişiklikler ve analiz aşamasında kullanılan araçların farklı oluşundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Spermatozoon morfolojisi, hücrenin yüzme özellikleri ile bağlantılı olabilmektedir (Yaniz ve ark., 2018). Bu açıdan, Kaskar ve ark. (1994), farklı morfolojik özelliklere sahip (kötü, iyi ve normal) insan spermatozoasında VCL ve VSL değerleri arasında belirgin fark bildirmiş; Parinaud ve ark. (1996) da motilite parametreleri ile belirli anormallikler arasında korelasyon olduğunu açıklamıştır. Bazı risk faktörlerinin spermatozoon hareket karakteristiklerinde belirgin değişikliklere yol açabildiği ve bunların da anormal spermatozoon kalitesindeki erken değişiklikler olabileceği belirtilmektedir (Lu ve ark., 2014). Günümüzde önem taşıyan bir yardımcı üreme tekniği olarak kabul gören IVF'in başarısının tahmin edilebilmesi için kullanılacak parametreler arasında VAP'ın da yer aldığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Li ve ark., 2003; Liu ve ark., 1991 ve Lu ve ark., 2014). Domuzlarda yapılan bir çalışmanın sonucunda, ejakülasyondan hemen sonraki analizlerde elde

edilen VAP değerlerinin 24 saat sonraki değerler ile korelasyon halinde olması nedeniyle; ejakülasyondan 24 saat sonra tohumlama yapıldığı durumda, VAP değerinin kullanılan spermanın kalitesinin doğru bir belirteci olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Holt ve ark., 1997). Tez çalışmasında nanopürifikasyon uygulanan sperma örneklerinden elde edilen VCL, VSL ve VAP değerlerindeki artış, uygulanan nanopürifikasyon işleminin morfolojik olarak hasarlı spermatozoayı uzaklaştırmada başarılı olduğunu ve nanopürifikasyonun teke spermasının kalitesinin artırılmasında kullanıma uygun bir yöntem olduğunu düşündürmektedir.

Tekelerde taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma analiz bulgularının incelendiği bir çalışmada; ortalama VCL değerleri (95,34 $\mu\text{m/s}$), tez çalışmasındaki tüm gruplardan (Kontrol, 39,80 $\mu\text{m/s}$; 37°C, 58,31 $\mu\text{m/s}$; 21°C, 53,19 $\mu\text{m/s}$; 4°C, 41,61 $\mu\text{m/s}$) yüksek; ortalama VSL değerleri (35,05 $\mu\text{m/s}$), tez çalışmasındaki bazı gruplardan (Kontrol, 15,84 $\mu\text{m/s}$; 4°C, 17,15 $\mu\text{m/s}$) yüksek, bazı gruplara (37°C, 26,90 $\mu\text{m/s}$; 21°C, 26,17 $\mu\text{m/s}$) daha yakın; ortalama VAP değerleri ise (66,58 $\mu\text{m/s}$), tez çalışmasındaki tüm gruplardan (Kontrol, 24,97 $\mu\text{m/s}$; 37°C, 44,05 $\mu\text{m/s}$; 21°C, 38,05 $\mu\text{m/s}$; 4°C, 25,72 $\mu\text{m/s}$) yüksek olarak bildirilmiştir (Barbas ve ark., 2018). Ankara tekelerinin sperması kullanılan bir çalışmada çözüm sonu VCL (91,97 $\mu\text{m/s}$), VSL (54,04 $\mu\text{m/s}$) ve VAP (68,66 $\mu\text{m/s}$) değerleri, tez çalışmasındaki tüm gruplardan yüksek bildirilmiştir (Tırpan ve Tekin, 2015). Yine Ankara tekesi kullanılan bir başka çalışmada da, çözüm sonu VCL (112,64 $\mu\text{m/s}$), VSL (58,73 $\mu\text{m/s}$) ve VAP (88,05 $\mu\text{m/s}$) değerleri, tez çalışmasındaki tüm gruplardan yüksek belirlenmiştir (Tekin, 2017). Oluşan bu farklılığın, Barbas ve ark (2018)'in Portekiz Serrana ırkı kullanmış olması veya tekelerin reproduktif verimlerinin farklı oluşundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, Ankara tekeleri kullanılarak yapılan 2 çalışmada da sperma örneklerinin toplanması amacıyla suni vajen yöntemi kullanılırken, tez çalışmasında sperma örneklerinin elektro ejakülatör ile elde edilmesi nedeniyle sperma kalite farkının oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında VCL, VSL ve VAP açısından 37°C (VCL, 58,31 $\mu\text{m/s}$; VSL, 26,90 $\mu\text{m/s}$; VAP, 44,05 $\mu\text{m/s}$) ve 21°C grupları (VCL, 53,19 $\mu\text{m/s}$; VSL, 26,17 $\mu\text{m/s}$; VAP, 38,05 $\mu\text{m/s}$), kontrol (VCL, 39,80 $\mu\text{m/s}$; VSL, 15,84 $\mu\text{m/s}$; VAP, 24,97 $\mu\text{m/s}$) ve 4°C gruplarından (VCL, 41,61 $\mu\text{m/s}$; VSL, 17,15 $\mu\text{m/s}$; VAP, 25,72 $\mu\text{m/s}$) belirgin şekilde yüksek sonuçlar vermiştir.

Son yıllarda domuz spermasının Annexin-V veya PNA/PSA kaplı nanopartiküller ile seleksiyonunu içeren bir çalışmada, VCL, VSL ve VAP değerlerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa yol açmadığı; ancak yine de yüksek olduğu belirtilmiştir (Durfey ve ark., 2018). Domuz sperması ile yapılan bir diğer çalışmada, PNA/PSA kaplı nanopartiküller ile nanopürifikasyon işleminin VCL ve VAP değerlerini etkilemediği; ancak bu durumun bir olumsuzluk yaratmadığı bildirilmiştir (Feugang ve ark., 2015). Aynı çalışmada progresifliği etkileyen parametrelerden VSL'nin nanopürifiye sperma örneklerinde (41,5 $\mu\text{m/s}$), kontrol grubundan (34 $\mu\text{m/s}$) yüksek olduğu bulunmuştur.

İnsan spermasına Annexin-V kaplı nanopartiküller ile seleksiyon uygulanan bir çalışmada, dansite gradyanlı santrifügasyon ile birlikte nanopürifikasyon işlemi uygulanan sperma örneklerinin (49,3 $\mu\text{m/s}$) yalnızca dansite gradyanlı santrifügasyon uygulanan sperma örnekleri (50,1 $\mu\text{m/s}$) ile benzer VAP değerleri verdiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2010). Gerçekleştirdiğimiz çalışmaya göre yukarıdaki araştırmalarda bildirilen farklı sonuçların; tür, nanopartikül kaplamasında kullanılan lektinler ve analiz aşamasında kullanılan alet ekipmanın farklı oluşundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında elde edilen bulgular, nanopürifikasyon işleminin teke spermasında VSL ve VAP değerlerinin artışı açısından avantaj sağladığını düşündürmektedir.

Spermatozoa fonksiyonelliği ve fertilité potansiyelinin diğer parametrelerin yanı sıra LIN'e bağımlı olduğu belirtilmektedir (Barbas ve ark., 2018). Daha fertil ejakülatlardaki spermatozoanın daha lineer gidiş-izini takip ettiği ve bunun sonucunda LIN ve VSL değerlerinin arttığı kabul edilmektedir (Holt ve ark., 1997). Tez çalışmasında nanopürifikasyon protokolü sonrasında LIN değerinde artış sağlanabilmesinin, nanopürifikasyon işlemi sonrasında elde edilen sperma örneğinin fertilizasyon yeteneğindeki artışa işaret ettiği düşünülmektedir. Sigara içen ve ağır metallerle maruz kalan bir grup hastanın spermaları CASA ile analiz edildiğinde; ortalama VCL'nin yanı sıra STR değerlerinin de sigara içmeyenlere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Mukhopadhyay ve ark., 2010). Bu gözlemin, bazı risk faktörlerinin spermatozoa hareket karakteristiklerinde belirgin değişikliklere yol açtığı

ve bunların da anormal spermatozoa kalitesindeki erken değişiklikleri gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Lu ve ark., 2014). Ankara tekelerinden suni vajen yöntemi ile alınan sperma örneklerinin çözüm sonu LIN ve STR yüzdeleri (LIN, %58,93; STR, %78,73) tez çalışmasındaki tüm gruplardan (LIN-Kontrol, %30,08; LIN-37°C, %45,42; LIN-21°C, %47,61; LIN-4°C, %40,09; STR-Kontrol, %62,24; STR-37°C, %61,09; STR-21°C, %68,03; STR-4°C, %64,60) yüksek belirlenmiştir (Tırpan ve Tekin, 2015). Aynı çalışmada belirlenen çözüm sonu WOB yüzdelerinin (%74,83), tez çalışması 37°C (%74,92) ve 21°C (%69,00) grupları ile benzer olduğu; kontrol (%62,10) ve 4°C (%61,24) gruplarından ise yüksek olduğu gözlenmiştir (Tırpan ve Tekin, 2015). Yine Ankara tekelerinin spermasının suni vajen yöntemi ile alındığı bir diğer çalışmada, çözüm sonu LIN yüzdesinin (%51,97), tez çalışmasındaki tüm gruplardan yüksek; STR yüzdesinin (%66,08) tez çalışmasındaki 21°C ve 4°C gruplarına benzer, kontrol ve 37°C gruplarından yüksek; WOB değerlerinin (%77,84), tez çalışması 37°C grubuna benzer, diğer gruplardan ise yüksek olduğu dikkat çekmektedir (Tekin, 2017). Bir başka çalışmada, tekelerde taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma analiz bulguları incelenmiştir (Barbas ve ark., 2018). Çözüm sonu LIN bulgularının (%38,24), tez çalışması kontrol ve 4°C grupları ile benzer; 37°C ve 21°C gruplarından düşük; STR yüzdelerinin (%52,39), tez çalışmasındaki tüm gruplardan düşük; WOB bulgularının (%70,01), tez çalışması kontrol ve 4°C gruplarından yüksek olduğu; 37°C ve 21°C gruplarına ise benzer olduğu gözlenmiştir. Tez çalışmasında LIN açısından 21°C grubu (%47,61), kontrol (%38,08) ve 4°C grubuna (%40,09) göre belirgin şekilde yüksek sonuçlar vermiş; 37°C grubu (%45,42) ise hiçbir grup ile anlamlı farklılık oluşturmamıştır. Bu durum, tez çalışması kapsamındaki 37°C ve 21°C’de nanopürifikasyon uygulamalarının LIN açısından başarılı olduğunu destekler niteliktedir. Tez çalışması ile aynı tür ve ırkın kullanıldığı iki çalışmada (Tırpan ve Tekin, 2015 ve Tekin, 2017) belirtilen sonuçların tez çalışmasından farklı olmasının nedeninin sperma alma aşamasında kullanılan yöntemin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tez çalışmasında belirlenen STR yüzdelerinin Barbas ve ark. (2018) tarafından bildirilen değerlerden yüksek olmasının, kullanılan nanopartikül seleksiyon yönteminin spermanın çözüm sonu kalitesini artırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tez çalışmasında, STR açısından kontrol grubu ile diğer gruplar arasında belirgin bir farklılık

şekillenmemiştir. Tekin (2017)'nin STR sonuçlarının 21°C grubu ile benzer oluşunun nanopartikül uygulamasının başarısına işaret ettiği; Tırpan ve Tekin (2015)'in STR sonuçlarının farklı oluşunun sperma alma yöntemi nedeniyle oluşan kalite farkından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tez çalışmasında WOB açısından 37°C ve 21°C grupları, kontrol ve 4°C gruplarından belirgin şekilde yüksek sonuçlar vermiştir. Tez çalışması kapsamındaki nanopürifikasyon uygulamasının WOB açısından diğer yayınlar ile uyumlu sonuçlar vermesi, bu işlemin başarılı olduğunu destekler niteliktedir. Geçmişte WOB değeri “kürvilinear progresiflik oranı” olarak tanımlanmış (Mortimer, 1997); ancak sperma kalitesindeki etkinliği açısından detaylı olarak incelenmemiştir. Nanopürifikasyon işleminin araştırıldığı çalışmalarda WOB değeri araştırılmamış olup; tez çalışmasında elde edilen bulgular, teke spermasında WOB değerinin sperma kalitesini belirlemede etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Durfey ve ark. (2018), nanopürifiye sperma örneklerinde %29,8 olarak belirlenen LIN değerlerinin kontrol grubunda %27,3 olduğunu; Feugang ve ark. (2015) LIN değerlerinin nanopürifiye sperma örneklerinde %38, kontrol grubunda ise %31 olduğunu bildirmiştir. Progresifliği etkileyen parametreler içerisinde yer alan STR'nin nanopürifikasyon uygulandığında (Durfey ve ark., 2018; %60,4; Feugang ve ark., 2015; %73) kontrol grubuna (Durfey ve ark., 2018; %27,3; Feugang ve ark., 2015; %64) göre yükseldiği bildirilmiştir. Tez çalışmasında STR yüzdesi açısından 21°C grubu (%68,03), 37°C grubundan (%61,09) üstün bulunmuş; kontrol (%62,24) ve 4°C grupları (%64,60) ise diğer gruplar ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. İnsan sperması ve Annexin-V ile kaplı nanopartiküller kullanılarak yapılan bir çalışma sonucunda Lee ve ark. (2010), dansite gradyanlı santrifügasyon sonrası nanopürifiye edilmiş sperma örneklerinin STR yüzdesinin (%59,8) yalnızca dansite gradyanlı santrifügasyon uygulanan kontrol grubu (%62,3) ile benzer sonuçlar verdiğini belirtmiştir. Bu çalışmalar standart 37°C nanopürifikasyon protokolü çerçevesinde gerçekleştirilmiş olup; çalışmaların sonuçları, tez çalışmasında 37°C grubunun verileri ile istatistiksel anlamda örtüşmemektedir. Ancak, 21°C grubundan elde edilen sonuçlar bildirilen istatistiksel LIN artışı ile uyumlu olmaktadır. Bu bulgular, teke spermasında 21°C'de gerçekleştirilen nanopürifikasyon işleminin LIN değerini artırarak avantaj sağladığını düşündürmektedir. Tez çalışmasında 37°C ile

kontrol grupları arasında bir fark belirlenmemiş; ancak 21°C grubundan elde edilen STR yüzdesi 37°C grubundan daha yüksek olmuştur. Bu durumda, progresiflik açısından daha başarılı sonuç alınması için nanopürifikasyon işleminin 21°C sıcaklıkta uygulanmasının bir alternatif oluşturabileceği düşünülmektedir.

Portekiz Serrana ırkı tekelerde taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma analiz bulgularının incelendiği bir çalışmada; ortalama ALH (8,61 μm) ve BCF değerleri (9,39 Hz), tez çalışmasındaki tüm gruplardan (Kontrol, ALH 2,81 μm : BCF 5,95 Hz; 37°C, ALH 2,71 μm : BCF 6,55 Hz; 21°C, ALH 2,90 μm : BCF 6,75 Hz; 4°C, ALH 2,81 μm : BCF 6,50 Hz) yüksek olarak bildirilmiştir (Barbas ve ark., 2018). Ankara tekesi sperması kullanılan bir çalışmada da belirlenen çözüm sonu ALH (5,14 μm) ve BCF değerlerinin (7,52 Hz), tez çalışmasının tüm gruplarından yüksek olduğu gözlenmiştir (Tekin, 2017). Günümüze kadar yapılan spermatolojik parametrelerin incelendiği birçok çalışmada ALH değerinin artışının hiperaktivasyonun belirteci olduğundan bahsedilmiştir (Barbas ve ark., 2018; Garcíá Herreros ve ark., 2005; Henning ve ark., 2013; Kathiravan ve ark., 2011 ve Verstegen ve ark., 2002). Tez çalışmasında elde edilen ALH değerlerinin bu çalışmalardan düşük olması, nanopürifikasyon sayesinde spermatozoanın çözüm sonu hiperaktif halde bulunmasının önüne geçilebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, tez çalışmasında kullanılan Ankara tekelerinin spermatozoasının elektro ejakülatörden olumsuz etkilendiğini veya bireysel çeşitli risk faktörlerine maruz kaldığını gösterdiği düşünülmektedir. Tez çalışmasında istikrarsızlık parametre bulguları içerisinde değerlendirilen ALH (Kontrol; 2,81 μm : 37°C; 2,71 μm : 21°C; 2,90 μm : 4°C; 2,81 μm) ve BCF (Kontrol; 5,95 Hz: 37°C; 6,55 Hz: 21°C; 6,75 Hz: 4°C; 6,50 Hz) açısından gruplar arası herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Benzer şekilde nanopürifikasyon etkilerinin domuz spermasında incelendiği bir çalışma, tez çalışmasının sonuçlarını destekler niteliktedir (Feugang ve ark., 2015). Yine tez çalışması bulgularına benzer şekilde, insan spermasında nanopürifikasyon uygulanan bir çalışmada ALH değeri incelenmiş ve nanopürifiye edilen sperma örneği (3,2 μm) ile kontrol grubu (3,1 μm) arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Lee ve ark., 2010). Domuz spermasının nanopürifikasyonunu içeren bir çalışmada ALH değerinin nanopürifiye sperma grubunda (7,5 Hz), kontrol grubuna (7,9 Hz) göre düşük; BCF değerinin ise

nanopürifiye sperma grubunda, kontrol grubundan yüksek olduğu bildirilmiştir (Durfey ve ark., 2018). Tez çalışmasında elde edilen bu değerlerin diğer çalışmalara göre düşük seviyelerde olması, nanopürifikasyon işleminin spermatozoanın baş salınım ve kuyruk frekansı ile ilgili bu özelliklerini koruduğuna ve spermanın kaliteli bir şekilde dondurulabildiğine işaret etmektedir.

Hiperaktivasyon, tekelerde fertilizasyon ve canlı doğum oranlarının belirteci olarak kabul edilmektedir (Van der Horst, 2018). Ankara tekesi spermasının kullanıldığı bir çalışmada çözüm sonu hiperaktivite yüzdesi (%10,75), tez çalışması 21°C grubundan (%14,10) düşük, 37°C (%10,74) ve 4°C grupları (%10,53) ile benzer, kontrol grubundan (%9,05) ise yüksek olarak belirlenmiştir (Tekin, 2017). Daha önce yapılan çalışmalar içerisinde nanopürifikasyon prosedürü sonrasında hiperaktivitenin değerlendirildiği bir çalışma ile karşılaşılmamıştır. Hiperaktive motilitenin fizyolojik görevi tanımlanmamış olsa da, ovidukt içerisinde spermatozoanın hareket şekli olduğu veya spermatozoanın depolandığı rezervuar bölgesinden ayrılarak yoluna devam etmesi için gerekli olduğu görüşleri öne sürülmektedir (Pacey ve ark., 1997; Suarez ve ark., 1991; Suarez ve ark., 1992 ve Verstegen ve ark., 2002).

Sperma sulandırıcısına çeşitli maddeler eklenerek akrozom bütünlüğü korunabilmekte; bu durum da prematüre akrozom reaksiyonunun engellenebildiği görüşünü desteklemektedir (İnanç, 2016). Tez çalışmasında, nanopürifikasyon işlemi uygulandığında ortamda bulunan kalitesiz spermatozoanın uzaklaştırılması sayesinde prematüre akrozom reaksiyonunun önüne geçilebilme durumu incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan incelemelerde en yüksek akrozom bütünlüğü oranı 37°C grubunda (%65,29), en düşük akrozom bütünlüğü oranı ise kontrol (%32,02) ve 4°C (%36,17) gruplarında belirlenmiştir. Bunun sonucunda, nanopürifikasyon işleminin prematüre akrozom reaksiyonu görülmesini engellediği düşünülmektedir. Tekelerde taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma analiz bulgularının incelendiği bir çalışmada; akrozom bütünlüğü oranı (%76,10), tez çalışmasındaki kontrol (%32,02), 21°C (%49,10) ve 4°C (%36,17) gruplarından yüksek; 37°C grubuna (%65,29) ise benzer olarak bildirilmiştir (Barbas ve ark., 2018). Bu durum, 37°C'de nanopürifikasyon işleminin akrozom bütünlüğü açısından avantaj sağladığına işaret

etmektedir. Ankara tekelerinden elde edilen sperma örneklerinin incelendiği bir çalışmada çözüm sonu akrozom bütünlüğü oranının (%15,14), tez çalışmasında yer alan tüm gruplardan düşük olduğu dikkat çekmektedir (Tırpan ve Tekin, 2015). Çalışmamızda akrozom bütünlüğü açısından yalnızca kontrol (%32,02) ve 4°C grupları (%36,17) arasında bir farklılık belirlenememiş; en yüksek oranlar 37°C grubundan (%65,29) elde edilmiş, 21°C grubu (%49,10) ise diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Bu durumun, nanopartiküllerin hasarlı spermatozoayı uzaklaştırması sayesinde elde edilen daha kaliteli sperma örneklerinin dondurulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnsan spermasında nanopürifikasyon sonrasında indüklenmiş akrozom reaksiyonu ve DNA fragmentasyonu testleri yapılan bir çalışmada, araştırmacılar DNA bütünlüğünün akrozom reaksiyonu geçiren spermatozoa oranı ile doğru orantılı bir ilişki içerisinde olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada, indüklenmiş akrozom reaksiyonu geçiren spermatozoa sayısının nanopürifikasyon prosedürü sonrası (%33,5) kontrol grubundan (%24,7) yüksek olduğu belirlenmiştir (Lee ve ark., 2010). Ancak, bu durum DNA bütünlüğü açısından daha yüksek kalitede spermatozoa elde edilmesi anlamına geldiği için sperma kalitesini olumlu yönde etkilediği düşünülebilir. Akrozom reaksiyonu görülen spermatozoa ile etkileşime giren PNA ile kaplanmış nanopartiküllerin domuz spermasında kullanıldığı bir çalışmada, defektli spermatozoanın uzaklaştırılmasının motilite ve progresifliğin yanı sıra akrozomu bütün ve canlı spermatozoa oranında artışa yol açtığı sonucuna ulaşılmıştır. Tohumlama başarısı ve damızlık performansının öngörülmesinde kullanılan bu parametrelerde artış sağlanması sonucunda araştırmacılar, nanopartikül kullanımının tohumlama başarısını ciddi ölçüde artıracığı yönünde görüş bildirmiştir (Feugang ve ark., 2015). Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre 37°C’de nanopürifikasyon işleminin diğer türlerde bildirilen çalışmalarla uyumlu olduğu; bunun yanı sıra 21°C’de nanopürifikasyon işleminin de işlem görmemiş spermadan daha kaliteli sonuçlar verdiği gözlenmektedir. Domuzlarda VSL, LIN ve akrozom bütünlüğü parametrelerinin tohumlama başarısı ve damızlık performansının tahmininde en etkili parametreler olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark., 2014). Feugang ve ark. (2015) bu görüş ve kendi bulgularından yola çıkarak, domuz spermasında nanopürifikasyon işleminin

başarı potansiyeli bulunduğu sonucuna ulaşmıştır. Her ne kadar tez çalışmasında teke sperması değerlendirilmiş olsa da, bahsi geçen parametreler açısından elde edilen sonuçlar bu görüşü destekler niteliktedir.

Boğa spermasında farklı hareket parametrelerinin oosit penetrasyon/fertilizasyon oranı ile korelasyonunun incelendiği bir çalışmada, progresif motilite ve viabilite yüzdelerinin fertilizasyon oranına %64,1 oranında katkı sağladığı bildirilmiştir (Kathiravan ve ark., 2008). Türler arası hücre membranı fosfolipit-kolesterol içeriğindeki değişkenlikler nedeniyle viabilite açısından yapılan analiz sonuçlarının farklılık gösterebileceği belirtilmektedir (İnanç, 2016). Üç Akkaraman koçundan suni vajen yöntemi ile sperma toplanıp karıştırılarak yapılan çözüm sonu viabilite analizlerinde kontrol grubundan elde edilen viabilite oranının %68,23 olduğu bildirilmiştir (İnanç, 2016). Tez çalışmasında tüm gruplarda elde edilen viabilite oranlarının (Kontrol, %23,07; 37°C, %27,86; 21°C, %27,30; 4°C, %29,55) Akkaraman koç sperması üzerinde yapılan bu çalışmadan düşük olmasının nedeninin hem elektro ejakülatör kullanımı hem de farklı türlerde hücre membranında değişik oranlarda fosfolipid-kolesterol oranlarının bulunması ve bu oranların çözüm sonu parametreler üzerinde oluşturduğu doğrudan etki olduğu düşünülmektedir (İnanç, 2016). Tez çalışmasında nanopürifikasyon sonrasında hareket parametrelerinin birçoğunda artış şekillenirken viabilite açısından bir farklılık oluşmamıştır. Tekelerde taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş sperma analiz bulgularının incelendiği bir çalışmada; viabilite oranları (%62,16), tez çalışmasındaki tüm gruplardan (Kontrol, %23,07; 37°C, %27,86; 21°C, 27,30; 4°C, %29,55) yüksek olarak bildirilmiştir (Barbas ve ark., 2018). Ankara tekesi sperması kullanılarak yapılan bir araştırmada çözüm sonu viabilite yüzdesi (%49,23), tez çalışmasındaki tüm gruplardan yüksek olarak bildirilmiştir (Tırpan ve Tekin, 2015). Yapılan bir çalışmada, hem SYBR-14 hem de PI boyalarının nükleik asit affinitesi bulunmasının, membranda hasar oluşumunu takiben PI boyasının SYBR-14 boyasını baskılayarak kırmızı floresan oluşturmaya yol açabileceğinden bahsedilmektedir (Garner ve ark., 1997). Tez çalışması ile bu araştırmaların bulguları arasındaki farkın PI boyasının baskınlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Domuz spermasının nanopartiküller ile seleksiyonunu içeren bir çalışmada, tez çalışmasına benzer şekilde, viabilite oranının kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa yol açmadığı belirlenmiştir (Durfey ve ark., 2018). Domuz sperması kullanılarak yapılan bir başka nanopürifikasyon çalışması sonucunda ise defektli spermatozoanın uzaklaştırılması sonucu elde edilen sperma örneğinin viabilite oranının yüksek olduğu bildirilmiştir (Feugang ve ark., 2015). Boğa spermasında PNA veya anti-ubikuitin ile kaplı nanopartiküllerle seleksiyon yapılan bir çalışmada, nanopürifikasyon protokolü uygulanan tüm örneklerin viabilite oranlarında artış ($p<0,01$) belirlenmiştir (Odhiambo ve ark., 2014). İnsan sperması üzerinde Annexin-V ile kaplı nanopartiküller kullanılarak yapılan birçok çalışmada da, nanopürifikasyonun sperma viabilite oranlarını olumlu etkilediği bildirilmiştir (Nadalini ve ark., 2014; Rawe ve ark., 2010; Said ve ark., 2005b; Said ve ark., 2008 ve Vendrell ve ark., 2014). Sperma dondurma işleminin öncesinde veya sonrasında nanopürifikasyon işlemlerinin başarısının incelendiği bir çalışmada, nanopürifikasyonun dondurma öncesinde yapılmasının daha avantajlı olduğu ve donma hasarına karşı koruma sağladığı sonucuna ulaşılmıştır (Said ve ark., 2005b). Aynı araştırmacılar bir başka çalışmalarında, nanopürifikasyon prosedürünün sperma kalitesini arttırdığı, spermatozoayı donma hasarına karşı koruyabildiği, rutin spermatojik parametreler ve apoptoz biyoişaretçileri açısından yüksek kalitede spermatozoa eldesi sağlayabildiği düşüncesini ortaya atmıştır. Bu yüksek kalitedeki sperma örneğinin oosit penetrasyon potansiyelinin artacağı, dolayısıyla fertilitésinin olumlu etkileneceği belirtilmiştir (Said ve ark., 2008). Tez çalışmasının bulguları viabilite açısından bildirilen çoğu çalışma ile uyumlu sonuç vermemiştir. Nanopürifikasyon prosedürünü takiben viabilite oranlarında belirgin bir artış şekillenmemiş; ancak belirgin bir düşüş de gözlenmemiştir. Bu durumun, analiz aşamasında kullanılan PI boyasının SYBR-14 boyasını baskılayarak ölü spermatozoa sayısını daha fazla göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, SYBR-14 boyasının kısa süre içerisinde floresan özelliğini kaybetmesi ve değerlendirmenin subjektif olarak mikroskopta yapılması nedeniyle sonuçların beklenenden düşük olduğu gözlenmiştir.

Memeli spermatozoasının orta kısmında bulunan mitokondria, flagellar hareket için gerekli enerjiyi sağlamaktadır (Curry ve Watson, 1995 ve Mortimer, 1997). Dolayısıyla, motilitenin artışıyla birlikte hız parametreleri ve mitokondriyal aktivasyonun artacağı düşüncesi kabul görmektedir (Auger ve ark., 1989; İnanç, 2016; Kasai ve ark., 2002; O'Connell ve ark., 2002; Thomas ve ark., 1998 ve Volpe ve ark., 2009). Mitokondriyal fonksiyonun değerlendirilmesi için floresan boyalar kullanıldığında, mitokondriyal fonksiyon ve spermatozoa motilitesi arasında pozitif korelasyon belirlenmiştir (O'Connell ve ark., 2002; Thomas ve ark., 1998 ve Volpe ve ark., 2009). Kasai ve ark. (2002), insanlarda mitokondriyal membran potansiyeli ile birlikte motilite parametrelerinin (motilite yüzdesi, VAP ve VCL) artış gösterdiğini gözlemiştir. Ancak, Akkaraman koçlarından sperma toplanıp karıştırıldıktan sonra yapılan analizlerde motilite ve mitokondriyal aktivasyon arasında istatistiksel bir korelasyon bulunmamıştır (İnanç, 2016). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, tez çalışmasında motilite parametrelerinin artışıyla birlikte mitokondriyal aktivasyon oranında değişiklik oluşmaması durumu ile benzer olmuştur. Ancak, tez çalışmasında elde edilen TM ve mitokondriyal aktivasyon bulguları grup bazında incelendiğinde, motilite ve mitokondriyal aktivasyonun bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmanın bulguları, spermatozoa fonksiyonelliği ve fertilitate potansiyelinin VAP, LIN ve ALH'nın yanı sıra diğer morfolojik kökenli parametrelere dayandığını göstermektedir (Barbas ve ark., 2018; De Geyter ve ark., 1998; Farrell ve ark., 1998; García-Herreros ve Leal, 2014; Holt ve ark., 1997; Larsen ve ark., 2000 ve Satake, 2006). Tekelerde spermatolojik parametreler ve fertilitate arasında ilişkinin incelendiği bir çalışmada; mitokondriyal aktivite, akrozom ve membran bütünlüğü, ozmotik direnç parametreleri flow sitometri ile; hız ve hareket parametreleri Hamilton-Thorne CASA cihazı ile ve motilite subjektif yöntem ile değerlendirilmiş ve tüm bu parametreleri içeren bir model oluşturulmuştur. Bu çalışmanın sonucunda tohumlama sonrası gebe kalma durumuyla parametre sonuçları karşılaştırılmış ve fertilitenin bu parametreler ile %55'e kadar doğru tahmin edilebildiği belirlenmiştir (Furstoss ve ark., 2010). Tez çalışmasında değerlendirmeye alınan parametrelerin geneline bakıldığında, nanopürifikasyon işleminin sperma örneğinin kalitesini artırabildiği gözlenmekte; ancak mitokondriyal

aktivasyon ile diğere parametreler arasında bir korelasyon dikkat çekmemektedir. Total motilite açısından gruplar arası istatistiksel fark anlamlı bulunmuş; ancak mitokondriyal aktivasyon açısından (Kontrol, %59,78; 37°C, %60,12; 21°C, %60,61; 4°C, %63,56) gruplar arası herhangi bir fark belirlenmemiştir. Domuz spermasının Annexin-V ve PNA/PSA ile kaplı nanopartiküller ile seleksiyonunu içeren bir çalışmada floresan boyama ve flow sitometri kullanılmış ve mitokondriyal aktivasyon değerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa yol açmadığı bildirilmiştir (Durfey ve ark., 2018). İnsan spermasında Annexin-V ile kaplı nanopartiküller ile seleksiyon sonrası mitokondriyal membran potansiyeli ve mitokondriyal bütünlüğün incelendiği tek çalışmada; mitokondriyal bütünlüğü nanopürifikasyon prosedürünün (%45,4) kontrol grubuna (%15,8) göre belirgin şekilde artırdığı bildirilmiştir (Grunewald ve ark., 2006). Tez çalışmasında JC-1 floresan boyası kullanılarak mitokondriyal aktivasyon var/yok şeklinde subjektif olarak değerlendirilmiştir. İnsan sperması kullanılarak yapılan çalışmada (Grunewald ve ark., 2006) da JC-1 etken maddesi kullanılmış, ancak değerlendirme flow sitometri ile yapılmıştır. Tez çalışması ile bu çalışma arasındaki uyumsuzluğun kullanılan analiz yönteminin subjektif değerlendirmeden daha duyarlı olduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, nanopartiküller ile spermatozoa seleksiyonu konusunda günümüze kadar yapılan araştırmalarda, protokolün yalnızca 37°C’de uygulandığı dikkat çekmektedir; farklı sıcaklıklarda araştırıldığına dair literatür bilgisine rastlanmamıştır. Tez çalışmasından elde edilen verilere göre, 1 ml sulandırılmış teke spermasına 10µg dozunda demir oksit nanopartiküllerinin diğere türlerde tanımlanan 37°C’de eklenmesiyle, spermatolojik parametrelerin çoğunda (TM, PM, VCL, VSL, VAP, WOB ve akrozom bütünlüğü) olumlu yönde artış gözlenmiştir. Çalışmamızda 21°C’de nanopartikül uygulamasının, 37°C’de nanopürifikasyon uygulamasının başarılı verilerinin yanı sıra bazı parametreler açısından (LIN ve STR) daha da iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Ancak, 4°C’de yapılan nanopürifikasyon işleminin tez çalışması kapsamındaki hiçbir parametre açısından kontrol grubundan farklı sonuç vermemesi, nanopürifikasyon işleminin bu sıcaklıkta yapılmasının bir anlam ifade etmediğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada 4°C sıcaklıkta termal şok nedeniyle

spermatozoanın viabilitesi etkilenmeksizin motilite parametrelerinde geridönüşümsüz bir azalma şekillendiği bildirilmiştir (Appell ve ark., 1977). Tez çalışmasında, Annexin-V, PSA ve silika manyetit ile kaplı nanopartiküllerinin 4°C sıcaklıkta başarısız olmasının temel nedeninin, bu sıcaklıkta spermatozoanın yalnızca viabilitesini koruyarak motilite özelliklerini kaybetmesi olduğu düşünülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; teke spermasında nanopürifikasyon protokolü için doz optimizasyon çalışması yapılmış ve denenen dozlar (1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg) arasında herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır. Sonuç olarak, tekelerin yanı sıra diğer türlerde de nanopürifikasyon işlemi için doz standardizasyonu konusunda yeterli sayıda detaylı araştırma yapılmamıştır.

Tez çalışması kapsamında incelenen parametreler açısından 37°C ve 21°C’de nanopartikül ile seleksiyona tabi tutulan sperma örneklerinin kontrol grubundan üstün olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla, teke spermasına nanopürifikasyon işleminin uygulanmasının fertilitiyi etkileyen faktörler açısından faydalı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda nanopürifikasyon işlemi için hazırlanan protokol 37°C’de uygulanmıştır. Tez çalışmasında, nanopürifikasyon protokolünün 21°C ve 4°C’de de uygulanabilirliği araştırılmıştır. Kontrol grubu ile 4°C grubu arasında değerlendirmeye alınan hiçbir parametre açısından belirgin bir farklılık şekillenmemiştir. Dolayısıyla, nanopürifikasyon işleminin 4°C sıcaklıkla uygulanması, tekelerde spermatozoa seleksiyonu açısından başarılı sonuç vermemektedir.

Nanopürifikasyon işleminin 37°C ve 21°C’de uygulandığı sperma örneklerinde, çözüm sonu PM, VCL, VSL, VAP, WOB ve akrozom bütünlüğü açısından kontrol ve 4°C grubundan belirgin şekilde yüksek değerler elde edilmiştir. Tez çalışmasında 37°C’de nanopürifikasyon işlemini takiben; TM, PM, VCL, VSL, VAP, WOB ve akrozom bütünlüğü açısından kontrol grubundan daha kaliteli bir sperma örneği elde edilmiştir. Benzer şekilde 21°C’de nanopürifikasyon işlemi; PM, VCL, VSL, LIN, STR, WOB ve akrozom bütünlüğü açısından kontrol grubundan üstün bir sperma örneği elde edilmesini sağlamıştır. Sonuç olarak, günümüze kadar 37°C’de boğa, insan ve domuzlarda uygulanan nanopürifikasyon işleminin tekelerde de başarıyla uygulanabildiği ve protokolün oda sıcaklığında (21±1°C) uygulanmasıyla herhangi bir olumsuz etki oluşmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, nanopürifikasyon işleminin teke

spermasında, sperma kalitesini artırmak amacıyla kullanılabilceği ve prosedürün oda sıcaklığında olumsuz bir etki oluşmadan gerçekleştirilebileceği düşünölmektedir.

Spermatozoa seleksiyonu amacıyla günümüzde tercih edilen yöntemlerin spermatozoada mekanik hasar oluşturduğu yönünde çekinceler bulunmaktadır. Henüz yeni bir yöntem olan nanopürifikasyon işleminin ise spermatozoaya mekanik hasar verecek unsurları barındırmamaktadır. Ayrıca, yalnızca 30 dakika içerisinde kaliteli spermatozoa seleksiyonu elde edilebilmesi sayesinde avantaj sağlamaktadır. Tez çalışması sırasında; teke spermasında nanopürifikasyon işleminin uygulamasının kolay oluşu, kısa süre içerisinde tamamlanması ve oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmesi sayesinde saha koşullarına uygun olabileceği, hatta avantaj sağlayacağı sonucuna ulaşılmıştır. Ülkemizde reproduktif verimin bir problem kaynağı olduğu Ankara keçilerinde, yardımcı üreme tekniklerinin başarısının artırılması için nanopürifikasyon işleminin başarıyla kullanılabilceği düşünölmektedir.

Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, farklı hayvan türlerinde hem doz hem de işlemin uygulandığı koşulların standardizasyonu açısından daha detaylı ve fertilitate sonuçları ile desteklenen nanopürifikasyon çalışmaları planlanmalı ve yürütölmelidir.

ÖZET

Ankara Tekesi Spermasının Nanopürifiye Edilerek Dondurulması

Tez çalışmasının amacı, güncel bir yöntem olan nanopartiküller ile sperm seleksiyonunun Ankara tekesi spermasında uygulanabilirliğinin araştırılmasıdır. Nanopartiküller ile sperm seleksiyonu, ya da diğer adıyla nanopürifikasyon işlemi, günümüze kadar 37°C sıcaklıkta; insan, boğa ve domuz sperması üzerinde denenmiş bir yöntemdir. Tez çalışması kapsamında, nanopürifikasyon yönteminin saha koşullarına adapte edilebilmesi açısından farklı sıcaklıklarda (37°C, 21°C ve 4°C) uygulanmasının sperma kalitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ön çalışma olarak doz optimizasyonu (1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml ve 20µg/ml) yapılmıştır. Doz optimizasyon çalışmasının sonucunda, bilgisayar-destekli sperm analiz (CASA) ekipmanı parametreleri (total motilite-TM, progresif motilite-PM, eğrisel hız-VCL, doğrusal hız-VSL, eğrisel yol doğrusallığı-LIN, ortalama yol doğrusallığı-STR, kararsızlık-WOB, sperm başının sapma mesafesi-ALH, çapraz geçiş frekans ritmi-BCF ve hiperaktivite) açısından herhangi bir farklılık belirlenmemiştir (p>0,05). Bu nedenle, farklı sıcaklıklarda nanopürifikasyon çalışması aşamasında, daha önce nanopürifikasyon hakkında çalışma yapmış olan araştırmacılardan elde edilen bilgiler doğrultusunda 10µg/ml dozunda nanopartikül kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında kullanılan 3 Ankara tekesinden elektro ejakülatör yardımı ile 7'şer tekrar oluşturulacak şekilde sperma örnekleri toplanmış; bu örneklerin her biri taze sperma muayeneleri gerçekleştirildikten ve sulandırıldıktan sonra 4 gruba bölünmüştür. İlk grup kontrol grubu olarak belirlenmiş ve rutin prosedürler ile ekilibrasyon sonrası sıvı azot buharında dondurularak sıvı azot içerisinde saklanmıştır. İkinci gruba 37°C'de, 3. gruba 21°C'de ve 4. gruba 4°C'de nanopürifikasyon işlemi uygulanmış; sonrasında bu gruplar da rutin prosedür doğrultusunda ekilibrasyonu takiben sıvı azot buharında dondurularak sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Sperma örneklerinin çözüm-sonu motilite ve morfolojik parametreleri analiz edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre; 37°C'de nanopürifikasyon işlemi sonrası kontrol grubuna göre TM (37°C, %72,75; Kontrol, %60,48), PM (37°C, %9,76; Kontrol, %5,15), VCL (37°C, 58,31 µm/s; Kontrol, 39,80 µm/s), VSL (37°C, 26,90 µm/s; Kontrol, 15,84 µm/s), LIN (37°C, %45,42; Kontrol, %38,08) ve akrozom bütünlüğü (37°C, %65,29; Kontrol, %32,02) parametreleri yüksek bulunurken (p<0,05); 21°C'de nanopürifiye edilen sperma örneklerinin kontrol grubundan PM (21°C, %9,82; Kontrol, %5,15), VCL (21°C, 53,19 µm/s; Kontrol, 39,80 µm/s), VSL (21°C, 26,17 µm/s; Kontrol, 15,84 µm/s), VAP (21°C, 38,05 µm/s; Kontrol, 24,97 µm/s), LIN (21°C, %47,61; Kontrol, %38,08), STR (21°C, %68,03; Kontrol, %62,24), WOB (21°C, %69,00; Kontrol, %62,10) ve akrozom bütünlüğü (21°C, %49,10; Kontrol, %32,02) parametreleri açısından üstün olduğu belirlenmiştir (p<0,05). Kontrol grubu ile 4°C grubu arasında anlamlı bir farklılık oluşmamıştır (p>0,05). Bu bulgulara göre, teke spermasında nanopürifikasyon işleminin fertilitiyi etkileyen parametreler açısından faydalı olduğu ve nanopürifikasyon işleminin saha koşullarına adapte edilmesi açısından 37°C'nin yanı sıra 21°C sıcaklıkta da uygulanabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Ankara Tekesi, Demir Oksit Nanopartikülleri, Dondurma, Sperm Seleksiyonu.

SUMMARY

Cryopreservation of Nanopurified Angora Buck Semen

The aim of the thesis study was to investigate the applicability of an up-to-date method, sperm selection with nanoparticles, on Angora buck semen. Sperm selection with nanoparticles, alias nanopurification, has been tried on human, bull and boar semen at 37°C until today. Within the scope of the thesis study, determining the effects of application of the nanopurification method on the semen quality at different temperatures (37°C, 21°C and 4°C) was targeted, in order to adapt the method to field conditions. Dose optimization (1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml and 20µg/ml) was performed as a preliminary study. As a result of the dose optimization study; no difference was observed in terms of computer-aided sperm analysis (CASA) equipment parameters (total motility-TM, progressive motility-PM, curvilinear velocity-VCL, straight line velocity-VSL, linearity-LIN, straightness-STR, wobble-WOB, amplitude of lateral head displacement-ALH, beat cross frequency-BCF and hyperactivity). Therefore, in the nanopurification in different temperatures stage of the study; in accordance with the information obtained from researchers who had previously studied nanopurification a nanoparticle dose of 10µg/ml was used. Semen samples were collected from 3 Angora bucks used in the thesis study to form 7 repetitions; each of these samples were divided into 4 groups after fresh semen analyses and dilution were completed. The first group was determined as control group and was preserved in liquid nitrogen after routine procedures of equilibration and freezing in liquid nitrogen vapour. Nanopurification procedure was applied to 2nd group at 37°C, 3rd group at 21°C and 4th group at 4°C; and then these groups were preserved in liquid nitrogen after routine procedures of equilibration and freezing in liquid nitrogen vapour. Post-thaw motility and morphology parameters of the sperm samples were analysed. According to the findings; after nanopurification at 37°C TM (37°C, %72,75; Control, %60,48), PM (37°C, %9,76; Control, %5,15), VCL (37°C, 58,31 µm/s; Control, 39,80 µm/s), VSL (37°C, 26,90 µm/s; Control, 15,84 µm/s), LIN (37°C, %45,42; Control, %38,08) and acrosome integrity (37°C, %65,29; Control, %32,02) parameters were higher than the control group ($p < 0.05$); while the semen samples nanopurified at 21°C were superior than control group in terms of PM (21°C, %9,82; Control, %5,15), VCL (21°C, 53,19 µm/s; Control, 39,80 µm/s), VSL (21°C, 26,17 µm/s; Control, 15,84 µm/s), VAP (21°C, 38,05 µm/s; Control, 24,97 µm/s), LIN (21°C, %47,61; Control, %38,08), STR (21°C, %68,03; Control, %62,24), WOB (21°C, %69,00; Control, %62,10) and acrosome integrity (21°C, %49,10; Control, %32,02) ($p < 0.05$). There was no significant difference between the control group and 4°C group ($p > 0.05$). According to the findings it was concluded that, nanopurification procedure on buck semen was useful in terms of parameters that affect fertility and that nanopurification can be performed at 21°C, as well as 37°C, in order to adapt the procedure to field conditions.

Keywords: Angora Buck, Iron Oxide Nanoparticles, Freezing, Sperm Selection.

KAYNAKLAR

- AHMED Z, ANZAR M, SHAHAB M, AHMAD N, ANDRABI SMH (2003). Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. *Theriogenology* **59**: 1189-202.
- AITKEN RJ, WARNER P, BEST FS, TEMPLETON AA, DJAHANBAKHCH O, MORTIMER D, LEES MM (1983). The predictability of subnormal penetrating capacity of sperm in cases of unexplained infertility. *Int J Androl* **6**: 212-220.
- AINSWORTH C, NIXON B, AITKEN RJ (2005). Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod* **20**: 2261-2270.
- ALAÇAM E, DEVECİ H, DİNÇ DA, GÖKÇEN H, İZGÜR H, KILIÇOĞLU Ç, KÜPLÜLÜ Ş, ŞENÜNVER A, TEKİN N, YURDAYDIN N (1990a). Erkek üreme organlarının muayenesi (Androlojik muayeneler). In: Theriogenoloji. Ed: Alaçam E. Nuroloj Matbaacılık AŞ. 7. Bölüm.
- ALAÇAM E, DEVECİ H, DİNÇ DA, GÖKÇEN H, İZGÜR H, KILIÇOĞLU Ç, KÜPLÜLÜ Ş, ŞENÜNVER A, TEKİN N, YURDAYDIN N (1990b). Spermanın alınması, saklanması ve suni tohumlama. In: Theriogenoloji. Ed: Alaçam E. Nuroloj Matbaacılık AŞ. 9. Bölüm.
- ANZAR M, GRAHAM EF, IQBAL N (1997). Post-thaw plasma membrane integrity of bull spermatozoa separated with a sephadex ion-exchange column. *Theriogenology* **47**: 845-56.
- APPELL RA, EVANS PR, BLANDY JP (1977). The effect of temperature on the motility and viability of sperm. *Br J Urol* **49(7)**: 751-756.
- ARDON F, HELMS D, SAHİN E, BOLLWEIN H, TÖPFER-PETERSEN E, WABERSKİ D (2008). Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. *Reproduction* **135**: 461-470.
- ARI UÇ, DAŞKIN A (2010). Freezing of washed angora goat semen with extenders added bull or ram seminal plasma. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* **16(2)**: 233-237.
- AUGER J, RONOT X, DADOUNE JP (1989). Human sperm mitochondriayl function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J Androl* **10(6)**: 439-448.
- AVA. AUSTRALIAN VETERINARY ASSOCIATION (2008). Collection of semen from animals by electroejaculation. Erişim Adresi: <http://www.ava.com.au/policy/37-collection-semen-animals-electroejaculation-0> Son Erişim Tarihi: 18.06.2018.
- BACCETTI B (2004). Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol* **36**: 333-339.
- BARBAS JP, LEAHY T, HORTA AE, GARCIA-HERREROS M (2018). Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology* **82**: 137-147.
- BARTH AD, BOWMAN PA (1994). The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *Can Vet J* **35(2)**: 93-102.
- BARTOOV B, BERKOVİTZ A, ELTES F, KOGOSOWSKİ A, MENEZO Y, BARAK Y (2002). Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* **23**: 1-8.
- BASKA KM, MANANDHAR G, FENG D, AGCA Y, TENGOWSKİ MW, SUTOVSKY M, Yİ YJ, SUTOVSKY P (2008). Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J Cell Physiol* **215**: 684-696.

- BORLIDO L, AZEVEDO AM, ROQUE ACA, AIRES-BARROS MR (2013). Magnetic separations in biotechnology. *Biotechnology Advances*, **31**: 1374-1385.
- BOUE P, CORTEEL JM (1992). Aptitude of male goat sperm to withstand freezing: combined effects of season and time of sexual rest between two successive semen collections. In: Recent Advances in Goat Productions. Proc. 5th Int. Conf. on Goats, Ed: LOKESHAR RR. New-Delhi Vol. 2 pp. 1042-1045.
- BOYERS SP, DAVIS RO, KATZ DF (1989). Automated semen analysis. *Curr Prob Obstet Gynecol Fertil* **XII**: 167-200.
- BUDWORTH PR, AMMANN RP, HAMERSTEDT RH (1987). A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. *J Dairy Sci* **70**: 1927-1936.
- BURKMAN LJ (1991). Discrimination between non hyperactivated and classical hyperactivity motility patterns in human spermatozoa using computerized image analysis. *Fertil Steril* **55**: 363-371.
- BUSSALLOU E, PINART E, RIVERA MM, ARIAS X, SANCHO S, GARCIA-GIL N, BASSOLS J, PRUNEDA A, YESTE M, CASAS I, RIGAU T, RODRIGUEZ-GIL JE, BONET S (2008). Effects of filtration of semen doses from subfertile boars through neuter Sephadex columns. *Reprod Domest Anim* **43**: 48-52.
- CVMA. CANADIAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (2013). Electroejaculation of ruminants – Position statement. Erişim Adresi: <https://www.canadianveterinarians.net/documents/electroejaculation-of-ruminants> Son Erişim Tarihi: 18.06.2018.
- CAYLI S, JAKAB A, OVARI L, DELPIANO E, CELIK-OZENCI C, SAKKAS D, WARD D, HUSZAR G (2003). Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* **7**: 462-468.
- CHAN PJ, JACOBSON JD, CORSELLI JU, PATTON WC (2006). A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertil Steril* **85**: 481-486.
- CHANG SC, ANDERSON TI, BAHRMAN SE, GRUDEN CL, KHIJNIAK AI, ADRIAENS P (2005). Comparing recovering efficiency of immunomagnetic separation and centrifugation of mycobacterium metalworking fluids. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **32(11-12)**: 629-638.
- CHO BS, SCHUSTER TG, ZHU X, CHANG D, SMITH GD, TAKAYAMA S (2003). Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm. *Anal Chem* **75**: 1671-1675.
- CHRISTENSEN P, BROCKHOFF PB, LEHN-JENSEN H, (1999). The relationship between semen quality and the non-return rate of bulls. *Reprod Domest Anim* **34**: 503-507.
- CLEMENTE ASSOCIATES INCORPORATED (2016). Magnetic nanoparticles: Fertility improvement in subfertile animals and humans. <http://www.clemente-associates.com/fertilityimprovement.html> Son Erişim Tarihi: 10/11/2016.
- CORCHERO JL, VILLAVARDE A (2009). Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, **27(8)**: 468-476.
- CORTEEL JM, BARIL G (1974). Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal: effet du glucose. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* **14(4B)**: 741-745.
- CURRY MR, WATSON PF (1995). Sperm structure and function. In, Gametes-The Spermatozoon. Ed.: Grudzinskas JG, Yovich JL. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 45-69.
- DAŞKIN A, STELLETTA C, PASCALE L, OZTUTAR F, ALEMDAR H, TURRİ F, TIRPAN MB, VENCATO J, TEKİN K, PIZZİ F (2015). Integrated andrological evaluation in Angora goat. *Anim Reprod* **12(3)**: 792.

- DE GEYTER C, DE GEYTER M, KOPPERS B, NIESCHLAG E (1998). Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum Reprod* **13(9)**: 2512-2520.
- DENEHY MA (1975). The propulsion of nonrotating ram and oyster spermatozoa. *Biol Reprod* **13**: 17-29.
- DONNELLY ET, LEWIS SE, MCNALLY JA, THOMPSON W (1998). In vitro fertilization and pregnancy rates: The influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril* **70**: 305-314.
- DORADO J, RODRÍGUEZ I, HÍDALGO M (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* **68**: 168-177.
- DUNNILL P, LILLY MD (1974). Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials. *Biotechnology and Bioengineering*, **16(7)**: 987-990.
- DURFEY C, SWISTEK S, TAN W, CLEMENTE H, RYAN P, WILLARD S, FEUGANG J (2018). Beneficial effects of semen purification with magnetic nanoparticles. *J Miss Acad Sci* **60(2)**: 164-167.
- EHLERS J, BEHR M, BOLLWEIN H, BEYERBACH M, WABERSKI D (2011) Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. *Theriogenology* **76**: 448-454.
- ENGELMANN U, KRASSNIGG F, SCHATZ H, SCHILL WB (1988). Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. *Gamete Res* **19**: 151-160.
- ESK. ET VE SÜT KURUMU (2018). Ankara Keçisi (Tiftik Keçisi). <http://www.esk.gov.tr/tr/11125/Ankara-Kecisi-Tiftik-Kecisi-Son-Erisim-Tarihi>: 21.05.2018.
- EVANS G, MAXWELL WMC (1987). Frozen storage of semen. In: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Wellington, pp. 122-141.
- FARRELL PB, PRESICCE GA, BROCKETT CC, FOOTE RH, (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and their relationship to fertility. *Theriogenology* **49**: 871-879.
- FEUGANG JM (2017). Novel agents for sperm purification, sorting, and imaging. *Mol Reprod Dev* **84**: 832-841.
- FEUGANG JM, LIAO SF, CRENSHAW MA, CLEMENTE H, WILLARD ST, RYAN P L (2015). Lectin-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles for reproductive improvement. *JFIV Reprod Med Genet* **3(2)**: 145.
- FIGUEROLA A, DI CORATO R, MANNA L, PELLEGRINO T (2010). From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacol. Res.* **62**: 126-143.
- FLEMING AD, KUEHL TJ (1985). Effects of temperature upon capacitation of guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* **233**: 3405-3411.
- FLEMING AD, YANAGIMACHI R (1982). Fertile life of acrosome reacted guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* **220**: 109-115.
- FLOWERS WL (1997). Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil Suppl* **52**: 67-78.
- FURSTOSS V, BORDERES F, FORGERIT Y, GUÏLLOUET P, LEBOEUF B (2010). The value of the percentage of motile sperm in predicting a significant portion of the fertility variation of frozen-thawed buck semen. *Theriogenology* **74**: 1197-1206.

- GADEA J (2005). Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* **63**: 431-444.
- GARCÍA HERREROS M, APARÍCIO IM, NÚÑEZ I, GARCÍA -MARÍN LJ, GIL MC, PEÑA VEGA FJ (2005). Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions, *Theriogenology* **63**: 795-805.
- GARCÍA-HERREROS M, LEAL CLV (2014). Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. *Syst Biol Reprod Med* **60**: 338-347.
- GARNER DL, JOHNSON LA (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Bio Reprod* **53**: 276-284.
- GARNER DL, JOHNSON LA, YUE ST, ROTH BL, HAUGLAND RP (1994). Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl* **15(6)**: 620-629.
- GARNER DL, THOMAS CS, JOERG HW, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Bio Reprod* **57**: 1401-1406.
- GIANAROLI L, MAGLI MC, COLLODEL G, MORETTI E, FERRARETTI AP, BACETTI B (2008). Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* **90(1)**: 104-112.
- GIL M, SAR-SHALOM V, MELENDEZ SIVIRA Y, CARRERAS R, CHECA MA (2013). Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* **30**: 479-485.
- GLAZZARD AN, HIRONS MR, MELLOR JS, HOLWILL MEJ (1983). The computer assisted analysis of television images as applied to the study of cell motility. *J Submicrosc Cytol* **15**: 305-308.
- GONZALEZ-CHABARRÍ E, AGUADO JA, NAVARRO M, LOPEZ-RODAS V, COSTAS E (1994). The use of lectins to characterize and separate living canine spermatozoa: A preliminary study. *Theriogenology* **41**: 365-369.
- GRAY J (1955). The movement of sea urchin spermatozoa. *J Exp Biol* **32**: 775-801.
- GRAY J (1958). The movement of the spermatozoa of the bull. *J Exp Biol* **35**: 96-108.
- GRAY J, HANCOCK GJ (1955). The propulsion of sea-urchin spermatozoa. *J Exp Biol* **32**: 802-814.
- GRUNEWALD S, MÍSKA W, MÍSKA G, RASCH M, REINHARDT M, GLANDER HJ, PAASCH U (2007). Molecular glass wool filtration as a new tool for sperm preparation. *Hum Reprod* **22**: 1405-1412.
- GRUNEWALD S, PAASCH U, GLANDER HJ (2001). Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* **2**: 127-133.
- GRUNEWALD S, PAASCH U, SAID TM, RASCH M, AGARWAL A, GLANDER HJ (2006). Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank* **7(2)**: 99-104.
- GUESDON JL, AVRAMEAS S (1977). Magnetic solid-phase enzyme-immunoassay. *Immunochemistry*, **14(6)**: 443-447.
- GUPTA AK, GUPTA M (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. **26**: 3995-4021.

- GTBKGM. GÜMRÜK VE TİCARET BAKANLIĞI KOOPERATİFÇİLİK GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2018). 2017 yılı tiftik raporu. <http://koop.gtb.gov.tr/data/5ad06ebeddec7dd8b423eb2d/2017%20Tiftik%20Raporu.pdf> Son Erişim Tarihi: 21.05.2018.
- HALLAP T, HÅÅRD M, JAAKMA U, LARSSON B, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H (2004). Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology* **62**: 702-13.
- HAUKANES BI, KVAM C (1993). Application of magnetic beads in bioassays. *Biotechnology*, **11(1)**: 60-63.
- HE J, HUANG M, WANG D, ZHANG Z, LI G (2014). Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *J Pharm Biomed Anal.* **101**: 84-101.
- HENNING H, PETRUNKINA AM, HARRISON RAP, WABERSKI D (2013). Cluster analysis reveals a binary effect of storage on boar sperm motility function, *Reprod Fertil Dev* **26**: 623.
- HERRERA J, FIERRO R, ZAYAS H, CONEJO J, JIMENEZ I, GARCÍA A, BETANCOURT M (2002). Acrosome reaction in fertile and subfertile boar sperm. *Arch Androl* **48**:133-139.
- HIRSCHBEIN BL, WHITESIDES GM (1982). Affinity separation of enzymes from mixtures containing suspended-solids – comparisons of magnetic and non-magnetic techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **7(3)**: 157-176.
- HOLT C, HOLT WV, MOORE HDM, REED HCB, CURNOCK RM (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations; Results of two fertility trials. *J Androl* **18(3)**: 312-323.
- HOLT W, VAN LOOK KJ (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* **127**: 527-535.
- HOLT WV, O'BRIEN J, ABAIGAR T (2007). Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reprod Fertil Dev* **19**: 709-718.
- HU YA, LU JC, SHAO Y, HUANG YF, LU NQ (2013). Comparison of the semen analysis results obtained from two branded computer-aided sperm analysis systems. *Andrologia* **45(5)**: 315-318.
- HUBBUCH JJ, MATTHIESEN DB, HOBLEY TJ, THOMAS OR (2001). High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: a first principle comparison. *Bioseparation*, **10(1-3)**: 99–112.
- HUNTER RHF, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H (2002). Analysing mammalian fertilisation. Reservations and potential pitfalls with an in vitro approach. *Zygote* **10**: 11-15.
- HUSZAR G, JAKAB A, SAKKAS D, OZENCİ CC, CAYLI S, DELPIANO E, OZKAVUKCU S (2007). Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* **14**: 650–663.
- HUSZAR G, SBARCÍA M, VÍGUE L, MÍLLER D, SHUR B (1997). Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* **56**: 1020–1024.
- ISHIJIMA SA, OKUNO M, MOHRI H (1991). Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int J Androl* **14**: 340–347.
- İBRAHİM NM, GİLBERT GR, LOSETH KJ, CRABO BG (2000). Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *J Androl* **21**: 887-894.

- İNANÇ ME (2016). Akkaraman koçlarda spermanın kolesterol ve 7-dehidrokolesterol ile dondurulması ve değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- İNANÇ ME, TEKİN K, OLĞAÇ KT, TIRPAN MB, ALEMDAR H, ÇİL B, KAYA U, STELLETTA C, DAŞKIN A (2017). Effects of region and individualism traits on sperm freezability of Angora goats. *Vet Hekim Der Derg* **88(1)**: 31-39.
- İNANÇ ME, UYSAL O, GÜRCAN İS (2014). Farklı ırklardan tekelerde başlıca spermatolojik parametreler. *MAKÜ Sag Bil Enst Derg* **2(1)**: 13-19.
- KALAMBUR VS, HAN B, HAMMER BE, SHIELD TW, BISCHOF JC (2005). In vitro characterization of movement, heating and visualization of magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Nanotechnology*, **16**: 1221-1233.
- KASAI T, OGAWA K, MIZUNO K, NAGAI S, UCHIDA Y, OHTA S, FUJIE M, SUZUKI K, HIRATA S, HOSHI K (2002). Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* **4**: 97-103.
- KASKAR K, FRANKEN DR, VAN DER HORST G, OEHNİNGER S, KRUGER TF, HODGEN GD (1994). The relationship between morphology, motility and zona pellucida binding potential of human spermatozoa. *Andrologia* **26**: 1-4.
- KATHIRAVAN P, KALATHARAN J, EDWIN MJ, VEERAPANDIAN C (2008). Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim Reprod Sci* **104**: 9-17.
- KATHIRAVAN P, KALATHARAN J, KARTHIKEYA G, RENGARAJAN K, KADIRVEL G (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system-a review. *Reprod Domest Anim* **46(1)**: 165-172.
- KATZ DF, DROBNIS EZ, OVERSTREET JW (1989). Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res* **22**: 443-469.
- KRUGER TF, COETZEE K (1999). The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* **5**: 172-178.
- LARSEN L, SCHEİKE T, JENSEN TK, BONDE JP, ERNST E, HJOLLUND NH, ZHOU Y, SKAKKEBAEK NE, GİWERCMAN A (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner study team, *Hum Reprod* **15**: 1562-1567.
- LEBOEUF B, RESTALL B, SALAMON S (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* **62**: 113-141.
- LEE TH, LIU CH, SHIH YT, TSAO HM, HUANG CC, CHEN HH, LEE MS (2010). Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod* **25(4)**: 839-846.
- LEE WY, LEE R, KİM HC, LEE KH, CUI XS, KİM NH, KİM SH, LEE IJ, UHM SJ, YOON MJ, SONG H (2014). Pig spermatozoa defect in acrosome formation caused poor motion parameters and fertilization failure through artificial insemination and in vitro fertilization. *Asian-Australas J Anim Sci* **27**: 1417-1425.
- LEWIN M, CARLESSO N, TUNG CH, TANG XW, CORY D, SCADDEN DT, WEISSLEDER R (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nature Biotechnology*, **18(4)**: 410-414.
- Lİ L, NİNG Y, YİN H, SUN Z (2003). The application of computer assisted sperm analysis on in vitro fertilization. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **34(1)**: 112-114.

- LIU BY, CLARKE GN, BAKER HWG (1991). Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl* **12**: 231-239.
- LIVINGSTON J (1997). *Driving force: The natural magic of magnets*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- LU AH, SALABAS EL, SCHUTH F (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl.* **46**: 1222–1244.
- LU JC, HUANG YF, LÜ NQ (2014). Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* **46(4)**: 329-338.
- MARSHBURN PB, MCINTIRE D, CARR BR, BYRD W (1992). Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertil Steril* **58**: 179-188.
- MCMICHAEL RD, SHULL RD, SWARTZENDRUBER LJ, BENNETT LH (1992). Magnetocaloric effect in superparamagnets. *J. Magn. Magn. Mater.* **111**: 29.
- MELVILLE D, PAUL F, ROATH S (1975). High gradient magnetic separation of red cells from whole blood. *IEEE Trans Magn*, **11**: 1701-1704.
- MOGAS T, RIGAU T, PIEDRAFITA J, BONET S, RODRIGUEZ-GIL JE (1998). Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen. *Theriogenology* **50**: 1171-89.
- MOHAMMED L, GOMAA HG, RAGAB D, ZHU J (2017). Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, **30**: 1-14.
- MOLDAY RS, YEN SPS, REMBAUM A (1977). Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells. *Nature*, **268**: 437-438.
- MORRELL JM, DALIN A-M, RODRIGUEZ-MARTINEZ H (2008). Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Anim Reprod* **5**: 121-126.
- MORRELL JM, RODRIGUEZ-MARTINEZ H (2009). Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open Andrology Journal* **1**: 1-9.
- MORTIMER ST (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* **3(5)**: 403-439.
- MORTIMER D (2000). Sperm preparation methods. *J Androl* **21**: 357-366.
- MOSBACH K, SCHRODER U (1979). Preparation and application of magnetic polymers for targeting of drugs. *FEBS Letters*, **102(1)**: 112-116.
- MUKHOPADHYAY D, VARGHESE AC, NANDI P, BANERJEE SK, BHATTACHARYYA AK (2010). CASA-based sperm kinematics of environmental risk factor-exposed human semen samples designated as normozoospermic in conventional analysis. *Andrologia* **42**: 242-246.
- NADALINI M, TAROZZI N, DI SANTO M, BORINI A (2014). Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one? *J Assist Reprod Genet* **31**: 1045-1051.
- NAGY S, JANSEN J, TOPPER EK, GADELLA BM (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Bio Reprod* **68**: 1828-1835.

- NAAB. NATIONAL ASSOCIATION OF ANIMAL BREEDERS (2018). Management Guidelines: Alternative means of seminal collection. Erişim Adresi: <https://www.naab-css.org/management-guidelines> Son Erişim Tarihi: 18.06.2018.
- NUNES JF, CORTEEL JM, COMBARNOUS Y, BARİL G (1982). Study the involvement of seminal plasma constituents in the seasonal variations of goat spermatozoa motility. In: Proceeding of the III International Conference on Goat Production and Diseases. Arizona, USA p.283
- NUNES JF, SALGUEIRO CCM (2011). Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Rum Res* **98**: 176-184.
- O'CONNELL M, MCCLURE N, LEWIS SE (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* **17**: 704-709.
- ODHIAMBO JF, DEJARNETTE JM, GEARY TW, KENNEDY CE, SUAREZ SS, SUTOVSKY M, SUTOVSKY P (2014). Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. *Biol Reprod* **91(4)**: Article 97, 1-10.
- OLSON GE, WINFREY VP, NAGDAS SK, MELNER MH (2004). Region-specific expression and secretion of the fibrinogen-related protein, fgl2, by epithelial cells of the hamster epididymis and its role in disposal of defective spermatozoa. *J Biol Chem* **279**: 51266-51274.
- PACEY AA, LADBROOK MB, BARRATT CL, COOKE ID (1997). The potential shortcomings of measuring hyperactivated motility by computer-aided sperm analysis when sperm motion is multiphasic. *Hum Reprod Update* **3**: 185-193.
- PANKHURST QA, CONNOLLY J, JONES SK, DOBSON J (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**: R167-R181.
- PARINAUD J, VIEËTEZ G, MOUTAFFIAN H, RICHÖILLEY G, MİLHET P (1996). Relationships between motility parameters, morphology and acrosomal status of human spermatozoa. *Hum Reprod* **11**: 1240-1243.
- PERTOFT H (2000). Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Methods* **44**: 1-30.
- PURDY PH (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum Res* **63**: 215-225.
- RAHMAN MM, KHAN SB, JAMAL A, FAISAL M, AISIRI AM (2011). Iron oxide nanoparticles. In: Nanomaterials, Ed.: Rahman MM., IntechOpen, Chapter 3.
- RAJ K, MOSKOWITZ B, CASCIARI R (1995). Advances in ferrofluid technology. *J. Magn. Magn. Mater.* **149**: 174.
- RAWV VY, URINO BOUDRI H, ALVAREZ SEDO C, CARRO M, PAPIER S, NODAR F (2010). Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed* **20**: 320-323.
- RITAR AJ, SALAMON S (1982). Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the angora goat. *Aust J Biol Sci* **35**: 305-312.
- ROBINSON PJ, DUNNILL P, LILLY MD (1973). Properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **15(3)**: 603-606.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H (2007). State of the art farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev* **19**: 91-101.
- ROY A (1957). Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* **179**: 318-319.

- SAACKE RG, DALTON JC, NADİR S, NEBEL RL, BAME JH (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci* **60-61**: 663-677.
- SAFARIK I, SAFARIKOVA M (2004). Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, **2(1)**: 7.
- SAID T, LAND JA (2011). Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update* **17(6)**: 719-733.
- SAID TM, AGARWAL A, GRUNEWALD S, RASCH M, GLANDER HJ, PAASCH U (2006). Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed* **13(3)**: 336-339.
- SAID TM, AGARWAL A, ZBOROWSKI M, GRUNEWALD S, GLANDER HJ, PAASCH U (2008). Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* **29(2)**: 134-142.
- SAID TM, GRUNEWALD S, PAASCH U, GLANDER H-J, BAUMANN T, KRİEGEL C, LI L, AGARWAL A (2005a). Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod BioMed Online* **10**: 740-746.
- SAID TM, GRUNEWALD S, PAASH U, RASCH M, AGARWAL A, GLANDER HJ (2005b). Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil Steril* **83(5)**: 1442-1446.
- SAMPER JC, HAMILTON DW, PRYOR JL, LOSETH KJ, TREDSSON MHT, CRABO BG (1995). Mechanism of sephadex trapping of capacitated stallion spermatozoa. *Biol Reprod (monograph 1)* 729-37.
- SATAKE N (2006). Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *J Exp Biol* **209**: 1560-1572.
- SCHAFFER S, HOLZMANN A (2000). The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **59**: 201-211.
- SENYEI A, WIDDER K, CZERLINSKI G (1978). Magnetic guidance of drug-carrying microspheres. *Journal of Applied Physics*, **49(6)**: 3578-3583.
- SETCHELL CH (1985). Magnetic separations in biotechnology – a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology B – Biotechnology*, **35(3)**: 175-182.
- SHAMSUDDİN M, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H (1994). A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. *Anim Reprod Sci* **36**: 61-75.
- SHELTON M (1993a). Origin and domestication of the goat and history of the Angora goat and the mohair industry. In: Angora Goat and Mohair Production. Anchor Publishing Company. Chapter 1.
- SHELTON M (1993b). Reproduction. In: Angora Goat and Mohair Production. Anchor Publishing Company. Chapter 4.
- 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. *Reprod Domest Anim* **38**: 134-140.
- SOMFAI T, BODO S, NAGY S, PAPP AB, IVANCSICS J, BARANYAI B, GOCZA E, KOVACS A (2002). Effect of swim-up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim* **37**: 285-90.
- SRIVASTAVA N, PANDE N, TYAGI S, DIN O (2017). Selection of spermatozoa. In: Protocols in Semen Biology (Comparing Assays). Eds: Srivastava N, Pande M. Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore.

- SUAREZ SS, KATZ DF, OVERSTREET JW (1983). Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol Reprod* **29**: 1277-1287.
- SUAREZ SS, DAI XB, DEMOTT RP, REDFERN K, MIRANDO MA (1992). Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *J Androl* **13**: 75-80.
- SUAREZ SS, KATZ DF, OWEN DH (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* **44**: 375-381.
- SUTOVSKY P, KENNEDY CE (2013). Biomarker-based nanotechnology for the improvement of reproductive performance in beef and dairy cattle. *Industrial Biotechnology* **9(1)**: 24-30.
- SUTOVSKY P, LOVERCAMP K (2010). Molecular markers of sperm quality. *Soc Reprod Fertil Suppl* **67**: 247-256.
- SUTOVSKY P, MORENO R, RAMALHO-SANTOS J, DOMINKO T, THOMPSON WE, SCHATTEN G (2001). A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Sci* **114(9)**: 1665-1675.
- TAYLOR U, RATH D, ZERBE H, SCHUBERTH HJ (2008). Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. *Reprod Domest Anim* **43**: 166-175.
- TEKİN K (2017). Ankara tekesi sperması dondurulmasında polivinil alkolün spermatozoa canlılığı ve fonksiyonu üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- TENG Z, LI J, YAN F, ZHAO R, YANG W (2009). Highly magnetizable superparamagnetic iron oxide nanoparticles embedded mesoporous silica spheres and their application for recovery of DNA from agarose gel. *J. Mater. Chem.*, **19**: 1811-1815.
- THOMAS CA, GARNER DL, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE (1998). Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* **58**: 786-793.
- THYS M, VANADELE L, MORRELL JM, MESTACH J, VAN SOOM A, HOOGEWIJS M, RODRIGUEZ-MARTINEZ H (2008). In vitro fertilising capacity of frozen-thawed bull spermatozoa separated by colloidal centrifugation through single-layer or gradients. *Reprod Domest Anim* **44(3)**: 390-394.
- TIRPAN MB (2012). Ankara tekesi spermasının dondurulmasında Tris sulandırıcı bileşenleri yerine katılan borun (Sodyum pentaborat) çözümü sonu sperma kalitesi üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- TIRPAN MB, TEKİN N (2015). Effects of boron (sodium pentaborate), added instead of Tris components, on freezing and post-thaw quality of Angora buck semen. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **62**: 295-302.
- TYTSKB. TİFTİK VE YAPAĞI TARIM SATIŞ KOOPERATİFLERİ BİRLİĞİ (2018). Tarihçe. <http://tiftikbirlik.com.tr/sayfa.aspx?ID=4> Son Erişim Tarihi: 21.05.2018.
- UGELSTAD J, SODERBERG L, BERGE A, BERGSTROM J (1983). Monodisperse polymer particles - a step forward for chromatography. *Nature*, **303(5912)**: 95-96.
- VAN DER HORST (2018). A unique indigenous breed of South african goat: Semen and sperm analyses of Tankwa goats using SCA 6.2. Erişim Adresi: <https://www.microopticsl.com/fr/semens-and-sperm-analyses-of-tankwa-goats-2/> Erişim tarihi: 11.09.2018
- VAN DER MERWE FH, KRUGER TF, OEHNİNGER SC, LOMBARD CJ (2005). The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecol Obstet Invest* **59**: 86-91.

- VAN WAART J, KRUGER TF, LOMBARD CJ, OMBELET W (2001). Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* **7**: 495-500.
- VENDRELL X, FERRER M, GARCIA-MENGUAL E, MUNOZ P, TRIVINO JC, CALATAYUD C, RAWE VY, RUIZ-JORRO M (2014). Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reprod Biomed Online* **28**: 492-502.
- VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONELIN K (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* **57**: 149-179.
- VOLPE S, LEOCÌ R, AIUDÌ G, LACALANDRA GM (2009). Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* **44(Suppl. 2)**: 275-278.
- WHO. World Health Organization (2010). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cooper TG (ed) 5th Edition, Switzerland.
- WIDDER KJ, SENYEI AE, SCARPELLI DG (1978). Magnetic microspheres—model system for site specific drug delivery in vivo. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **158(2)**: 141-146.
- YANAGIMACHI R (1984). Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res* **10**: 187-232.
- YANÍZ JL, SÍLVESTRE MA, SANTOLARÍA P, SOLER C (2018). CASA-Mot in mammals: an update. *Reprod Fertil Dev* Doi: 10.1071/RD17432.
- YAVUZ CT, PRAKASH A, MAYO JT, COLVIN VL (2009). Magnetic separations: From steel plants to biotechnology. *Chem Eng Sci*. **64**: 2510-2521.
- XÍN AJ, CHENG L, DÌAO H, WANG P, GU YH, WU B, WU YC, CHEN GW, ZHOU SM, GUO SJ, SHI TJ, TAO SC (2014) Comprehensive profiling of accessible surface glycans of mammalian sperm using a lectin microarray. *Clin Proteomics* **11**: 10.

EKLER

EK-1

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 04/07/2018
TOPLANTI NO : 2018-14
DOSYA NO : 2017-3
KARAR NO : 2018-14-90

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ali Daşkın'ın yaptığı; araştırmacı olarak Vet.Hek.Havva Alemdar'ın katıldığı; "Ankara Tekesi Spermasının Nanopürifiye Edilerek Dondurulması" başlıklı araştırma projesi Kurulumuzun 2017-2-13 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

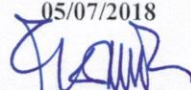
Söz konusu çalışma ile ilgili olarak Dr. Öğr. Üyesi M. Borga TIRPAN tarafından; 19.06.2018 tarihinde verilen dilekçe ve eklerinde proje yürütücüsünün değiştirilmesi, projede kullanılacak hayvan sayısının üçe indirilmesi ve projede B planı olarak elektroejakülatör kullanılarak sperma alınması talep edilmektedir.

Dr. Öğr. Üyesi M. Borga TIRPAN'ın söz konusu dilekçesi, Üniversite Senatosununun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11. maddesinin 5. fıkrası kapsamında değerlendirilmiş, Kurulumuzun 18/01/2017 tarih ve 2017-2-13 sayılı kararıyla onaylanan "Ankara Tekesi Spermasının Nanopürifiye Edilerek Dondurulması" başlıklı araştırma projesinin yürütücüsünün Dr. Öğr. Üyesi M. Borga TIRPAN olarak değiştirilmesinin, hayvan sayısının üçe indirilmesinin ve projede B planı olarak elektroejakülatör kullanılarak sperma alınmasının ilave edilmesinin uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Keçi
Hayvan Sayısı : 3
Geçerlilik Süresi : 01/05/2017-01/11/2018

ASLININ AYNIDIR

05/07/2018


Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Havva
Soyadı : ALEMDAR
ORCID ID : 0000-0002-5781-4238
Doğum yeri ve tarihi : Altındağ/Ankara, 25.08.1991
Uyruğu : T.C.
T.C. Kimlik no : 51988655232
Medeni Durumu : Bekar
İletişim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Dışkapı, Ankara
(0312) 317 03 15/
h.alemdar91@hotmail.com

II. Eğitimi

- Doktora: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı (2014-)
- Lisans: Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimliği (2009-2014)
- Lise: TED Ankara Koleji Vakfı Özel Lisesi (2005-2009)– Uluslararası International Baccalaureate Program (Bilingual Diploma), Türkçe A1 (Higher Level): 5/7; İngilizce A2 (Higher Level): 5/7; Biyoloji (Higher Level, Eng): 4/7; Fransızca B: 4/7; Kimya (Standard Level, Eng): 4/7; Matematik (Standard Level, Eng): 5/7.

Yabancı dili: İngilizce (TOEFL: 98; Reading: 26; Listening: 24; Speaking: 24; Writing: 24; Sınav Tarihi: 16 Aralık 2017).

III. Ünvanları

- Veteriner Hekim

IV. Mesleki Deneyimi

- Staj: İzmir Doğal Yaşam Parkı, Haziran-Temmuz 2012
- Cantaura Veteriner Kliniği, Veteriner Hekim Yardımcılığı, Temmuz-Ağustos 2013

- Centaura Veteriner Kliniği, Veteriner Hekimlik, Ocak-Haziran 2017
- Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Gizem Tez'in tez çalışmasında yardımcı olarak Çankaya Belediyesi, Sahipsiz Hayvan Rehabilitasyon Merkezinde; konvansiyonel ve Laparoskopik kısırlaştırma uygulamaları sırasında anestezi takibi (Nisan-Temmuz 2017)

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR – 2018)
- Klinisyen Veteriner Hekimler Derneği (Klivot – 2017-)

VI. Bilimsel İlgi Alanları

Yayımları:

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI, SSCI, Arts and Humanities)

- Tırpan MB, Özgörey ED, Alemdar H, Akçay E (2016). Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) semen and fertility. Turk J Vet Anim Sci 40: 200-206.
- Stelletta C, Tekin K, Tırpan MB, Alemdar H, Çil B, Stelletta F, Olğaç KT, İnanç ME, Daşkın A (2017). Vulvar thermal pattern following synchronization of estrus is linked to fertility after timed artificial insemination in goat. Theriogenology 103: 137-142.
- Tekin K, Tırpan MB, Olğaç KT, Alemdar H, Daşkın A, Turri F, Çil B, Pizzi F (2018). Relationship between sperm quality and reproductive tract ultrasound in buck. Anim Reprod Sci (Hakem değerlendirmesinde)
- Daşkın A, Tekin K, Çil B, Alemdar H; Tırpan MB, Turri F, Olğaç KT, Pizzi F, Stelletta C (2018). Reproductive ultrasonography and semen quality in buck. Ital J Anim Sci (Hakem değerlendirmesinde)
- İnanç ME, Çil B, Alemdar H, Daşkın A (2018). The combination of CASA kinetic parameters florescent staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. Turk J Vet Anim Sci 42: 1-7.
- Tırpan MB, Tekin K, Çil B, Alemdar H, İnanç ME, Olğaç KT, Stelletta C, Daşkın A (2018). The effects of different PMSG doses on estrus and pregnancy rate in Angora goats. Animal (2018): 1-6.
- İnanç ME, Olğaç KT, Tekin K, Çil B, Alemdar H, Özen D, Uysal O (2018). Effect of cholesterol and 7-dehydrocholesterol on bull semen freezing different rates of glycerol. Kafkas Univ Vet Fak Derg 24(6): 815-820.

Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- İnanç ME, Tekin K, Olğaç KT, Tırpan MB, Alemdar H, Çil B, Kaya U, Stelletta C, Daşkın A (2017). Effects of region and individualism traits on sperm freezability of Angora Goats. Vet Hekim Der Derg 88(1): 31-39.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- Daşkın A, Stelletta C, Pascale L, Öztutar F, Alemdar H, Turri F, Tırpan MB, Vencato J, Tekin K, Pizzi F. Integrated andrological evaluation in Angora goat. Anim Reprod (2015) 12(3): 792.
- Daşkın A, İnanç ME, Tekin K, Olğaç KT, Tırpan MB, Alemdar H, Çil B, Kaya U. Effects of region and individualism on sperm freezability of Angora goat. 32nd World Veterinary Congress (2015): 276.
- Daşkın A, Tekin K, Tırpan MB, İnanç ME, Çil B, Alemdar H. The effect of different insemination techniques and cervical conformation index on fertility rates in Angora goat. 10th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology (AAAA), (24-26 Haziran 2016, Tours, Fransa), Anim Reprod Sci 169: 116.
- Uysal O, İnanç ME, Yılmaz B, Tekin K, Olğaç KT, Alemdar H, Akkurt MY, Temizkan MC, Özen D, Taşdemir U, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Çınar Kul B, Durmaz E, Ertuğrul O. Fluorescein staining of Aksaray malaklı shepherd dog (Turkish mastiff) semen treated with different level of cholesterol loaded cyclodextrin. 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), (26-30 Haziran 2016, Tours, Fransa): 195.
- Daşkın A, İnanç ME, Tekin K, Olğaç KT, Alemdar H. Different doses of PMSG during timed artificial insemination protocol in Angora goat. 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), (26-30 Haziran 2016, Tours, Fransa): 492.
- İnanç ME, Alemdar H, Tırpan MB, Daşkın A, Pizzi F, Stelletta C. Vulvar and perivulvar thermal pattern in does during timed artificial insemination protocols. 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), (26-30 Haziran 2016, Tours, Fransa): 501.
- Tekin K, Alemdar H, Daşkın A, Stelletta C. Effect of estrus behavioral pattern on pregnancy rates in synchronized Angora goats. 12th International Conference on Goats (IGA), (25-30 Ekim 2016, Antalya, Türkiye): 81.
- Alemdar H, Daşkın A. Dosage of iron oxide nanoparticles in selection of Angora buck semen before freezing: Preliminary results. 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), (27-29 Ekim 2018, Cordoba, İspanya) Reprod Domest Anim 53(2): 101.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- Tekin K, Stelletta C, Alemdar H, Olğaç KT, Çil B, Tırpan MB, Daşkın A. Ankara keçisinde transrektal masaj yöntemi ile sperm alma ve suni tohumlama. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, (5-9 Ekim 2016, Antalya, Türkiye): 99-100.
- Alemdar H, Olğaç KT, Tekin K, Çil B, Tırpan MB, Stelletta C, Daşkın A. Ankara keçilerinde sezona girişte en uygun tohumlama zamanının

belirlenmesinde termografinin kullanımı. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, (5-9 Ekim 2016, Antalya, Türkiye): 131-134.

- Alemdar H, Olğaç KT, Çil B, Stelletta C, Tekin K, Tırpan MB, Daşkın A. Ankara keçilerinde sezon dışı senkronizasyon ve tekrarlı suni tohumlama uygulamaları. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, (5-9 Ekim 2016, Antalya, Türkiye):135-136.
- İnanç ME, Tekin K, Olğaç KT, Yılmaz B, Alemdar H, Güngör Ş, Taşdemir U, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Uysal O. Aksaray malaklısı çoban köpeğinde (Türk mastifi) androlojik değerlendirmeler. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, (5-9 Ekim 2016, Antalya, Türkiye): 145-146.

VII. Bilimsel Etkinlikleri

- “Vücudunuz Konuşuyor-Vücut Dili” – Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi (21 Şubat 2014).
- Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası, ANKÜSEM ve Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu, Haziran 2014.
- 10th Biennial Conference on Association for Applied Animal Andrology (AAAA), 24-26 Haziran 2016.
- 12th International Conference on Goats (IGA), 25-30 Ekim 2016.
- 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, 5-9 Ekim 2016.
- Parazitoloji Eğitim Semineri, Kedi ve Köpeklerin Yaşam Şekillerine Göre Parazit Çözümleri, Klivet, 25 Nisan 2017.
- 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), 27-29 Ekim 2018.

Aldığı burslar

- “Ankara Keçileri temelinde keçi işletmelerinde yönetim sisteminin yardımcı üreme teknikleri ile bütünleştirilmiş bir modelinin geliştirilmesi” – TÜBİTAK-CNR (İtalya) – Proje bursiyeri, Proje no: 213O034. Ekim 2014-Mayıs 2016.

Ödüller

- “Radyoloji Sertifikası” – Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi (30 Mayıs 2014).
- “Ziyaretçi Araştırmacı” – CNR-TÜBİTAK İkili İşbirliği Programı çerçevesinde, Hayvan Sağlığı, Reprodüksiyon ve Sağlık Bölümü, Padova Üniversitesi, İtalya. Proje adı: ‘Çiftlik Hayvanları temelinde işletmelerde yönetim sisteminin yardımcı üreme teknikleri ile bütünleştirilmiş bir modelinin geliştirilmesi’, Çalışma konusu: USG ve termografinin bovin, ovin ve bufalo türlerinde kullanımı; ruminantlar ve Güney Amerika Kamelidlerinde ET programlarının karşılaştırmalı değerlendirilmesi (1-10 Temmuz 2015).
- “Genç Araştırmacı Teşvik Ödülü” – 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi (5-9 Ekim 2016).

Projeleri

- “Ankara Keçileri temelinde keçi işletmelerinde yönetim sisteminin yardımcı üreme teknikleri ile bütünleştirilmiş bir modelinin geliştirilmesi” – TÜBİTAK-CNR (İtalya) İkili İşbirliği Projesi – Proje bursiyeri, Proje no: 213O034. Ekim 2014- Mayıs 2016.
- “Ankara tekesi spermasının nanopürifiye edilerek dondurulması” – Ankara Üniversitesi BAP Doktora tez projesi – Araştırmacı, Proje no: 17L0239012. (3 Temmuz 2017 - 3 Ocak 2019, devam ediyor).

Verdiği konferans ya da seminerler

- 1. Doktora Semineri: “Memelilerde feromonların üreme davranışları üzerinde etkileri” (23 Aralık 2015).
- 2. Doktora Semineri: “Memeli dişi genital kanalında spermatozoa taşınması ve spermatozoayı yönlendiren mekanizmalar” (25 Mayıs 2016).
- 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi Sunuculuğu (5-9 Ekim 2016, Antalya, Türkiye) (Düzenleme Kurulu Görevi)
- Journal Club Moderatörlüğü: Microfluidic Sperm Sorting Chips, 6 Şubat 2017, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

VIII. Diğer Bilgiler

Eğitim programları haricinde katıldığı etkinlikler

- Ecole Nationale Veterinaire d’Alfort, Paris, Fransa – International Veterinary Student Association (IVSA) Öğrenci Değişim Programı, (Ekim 2014 - 1 haftalık ziyaret)